รายงานการวิจัยการตรวจหาสภาวะเหนือพันธุกรรมของยีน SHP-1 promoter 2 hypermethylation ในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด เพื่อตรวจหาการกระจายของเซลมะเร็งที่ตรวจไม่พบด้วยวิธีมาตรฐานและความสัมพันธ์กับการพยากรณ์การกลับเป็นใหม่ของโรค

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุพารพงศ์
คณะแพทยศาสตร์

บทคัดย่อ

แม้ว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลไม่เล็กระยะที่หนึ่งจะได้รับการผ่าตัดเพื่อหวังให้หายขาดแต่ยังพบว่ามีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคซึ่งอาจจะนำไปสู่การเสียชีวิต การแพร่กระจายของเซลมะเร็งปอดชนิดเซลไม่เล็กปริมาณน้อยในต่อมน้ำเหลืองซึ่งอาจตรวจไม่พบด้วยวิธีมาตรฐานโดยการย้อมเป็นกลไกที่เชื่อว่าน่าจะมีความสัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของโรคการศึกษาวิจัยนี้ได้มีการนำวิธีการตรวจหาสภาวะเหนือพันธุกรรมที่มีการเติมหมู่เมททิลของยีน SHP-1 promoter 2 ซึ่งมีความจำเพาะกับเซลเยื่อบุผิวหนังรวมถึงเซลมะเร็งที่เกิดจากเซลเยื่อบุว่าจะสามารถใช้พยากรณ์โรคในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงของกลับเป็นซ้ำ

เพื่อทำการทดสอบว่าการตรวจหาสภาวะเหนือพันธุกรรมที่มีการเติมหมู่เมททิลของยีน SHP-1 promoter 2 จะสามารถบ่งชี้ถึงการกระจายของเซลมะเร็ง ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาค่าดังกล่าวในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลไม่เล็กระยะที่สองและสามเปรียบเทียบกับต่อมน้ำเหลืองที่โตจากการติดเชื้อ หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ทำการตรวจในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลไม่เล็กระยะที่หนึ่งซึ่งผู้ป่วยทั้งหมดจะได้รับการผ่าตัดและติดตามการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลไม่เล็กระยะที่หนึ่งที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรคภายในระยะเวลา 40 เดือนจะจัดเป็นผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงของการกลับเป็นซ้ำ

การตรวจหาสภาวะเหนือพันธุกรรมที่มีการเติมหมู่เมททิลของยีน SHP1 promoter 2 พบว่ามีค่าที่สูงในต่อมน้ำเหลืองที่มีการกระจายของเซลมะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับต่อมน้ำเหลืองที่ไม่พบการกระจายของเซลมะเร็งและต่อมน้ำเหลืองที่โตของการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ และในการตรวจหาสภาวะเหนือพันธุกรรมที่มีการเติมหมู่เมททิลของยีน SHP1 promoter 2 ในต่อมน้ำเหลือง 198 ต่อมในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลไม่เล็กจำนวน 23 รายพบว่า การตรวจพบต่อมน้ำเหลืองที่มีค่า SHP1 promoter 2 สูงเกินว่า 58% จะสัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของโรคซึ่งสามารถใช้ในการประเมินความเสี่ยงของการกลับเป็นซ้ำของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลไม่เล็กระยะที่หนึ่ง ความไว 71% และความจำเพาะ 99% (HR 0.43-1.04; p=0.07)

Abstract The role of *SHP-1* promoter *2* hypermethylation detection of lymph node micrometastasis in resectable nonmetastasis NSCLC as a prognostic marker of disease recurrence.

Introduction; Despite adequate surgical management of stage I non-small cell lung cancer, many patients still have relapsed of disease which leads to mortality. Micrometastasis of tumor is the postulate mechanism which might not be detected by standard H&E method. The author conducted the study of epithelial methylation marker, SHP-1 Promoter 2 (SHP1P2) methylation as a potential molecular marker to detect high risk relapsed of disease in stage I resectable non-small cell lung cancer (NSCLC).

Method; To explore the potential role of SHP1P2 methylation to detect micrometastasis, Lymph node from resectable NSCLC stage II-IIIA and reactive lymph node were recruited as validate set. Further validation in lymph node from stage I NSCLC was done. All study participants was underwent curative resection and follow-up at The King Chulalongkorn Memorial Hospital. Stage I NSCLC who had a recurrence within 40 months after resection was defined as high risk patient.

Results; Seventy-five lymph nodes in validate set were analyzed. SHP1P2 methylation was significant higher in metastasis lymph node compared with reactive or no metastasis lymph node by H&E method (p=0.008). One hundred and ninety-eight lymph nodes from 23 patients with stage I non-small cell lung cancer was recruited in the analysis. Containing more than 58% of high SHP1P2 methylation in analyzed resected lymph node could be predict high risk of disease, sensitivity 71% and specificity 99% (HR 0.43-1.04; p=0.07).

Conclusion; SHP1P2 methylation of resected lymph node of stage I NSCLC treated with curative intent of surgery is associated with early relapsed of disease.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (CU-CLUSTER-FUND)

CONTENTS

	Page
ABSTRACT THAI	ii
ABSTRACT ENGLISH	iii
ACKNOWLEDGMENTS	iv
CONTENTS	v
LIST OF TABLES	viii
LIST OF FIGURES	ix
LIST OF ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1. RATIONAL AND BACKGROUND OF NODAL MICROMETASTASIS STAGE I NSCLC AND RELAPSED OF DISEASE	1
1.2. RATIONAL AND BACKGROUND OF POTENTIAL BIOMARKER ABERRANT SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION	1
1.3. OUTLINE OF THE STUDY	3
1.3.1. RESEARCH QUESTION	4
1.3.2. HYPOTHESIS	4
1.3.3. OBJECTIVE OF THE STUDY	4
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	5
2.1. STUDY PARTICIPANTS	5
2.2. DNA PREPARATION	6
2.3. BISULFITE DNA PREPARATION	6

2.4. QUANTITATIVE ANALYSIS OF SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION BY REAL-TIME PCR (METHYLIGHT)..... 7

2.5. STATISITCAL ANALYSIS..... 9

CHAPTER III RESULTS..... 10

3.1 VALIDATION OF QUANTITATIVE SHP1P2 OF RESECTABLE NODAL METASTASIS NON-SMALL CELL LUNG CANCER CORRELATION WITH HISTOLOGICAL RESULT AND NON-MALIGNANT CONTROL..... 10

3.1.1. PATIENT CHARACTERISTICS..... 10

3.1.2. SHP1P2 OF NODAL METASTASIS RESECTABLE NON-SMALL CELL LUNG CANCER AND NON-MALIGNANT CONTROL..... 11

3.2 QUANTITATIVE SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION OF RESECTABLE NODE NEGATIVE NON-SMALL CELL LUNG CANCER AND PROGNOSIS CORRELATION..... 14

3.2.1. PATIENT CHARACTERISTICS..... 14

3.2.2. SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION OF RESECTABLE NODE NEGATIVE NON-SMALL CELL LUNG CANCER 16

3.2.3. STRATIFICATION SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION ACCORDING TO PROGNOSIS IN RESECTABLE NODE NEGATIVE NON-SMALL CELL LUNG CANCER..... 19

CHAPTER IV DISCUSSION..... 21

4.1. IMPACT OF DNA SAMPLE PREPARATION AND SHP1P2 METHYLATION..... 21

4.2. SHP1P2 METHYLATION DETECTION IN NODE NEGATIVE RESECTABLE NSCLC STAGE I, THE IMPACT OF DETECTION AND THE PROBLEM OF INTERPRETATION..... 22

CHAPTER V CONCLUSION..... 23

BIBLIOGRAPHY..... 24

APPENDICES..... 26

BIOGRAPHY..... 38

LIST OF TABLES

TABLES		PAGE
3.1	Patient characteristic of validate SHP1P2 methylation as potential molecular marker for micrometastasis detection.....	10
3.2	A[1]mount of DNA per cut slide, and SHP1P2 methylation index and level corresponding to review pathological result.....	12
3.3	Demographic data of node negative resectable NSCLC, module 2.....	15
3.4	Amount of DNA per cut slide, SHP1P2 methylation index and absolute SHP1P2 methylation of resectable NSCLC module 2 according to relapse-free survival.....	17

LIST OF FIGURES

FIGURES		PAGE
1.1	Outline of the study in the first group of study participants.....	3
1.2	Outline of the second group of study participants	3
3.1	Average SHP1P2 methylation index of lymph node from module 1; resectable non-small cell lung cancer according to H&E result micrometastasis, no metastasis, presence of metastasis and reactive lymph node from benign disease.....	13
3.2	Amount of total SHP1P2 methylation per cut slide of lymph node from module 1; resectable non-small cell lung cancer according to H&E result micrometastasis, no metastasis, presence of metastasis and reactive lymph node from benign disease.....	13
3.3	Amount of DNA per cut slide of lymph node from module 1; resectable non-small cell lung cancer according to H&E result micrometastasis, no metastasis, presence of metastasis and reactive lymph node from benign disease.....	13
3.4	Amount of DNA per cut slide of resected lymph node of stage I NSCLC according to group of patient (case vs control).....	17
3.5	SHP1P2 methylation index of resected lymph node of stage I NSCLC according to group of patient (case vs control).....	18
3.6	Absolute SHP1P2 methylation of resected lymph node of stage I	

NSCLC according to group of patient (case vs control)..... 18

3.7 Area under the curve of SHP1P2 index and absolute SHP1P2 methylation in node negative resectable NSCLC..... 19

3.8 Percentage of absolute SHP1P2 methylation more than 84 ng in analyzed lymph node in node negative resectable non-small cell lung cancer..... 20

LIST OF ABBREVIATIONS

NSCLC	Non-small cell lung cancer
mSHP1P2	Methylated SHP-1 promoter 2 status
uSHP1P2	Unmethylated SHP-1 promoter 2 status
AQAMA	Absolute quantitative version of quantitative assessment of methylated
MGMT	O^6-methylguanine-DNA-methyltransferase
ECOG	Eastern cooperative oncology group

CHAPTER I

INTRODUCTION

1.1 RATIONAL AND BACKGROUND OF NODAL MICROMETASTASIS STAGE I NSCLC AND RELAPSED OF DISEASE

Non-small cell lung cancer is the leading cause of death in the world and also in Thailand. Complete surgical resection of localized tumors remains the principle treatment for curative potential. Despite curative surgical resection of stage I disease, there is still high recurrence rate almost 30%.[1] Beside the tumor biology [2, 3], under staging from undetectable lymph node involvement which lead to inaccurate adjuvant treatment according to the true stage of disease, is the most important caused of recurrent disease. Sentinel lymph node mapping with radioisotope [4], systematic nodal dissection [5] is the developing surgical technique to adequate lymph node dissection. However the H&E stain which is the standard method to detect lymph node metastasis still lacks sensitivity to detect micrometastasis. The IHC analysis by cytokeratin antibody [6] or RT-PCR of cytokeratin panels have more sensitivity than conventional H&E staining [7, 8]. Both of those techniques have limitation to use in routine clinical practice. The IHC for all dissected LN is laborious intensive approach and RT-PCR technique need complex tissue preservation and procedure.

1.2. RATIONAL AND BACKGROUND OF POTENTIAL BIOMARKER ABERRANT SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION

SHP-1 or PTPN6, an intracellular protein tyrosine phosphatase composes of two N-terminal Src homology-2 domains that allow binding to phosphotyrosines residues, was

located on chromosome 12. It consists of 17 exons spanning 17 kb of DNA. Banville D et al. study identified 2 transcription initiation sites of SHP-1 gene by the alternate splicing and exon skipping. These mechanisms result of 2 difference transcriptions size, 2.4 and 2.6 kb, difference at their N-termini. The two translation initiation of epithelial cell and hematopoietic cell isoforms of PTPN6 are located within exon 1 and 2 respectively. The pattern of transcription is determined by usage of either of 2 tissue-specific promoter sequences. Promoter 1 located approximated 7 kb upstream from the second promoter, is active in all cells of epithelial cell origins but not active in hematopoietic lineage. Conversely promoter 2 is active in cell of hematopoietic lineage but not epithelial cell.[9]

The distinct role and pattern of SHP-1 in hematopoietic and epithelial cell was further explored by Ruchusatsawat, K. et al study [10] which identified SHP-1 promoter 2 as a tissue-specific methylation regulation, control by distinct promoter hypermethylation, and involved with pathological epithelial condition other than malignancy. SHP-1 promoter 2 (SHP1P2) complete methylation was constantly detected in all epithelial cell lines (Hela, Hep2, SW480, HaCaT and HepG2) and normal epithelium from several organs such as prostate gland, breast, lung, kidney and liver whereas in normal hematopoietic cell without exception was nonmethylated. This study also confirmed the strong association between methylation of promoters and their activities.

1.3. OUTLINE OF THE STUDY

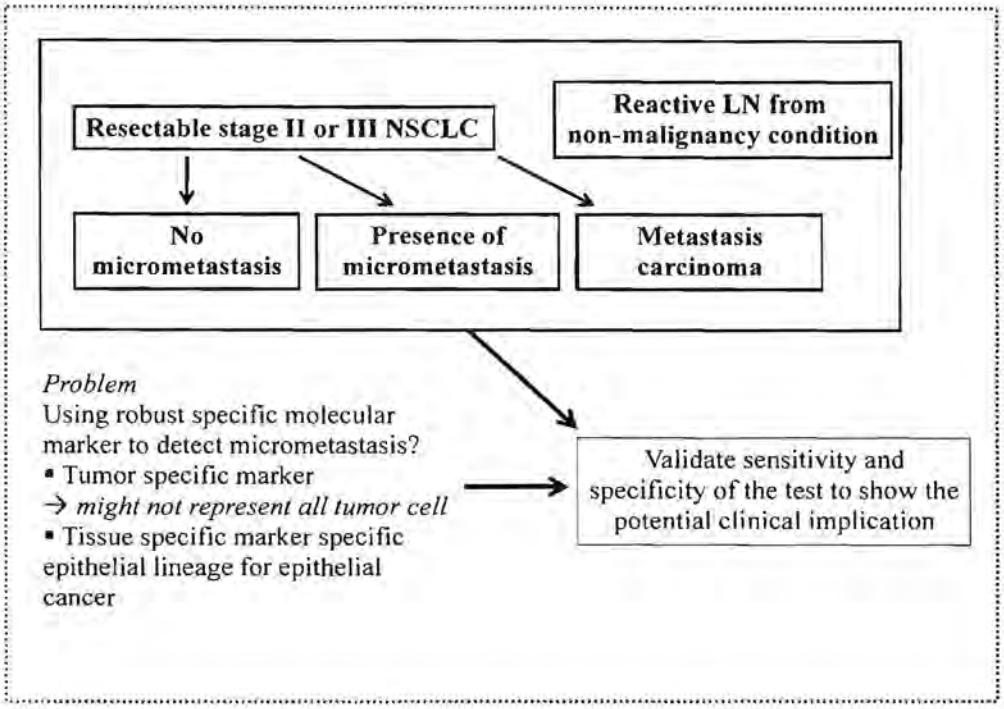

Figure1.1. Outline of the study in the first group of study participants.

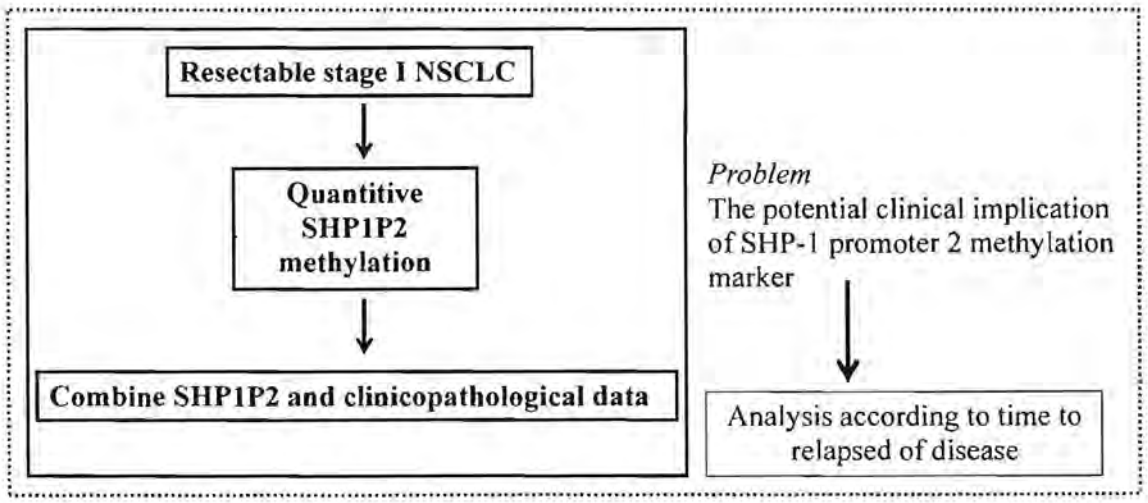

Figure1.2. Outline of the second group of study participants.

1.3.1. RESEARCH QUESTION

Is the epithelial methylation marker, SHP1P2 methylation, could represent micrometastasis of epithelial-derived malignancy cell better than standard H&E staining technique in node negative resectable NSCLC?

1.3.2. HYPOTHESIS

SHP1P2 methylation detection from node negative resectable NSCLC which is represented epithelial lineage in lymphoid tissue to detect micrometastasis disease might lead to demonstrate the high risk of disease recurrence in lymph node negative stage I NSCLC.

1.3.3. OBJECTIVE OF THE STUDY

1.3.3.1. To prove that *SHP-1* promoter 2 hypermethylation could be a candidate molecular staging for detection of lymph node involvement in resectable nonmetastatic NSCLC.

1.3.3.2. To evaluation the correlation of *SHP-1* promoter 2 methylation status and the relapsed rate of resectable nonmetastatic nodal negative NSCLC (stage I)

CHAPTER II

MATERIALS AND METHODS

2.1. STUDY PARTICIPANTS

To validate the potential used SHP1P2 methylation detection as a molecular to represent micrometastasis of node negative resectable NSCLC, the study participants was conducted in 2 groups. The nodal metastasis resectable NSCLC was explored first. The staging was reviewed according to the current AJCC^{7th} staging of NSCLC. The H&E stain pathological review was conducted with one of our co-author. Each pathological lymph node was defined as no metastasis carcinoma, presence of metastasis carcinoma and micrometastasis carcinoma. The micrometastasis was defined as presence of carcinoma no more than 2 mm thickness. The analysis was done together with reactive lymph node from non-malignant disease such as pulmonary infection. If the result suggested the trend of SHP1P2 methylation detection as clinical predictor to defined the micrometastasis, the further evaluation was conducted in the node negative resectable NSCLC (stage I) who not received adjuvant chemotherapy according to standard treatment in that stage. The SHP1P2 methylation detection was done according to each lymph node. The clinical and pathological data was incorporated in the analysis with SHP1P2 methylation level. The sensitivity and specificity analysis of SHP1P2 was pre-planned.

The author conducted the available pathological specimen who received curative resection at The King Chulalongkorn Memorial hospital during 2001-2007. The clinicopathological data of the patient at initial diagnosis and treatment implication along

follow-up period was collected from the original hospital records. The treatment decision, clinical assessment, baseline and interval imaging were done depend on provided physician. The primary end point was time to local recurrence or distant metastasis, measured from the date of surgery to the time of cancer-related death or censoring. The enrolled study participants were classified into 2 groups, case and control group. The study participants who had relapsed of disease earlier than 40 months of follow-up period post curative resection were classified as case group. Neither control nor case groups receive adjuvant chemotherapy or radiotherapy. The study participants who remained no evidence of disease after 40 months follow-up period after complete curative resection were classified as control group. Data for controls that were alive and had no evidence of disease at the end of the study were censored for recurrence or death. All deaths of case patients were cancer-related. The institutional review board approved the study protocol, and the remaining follow-up patient provided written informed consent to participate in the study protocol.

2.2. DNA PREPARATION

The paraffin-embedded pathological specimen was extracted according to each lymph node using QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's recommendations. Final 30 µl eluted volume was repeated second time. Quantitative DNA measurement was done by spectrophotometer. Amount of DNA concentration per cut slide was evaluated (*C*).

2.3. BISULFITE DNA PREPARATION

Even though a number of methods have been developed to detect or quantify DNA methylation, the most common technique used today remains the bisulfite conversion method.

This technique converts unmethylated cytosines into uracil. Methylated cytosines remain unchanged during the treatment. The bisulfite conversion method introduces various DNA strand breaks and results in highly fragmented single strand DNA. The degradation of DNA has been reported range between 84-96% [11]. The optimize bisulfite treatment by balancing competing goals of maintaining complete cytosine conversion and minimal DNA fragmentation was established. Bisulfite-treated DNA was conducted using EZ DNA Methylation-Gold™ kit (Zymo Research, orange, CA, USA) that combines bisulfite conversion and DNA clean up. The kit follows a protocol from Paulin et al. [12] The protocol recommended the optimal amount of 200-500 ng DNA per bisulfite treatment due to awareness of incomplete bisulfite conversion. Thus 200 nanogram of paraffin-embedded extraction DNA was used to bisulfite conversion.

2.4. QUANTITATIVE ANALYSIS OF SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION BY REAL-TIME PCR (METHYLIGHT)

This technique depends on a specific dual hybridization probe with specific reporter dye at the 5' end and quencher at the 3' end. The 5' to 3' nuclease activity of *Taq* DNA polymerase cut the probe and frees the reporter whose fluorescence is detected by a laser detector. The fluorescence is proportional to the number of copies of the amplified sequence. To perform the quantitative analysis of methylation status, the author designed distinct fluorescent-labeled probe with diverse CpG sites specific to methylated or unmethylated sequence. This method not only makes it possible to difference between methylated or unmethylated sequences but also defines the specific methylation patterns.

The PCR reaction was conducted in one reaction for assessment both methylated and unmethylated sequences to ensure a high efficiency of evaluation and decrease chance of PCR product contamination. The SHP-1 bisulfite forward and reverse primer sequences were 5'-GGT-GGA-GGA-GGG-AGA-GAT-GT -'3 and 5'-AAC-ACA-TAT-ATA-CCT-TAC-ACA-CTC-CAA-A-'3 . Methylation and unmethylation specific dual hybridization probe sequence were 5'-VIC-ACG-AAC-CCA-AAC-GAT-CCC-ACG-TAMRA-3' and 5'-FAM-CAC-ATA-CAA-ACC-CAA-ACA-ATC-CCA-CA-TAMRA-3' respectively. An absolute quantitative version of QAMA was used to calculate methylation status [13]. To generate a standard curve, 200 ng DNA was prepared in different mixing ratios of methylated and unmethylated target sequences, hela and WBC respectively prior to bisulfite modification. The standard sample set was freshly bisulfited and included in every set of real time PCR. The following ratios were prepared (methylated/unmethylated): 0/100, 10/90, 25/75, 50/50, 75/25, 90/10 and 100/0.

Real-time PCR was performed in 96-well reaction plate in duplication fashion using ABI Prism, 7700, Sequence Detection System. The relative prevalence of either the methylated or the unmethylated allele was set to index equal 1 and 0 in the case that only one fluorescence signal crossed the threshold, indicating a relative absence of the opposite target. The 83 bps PCR products were visualized by 8% acrylamide gel electrophoresis and Sybr green staining to ensure specific amplicon. Multiple non-template controls were run with every assay to ensure no contamination across reaction. Equation:

Methylation index (MI) = methylated sequence percentage from AQAMA

mSHP1P2 = methylated sequence percentage from AQAMA * C

uSHP1P2 = unmethylated percentage from AQAMA * C

Where *C* represented the concentration of paraffin-embeded tissue DNA (ng ml^{-1}), *mSHP1P2* represented the absolute among of methylated SHP1P2 (ng ml^{-1}), and uSHP1P2 represented the absolute among of unmethylated SHP1P2 (ng ml^{-1}). AQAMA represented absolute quantitative version of QAMA. C represented the amount of DNA concentration per cut slide.

These measured methylation index, absolute level of methylated SHP1P2, absolute level of unmethylated SHP1P2 and circulating DNA level parameters were further analyzed correlated with the clinical and pathological data.

2.5. STATISITCAL ANALYSIS

Mann-Whitney *U*-test was used to assess the difference between the non-parametric distributed variables. The data was expressed as median. Comparison between the groups was carried out by the χ^2 or Fisher's exact test for categorical variables. The Spearman's correlation, two-sided test with 95% confidence interval was used to assess the correlation between each variable. The receiver operative characteristic (ROC) curve analysis was done to evaluate the diagnostic potential of the SHP1P2 methylation. Furthermore, the sensitivity and specificity estimations for different thresholds of SHP1P2 methylation and AUC-ROC were carried out. The associated of risk factors with time-to-event or time-to-censoring end points was analyzed with the use of the log-rank test. The significant level of $p \leq 0.01$ with a two-sided test was used. All statistical analyses were performed using SPSS version 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, US).

CHAPTER III

RESULTS

3.1. VALIDATION OF QUANTITATIVE SHP1P2 METHYLATION OF RESECTABLE NODAL METASTASIS NON-SMALL CELL LUNG CANCER CORRELATION WITH HISTOLOGICAL RESULT AND NON-MALIGNANT CONTROL

3.1.1. PATIENT CHARACTERISTICS

To validate quantitative SHP1P2 methylation of resected intrathoracic lymph node in various condition correlate with standard H&E stain, available FFPE of participants included both nodal metastasis resectable NSCLC and reactive LN from non-malignancy was enrolled. The demographic and clinicopathological data of nodal metastasis resectable NSCLC was presented in Table 3.1. Thirty-two lymph nodes form from 5 non-malignancy conditions, pulmonary nodular amyloidosis, pulmonary aspergillosis and non-specific fibrotic scars with anthracosis, was included for SHP1P2 methylation analysis.

Table 3.1. Patient characteristic of validate SHP1P2 methylation as a potential molecular marker for micrometastasis detection

Patient characteristic	Nodal metastasis resectable NSCLC
Number of patient	10
Number for lymph node	3-26
Total lymph node for analysis	75
Sex (Male vs female)	9 vs 1
Age	50-79

Staging	
• Staging IIA	6
• Staging IIB	1
• Staging IIIA	3
Pathological type	
• Adenocarcinoma	7
• Squamous cell CA	1
• Large cell CA	2
Type of surgery	
• Lobectomy	7
• Pneumonectomy	3
Group of lymph node according to H&E review	
• No metastasis	31
• Micrometastasis	8
• Metastasis carcinoma	36

3.1.2. SHP1P2 OF NODAL METASTASIS RESECTABLE NON-SMALL CELL LUNG CANCER AND NON-MALIGNANT CONTROL

One hundred and thirty-five lymph nodes could be retrieved and amplified for SHP1P2 methylaiton. Volume of DNA which represented size of resected lymph node, SHP1P2 methylation index and absolute SHP1P2 level was shown in Table 3.2. The SHP1P2 methylation indexs represented the ratio of SHP1P2 methylation and unmethylation whereas absolute SHP1P2 represented the amount of SHP1P2 methylation per cut slide. Both SHP1P2 methylation index and absolute SHP1P2 value shown statistical significant between groups (p = 0.008 and 0.004) but not for amount of DNA per cut slide. The obvious high level of

SHP1P2 methylation index and absolute number confirm our hypothesis that this molecular marker could be represented the metastasis cancer in resected lymph node. Thus further analysis according to micrometastasis, no metastasis and reactive lymph node was done to explore the potential role of SHP1P2 methylation to detect micrometastasis. No statistical significant difference was found among 3 groups (micrometastasis, no metastasis and reactive lymph node). This might be the effect of small sample size of micrometastasis group or inadequacy of this marker to represent micrometastasis. The median value of SHP1P2 methylation of negative and reactive lymph node was 25.8 % might represent benign epithelial component such as epithelial cysts or ducts.[14] However the awareness of contamination during the process of extracted DNA was also the alternative hypothesis then in the second module we change the method to remove paraffin from the specimen.

Table 3.2 Amount of DNA per cut slide, and SHP1P2 methylation index and level corresponding to review pathological result

Group	Amount of DNA per cut slide	SHP1P2 methylation index	Absolute SHP1P2 methylation
Metastatic carcinoma (31)	1197 ng (414-6860)	51.8% (0-98)	674 ng (0-3536)
Micrometastasis (8)	1012 ng (767-8760)	20.5% (0-82)	443 ng (0-1048)
No metastasis (34)	1053 ng (408-8548)	18.4% (0-97.9)	230 ng (0-3832)
Reactive lymph node (32)	1938 ng (589-7810)	29.9% (2.9-85.3)	469 ng (57-2398)

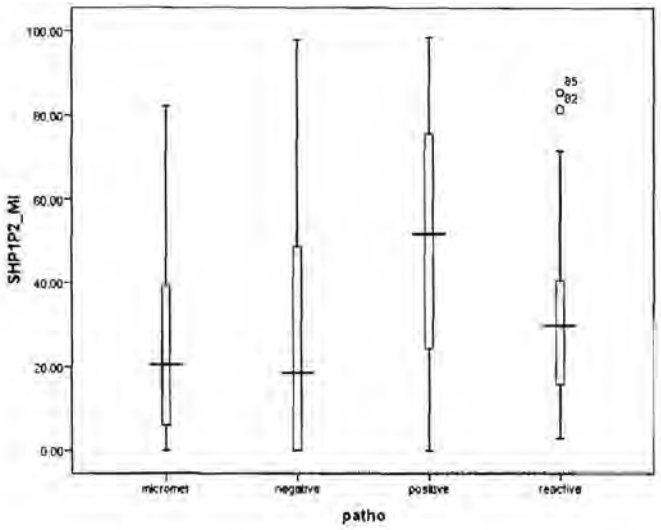

Figure 3.1. Average SHP1P2 methylation index of lymph node from module 1; resectable non-small cell lung cancer according to H&E result micrometastasis, no metastasis, presence of metastasis and reactive lymph node from benign disease

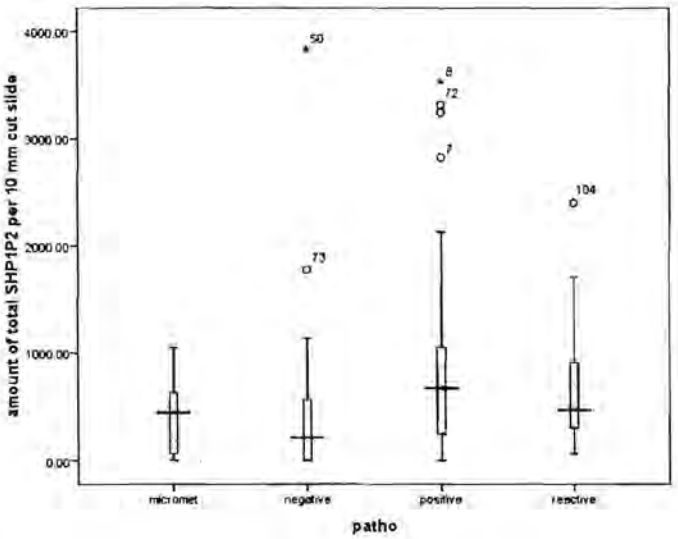

Figure 3.2. Amount of total SHP1P2 methylation per cut slide of lymph node from module 1; resectable non-small cell lung cancer according to H&E result micrometastasis, no metastasis, presence of metastasis and reactive lymph node from benign disease

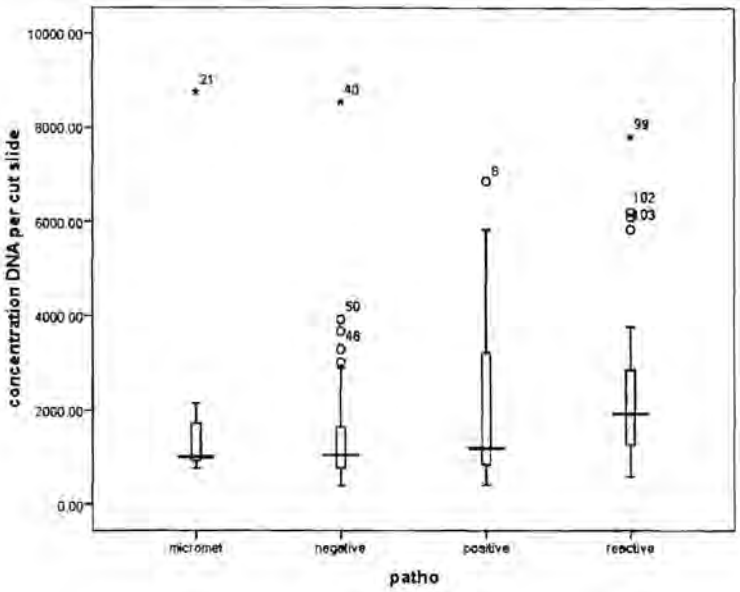

Figure 3.3. Amount of DNA per cut slide of lymph node from module 1; resectable non-small cell lung cancer according to H&E result micrometastasis, no metastasis, presence of metastasis and reactive lymph node from benign disease

3.2 QUANTITATIVE SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION OF RESECTABLE NODE NEGATIVE NON-SMALL CELL LUNG CANCER AND PROGNOSIS CORRELATION

3.2.1. PATIENT CHARACTERISTICS

Twenty-three patient who was diagnosed resectable NSCLC stage I and received curative resection in the period 2001-2007 was enrolled in this studied. Seventy percent of patient was still no evidence of disease and regular follow-up with provided physician. Median time to follow-up was 65 month (range 46-109 months). The demographic data of study participant according to group of patient in this module was shown in table 3.3.

Table 3.3. Demographic data of node negative resectable NSCLC, module 2

Patient characteristic of resectable node negative NSCLC	Early-relapsed < 40 month (case)	No relapsed within 40 month (control)	*p*-value
Number of patient	7	16	
Total lymph node for analysis	42 (range 3-13)	156 (range 1-22)	NS
Sex (Male vs female)	6 vs 1	9 vs 7	NS
Age	62 (55-78)	61.5 (49-80)	NS
Initial staging by physician provider • Stage IA • Stage IB	 2 (28.6%) 5 (71.4%)	 7 (43.7%) 9 (56.2%)	NS
Revised 7th AJCC Staging • Stage IA • Stage IB • Stage IIA	 2 (28.6%) 3 (42.9%) 2 (28.6%)	 7 (43.7%) 9 (56.2%) 0	NS
Pathological type • Adenocarcinoma • Squamous cell CA • Large cell CA • BAC	 5 (71.4%) 0 0 2 (28.6%)	 11 (68.8%) 2 (12.5%) 0 1 (2%)	NS
Tumor differentiation • Grade I • Grade II • Grade III	 4 (57.1%) 2 (28.6%) 1 (14.3%)	 9 (56.2%) 3 (18.8%) 4 (25%)	NS
Primary tumor size	Median 5 cms (2-11.5)	Median 2.5 cms (1.5-5.7)	p =0.02
Margin status			

• Bronchial margin • Pleural margin	Positive 0 % Positive 28.6%	Positive 0 % Positive 31.2%	NS
Type of surgery • Lobectomy • Pneumonectomy • Bilobectomy	 6 (71.4%) 1 (14.3%) 1 (14.3%)	 12 (75%) 0 4 (25%)	 NS
Group of lymph node for analysis according to anatomical site • N1 • N2	 100% 42.9%	 100% 81.2%	 NS

3.2.2. SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION OF RESECTABLE NODE NEGATIVE NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Available 198 lymph nodes form resected specimen of the patient in module 2 were further studied. SHP1P2 methylation amplification was successfully done in one hundred ninety-three lymph nodes. Table 3.4. shown amount of DNA per cut slide, SHP1P2 methylation index and absolute amount of SHP1P2 according to group of patients.

The amount of DNA per cut slide and absolute SHP1P2 methylation was significant difference. The larger size of lymph node which represented by higher amount of DNA per cut slide was found in case compare with control group. Absolute SHP1P2 methylation but not for SHP1P2 methylation index in case group was significant higher than control group ($p<0.001$). The component of lymph node containing micrometastasis might influence by size. This could reflect that SHP1P2 methylation could represent occult metastasis in resected lymph node and could be potential marker to predict high risk relapsed of disease.

Table 3.4 Amount of DNA per cut slide, SHP1P2 methylation index and absolute SHP1P2 methylation of resectable NSCLC module 2 according to relapse-free survival

	Early-relapsed < 40 month (case)	No relapsed within 40 month (control)	*p*-value
Amount DNA per cut slide	1213 (range 63-14313)	479 (range 14-17136)	< 0.001
SHP1P2 methylation index	10.26 (range 0-45)	6.63 (range 0-61.35)	0.2
Absolute SHP1P2 methylation	138 (range 0-963)	13.41 (range 0-1337)	< 0.001

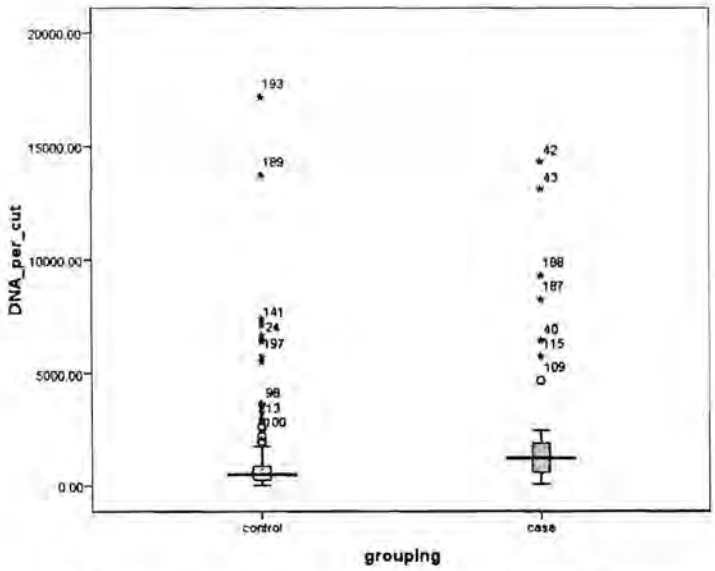

Figure 3.4. Amount of DNA per cut slide of resected lymph node of stage I NSCLC according to group of patient (case vs control)

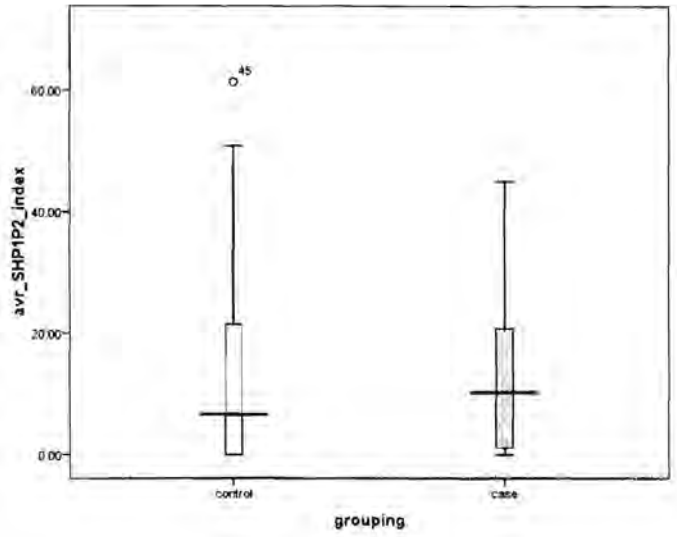

Figure 3.5. SHP1P2 methylation index of resected lymph node of stage I NSCLC according to group of patient (case vs control)

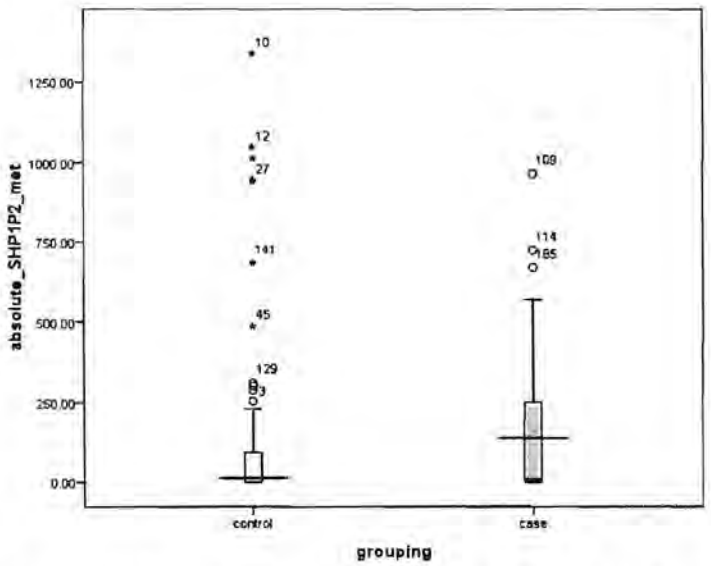

Figure 3.6. Absolute SHP1P2 methylation of resected lymph node of stage I NSCLC according to group of patient (case vs control)

3.2.3 STRATIFICATION SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION ACCORDING TO PROGNOSIS IN RESECTABLE NODE NEGATIVE NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Absolute SHP1P2 methylation is better used for detection high risk relapsed of disease in node negative resectable NSCLC than SHP1P2 methylation index. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve of absolute SHP1P2 methylation is 0.688 better than 0.564 of SHP1P2 methylation index. Only absolute SHP1P2 methylation show significant *p*-value 0.0002 contrast to SHP1P2 methylation index (p=0.2). The absolute SHP1P2 methylation level at 84 ng is the best level to determine high risk relapsed NSCLC with sensitivity 65% and specificity 73%.

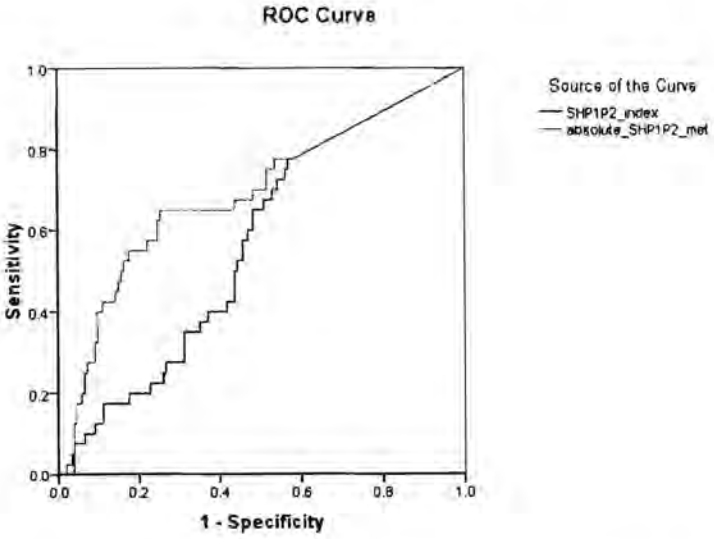

Figure 3.7. Area under the curve of SHP1P2 index and absolute SHP1P2 methylation in node negative resectable NSCLC

To evaluate potential corporation SHP1P2 methylation into clinical risk stratification, percentage of SHP1P2 methylation more than 84 ng of analyzed lymph node from resectable non-small cell lung cancer was done (figure 3.8). Containing of absolute methylated SHP1P2 more than 84 ng of more than 58% of analyzed lymph node could predict the high risk of patient with the sensitivity 71% and specificity 99% (HR 0.43-1.04; p=0.07).

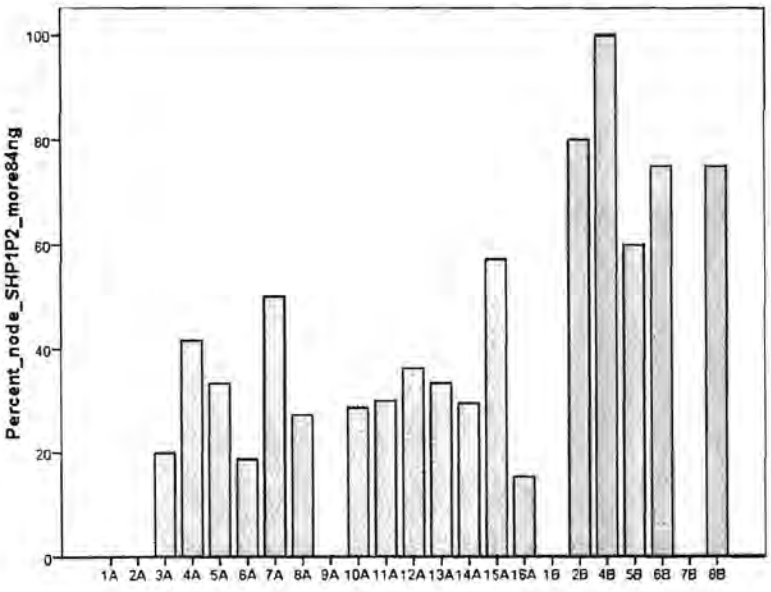

Figure 3.8. Percentage of absolute SHP1P2 methylation more than 84 ng in analyzed lymph node in node negative resectable non-small cell lung cancer

CHAPTER IV

DISCUSSION

4.1. IMPACT OF DNA SAMPLE PREPARATION AND SHP1P2 METHYLATION

The significant difference ($p<0.001$) in range of SHP1P2 methylation index of combine normal reactive lymph node, negative lymph node and micrometastasis from module 1; 0-97.9% (median 25%) and node negative in module 2; 0-61.5% (median 7.6%) might be the effect of paraffin removal method from FFPE tissue. The first set of sample we used xylene solution in a jar as routine tissue paraffin removal in our pathology service [15] which might contamination with other epithelial tissue. In the second set, paraffin-embedded tissue was removed paraffin by xylene solution individual in 1.5 ml eppendorf tube as recommended by QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany). FFPE pathological specimen was microdissected to avoid contaminate from other bronchus or epithelial tissue. Potential effect of paraffin removal step and the significant different of SHP1P2 methylation across the set, the author could not use cut-off level from the first set to further analyzed data in the second set. The repeated experiment in module 1 might confirm the result of SHP1P2 methylation in resectable non-small cell lung cancer and reactive lymph node from benign condition. However analyzed data within module 1 show significant difference of SHP1P2 methylation in metastatic lymph node from carcinoma compare with reactive lymph node and no metastasis lymph node might confirm the concept of using SHP1P2 methylation for detection metastasis carcinoma. No significant difference in micrometastasis lymph node might be the effect of small sample size (n=8). The analysis according to module 2 show

significant difference of SHP1P2 methylation in high risk early relapsed and low risk group might be the detection of micrometastasis in H&E stain node negative resectable NSCLC.

4.2. SHP1P2 METHYLATION DETECTION IN NODE NEGATIVE RESECTABLE NSCLC STAGE I, THE IMPACT OF DETECTION AND THE PROBLEM OF INTERPRETATION

Containing of more than 58% of high level of absolute SHP1P2 methylation in node negative resectable stage I NSCLC show the potential risk stratification for relapsed of disease. Previous study [3] of using methylation markers, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A gene *(p16)* and H-cadherin gene *(CDH13)* to detect methylation in both tumor and mediastinal lymph nodes in stage I resectable NSCLC predict the early recurrence of disease. The promoter methylation was done by using pool tissue from each part, primary tumor, regional lymph node, mediastinal lymph node. However this might be the effect of micrometastasis or the biology of cancer. The analysis in our pilot study was done according to each lymph node as a quantitative manner. The proper number of analyzed lymph node and the cut-off value of SHP1P2 methylation should be further explored together with significant nodal station to let us know more information. Furthermore the extensive lymph node dissection might let us accurately assessment more than small number from lymph node sampling. Increasing number of study participant is warranted.

CHAPTER V

CONCLUSION

Relapsed of stage I resectable NSCLC might be the effect of micrometastasis with could not be detect with standard H&E method. Incorporate molecular marker, SHP1P2 methylation as risk stratification might detect high risk relapsed of disease. Further management such as adjuvant chemotherapy in high risk stage I NSCLC to prevent relapsed of disease is warranted.

BIBLIOGRAPHY

[1].Martini, N., M.S. Bains, M.E. Burt, M.F. Zakowski, P. McCormack, V.W. Rusch, et al., Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg. 109(1)(1995): 120-129.

[2].Potti, A., S. Mukherjee, R. Petersen, H.K. Dressman, A. Bild, J. Koontz, et al., A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 355(6)(2006): 570-580.

[3].Brock, M.V., C.M. Hooker, E. Ota-Machida, Y. Han, M. Guo, S. Ames, et al., DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. N Engl J Med. 358(11)(2008): 1118-1128.

[4].Liptay, M.J., G.A. Masters, D.J. Winchester, B.L. Edelman, B.J. Garrido, T.R. Hirschtritt, et al., Intraoperative radioisotope sentinel lymph node mapping in non-small cell lung cancer. Ann Thorac Surg. 70(2)(2000): 384-389; discussion 389-390.

[5].Zhong, W., X. Yang, J. Bai, J. Yang, C. Manegold, and Y. Wu, Complete mediastinal lymphadenectomy: the core component of the multidisciplinary therapy in resectable non-small cell lung cancer. Eur J Cardiothorac Surg. 34(1)(2008): 187-195.

[6].Tezel, C., A.A. Ersev, H. Kiral, S. Urek, A. Kosar, M. Keles, et al., The impact of immunohistochemical detection of positive lymph nodes in early stage lung cancer. Thorac Cardiovasc Surg. 54(2)(2006): 124-128.

[7].Melfi, F.M., M. Lucchi, F. Davini, A. Viti, G. Fontanini, L. Boldrini, et al., Intraoperative sentinel lymph node mapping in stage I non-small cell lung cancer: detection of micrometastases by polymerase chain reaction. Eur J Cardiothorac Surg. 34(1)(2008): 181-186.

[8].Benlloch, S., J.M. Galbis-Caravajal, C. Alenda, F.M. Peiro, M. Sanchez-Ronco, J.M. Rodriguez-Paniagua, et al., Expression of molecular markers in mediastinal nodes from resected stage I non-small-cell lung cancer (NSCLC): prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases. Ann Oncol. 20(1)(2009): 91-97.

[9].Banville, D., R. Stocco, and S.H. Shen, Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage

and exon skipping generate multiple transcripts. Genomics. 27(1)(1995): 165-173.

[10].Ruchusatsawat, K., J. Wongpiyabovorn, S. Shuangshoti, N. Hirankarn, and A. Mutirangura, SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. J Mol Med. 84(2)(2006): 175-182.

[11].Grunau, C., S.J. Clark, and A. Rosenthal, Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. Nucleic Acids Res. 29(13)(2001): E65-65.

[12].Paulin, R., G.W. Grigg, M.W. Davey, and A.A. Piper, Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. Nucleic Acids Res. 26(21)(1998): 5009-5010.

[13].de Maat, M.F., N. Umetani, E. Sunami, R.R. Turner, and D.S. Hoon, Assessment of methylation events during colorectal tumor progression by absolute quantitative analysis of methylated alleles. Mol Cancer Res. 5(5)(2007): 461-471.

[14].Julia Regazzini Spinardi, I.R.D.G., Benign Inclusions in lymph nodes. Int. J. morphol. 25(3)(2007): 5.

[15].Coura, R., J.C. Prolla, L. Meurer, and P. Ashton-Prolla, An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. J Clin Pathol. 58(8)(2005): 894-895.

APPENDICES

APPENDIX A

	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)

ชื่อโครงการวิจัย การตรวจหาภาวะเหนือพันธุกรรมของยีน *SHP-1* promoter 2 hypermethylation ในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด เพื่อตรวจการกระจายของเซลล์มะเร็งที่ตรวจไม่พบด้วยวิธีมาตรฐาน และความสัมพันธ์กับการพยากรณ์การกลับเป็นใหม่ของโรค

ผู้สนับสนุนการวิจัย ทุนรัชดาภิเษกสมโภช

<u>แพทย์ผู้ทำวิจัย</u>

ชื่อ พญ. ชนิดา วินะยานุวัติคุณ

ที่อยู่ 1873 หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ถ. อังรีดูนังต์ แขวงพระนคร เขตปทุมวัน กทม. 10330

เบอร์โทรศัพท์ที่ทำงาน 02-2564533 เบอร์มือถือ 081-9439344

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะแรกที่ได้รับการรักษาการผ่าตัด ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

<u>เหตุผลความเป็นมา</u>

มะเร็งปอดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญของประเทศไทยและทั่วโลก แม้ผู้ป่วยที่อยู่ในระยะที่หนึ่งของการดำเนินโรคที่ไม่พบการกระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองซึ่งได้รับการผ่าตัดรักษาเพื่อให้หายขาด ยังพบมีอัตราการกลับเป็นซ้ำของโรคสูงถึงเกือบ 30% ซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิต การกระจายของเซลล์มะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองปริมาณน้อยๆ ซึ่งตรวจไม่พบด้วยวิธีมาตรฐานเชื่อว่าเป็นกลไกสำคัญของการกลับเป็นซ้ำของโรค นอกเหนือจากลักษณะชีวโมเลกุลของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยของการตรวจหายีน *SHP-1* promoter 2 hypermethylation ว่าจะสามารถใช้บ่งชี้ถึงการกระจายของเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กปริมาณน้อยๆที่มีการกระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง และจะสามารถนำมาใช้พยากรณ์โรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะแรกที่ได้รับการผ่าตัดเพื่อหวังหายขาด

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ ศึกษาว่าการตรวจหาสภาวะเหนือพันธุกรรมของยีน *SHP-1* promoter 2 ในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามระยะแรกที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดเสริม จะสามารถใช้พยากรณ์โรคในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด โดยจะทำการวิจัยร่วมกับข้อมูลทางคลินิก จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย คือ 60 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติตามเกณฑ์คัดเข้า ท่านจะได้รับเชิญให้มาพบแพทย์ตามวันเวลาที่ผู้ทำวิจัยนัดหมาย คือ คลินิกเคมีบำบัด ตึกว่องวานิช ชั้น 4 เวลา 9.00-12.00 เพื่อ สอบถามประวัติที่เกี่ยวข้อง ตรวจสุขภาพร่างกายอย่างละเอียด ประเมินผลทางห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ท่านจะมาพบแพทย์ผู้รักษาร่วมในโครงการวิจัยทั้งสิ้น 1 ครั้ง

การวิจัยนี้เป็นการติดตามผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะแรกที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด ซึ่งผู้วิจัยจะทำการตรวจตัวอย่างชิ้นเนื้อต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด เพื่อศึกษาสภาวะเหนือพันธุกรรมซึ่งเดิมหมู่เมททิลของยีน *SHP-1* promoter 2 นอกจากนี้ผู้วิจัยจะทำการเก็บข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่เกี่ยวข้องร่วมด้วย

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรใช้วัคซีน หรือรับประทานยาอื่น จากการจ่ายยาโดยแพทย์อื่นหรือซื้อยาจากร้านขายยา ดังนั้นขอให้ท่านแจ้งผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับยาที่ท่านได้รับในระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากการวิจัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)

<u>การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง</u>

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

<u>ประโยชน์ที่อาจได้รับ</u>

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ไม่ได้มีผลต่อการรักษาของผู้ป่วยซึ่งได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดเพื่อหวังหายขาดซึ่งเป็นมาตรฐานการรักษาโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะแรก ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆจากการเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ แต่ผลการศึกษาที่ได้จะสามารถพัฒนาการดูแลผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะแรกต่อไป

<u>วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร</u>

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากการรักษาที่ท่านได้รับเป็นการรักษาตามมาตรฐาน โครงการวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาติดตามผลจากการรักษา

<u>ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย</u>

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านงดการใช้ยาอื่นนอกเหนือจากที่ผู้ทำวิจัยได้จัดให้ รวมถึงการรักษาอื่น ๆ เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบทันที หากท่านได้รับยาอื่นนอกเหนือจากยาที่ใช้ในการศึกษาตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านนำยาที่ใช้ในการศึกษาของท่านทั้งหมดที่เหลือจากการรับประทานมาให้ผู้ทำวิจัยทุกครั้งที่นัดหมายให้มาพบ

<u>อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย</u>

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการ

	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)

รักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ พญ.ชนิดา วินะยานุวัติคุณ ได้ตลอด 24 ชั่วโมง เบอร์ติดต่อ 081-943-9344

<u>การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย</u>

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- ท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย
- ท่านรับประทานยาที่ไม่อนุญาตให้ใช้ในการศึกษา
- ท่านตั้งครรภ์ระหว่างที่เข้าร่วมโครงการวิจัย
- ท่านเกิดอาการข้างเคียง หรือความผิดปกติของผลทางห้องปฏิบัติการจากการได้รับยาที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านแพ้ยาที่ใช้ในการศึกษา
- ท่านต้องการปรับเปลี่ยนการรักษาด้วยยาตัวที่ไม่ได้รับอนุญาตจากการวิจัยครั้งนี้

<u>การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร</u>

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้งหรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ 1873 หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ถ. อังรีดูนังต์ แขวงพระนคร เขตปทุมวัน กทม. 10330

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย (Information sheet for research participant)

<u>สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการ โดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิดลชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

APPENDIX B

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การตรวจหาภาวะเหนือพันธุกรรมของยีน *SHP-1* promoter 2 hypermethylation ในต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัด เพื่อตรวจการกระจายของเซลมะเร็งที่ตรวจไม่พบด้วยวิธีมาตรฐาน และความสัมพันธ์กับการพยากรณ์การกลับเป็นใหม่ของโรค

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

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....ที่อยู่ .....ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่ 6 พฤษภาคม 2553 และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่ไม่ได้รับค่าชดเชยนอกเหนือจากค่ารักษาพยาบาล

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

APPENDIX C

SHP-1 PROMOTER 2 METHYLATION PROBE AND PRIMER SEQUNCE

162901 agatagcccc tgtttcatag ggctgtggtg agaaaccaat cagacaaggc atgtgaacgc
162961 cattatagca cagcgcccgg catccagcag gactcactcg atgacagttg tcaccgccat
163021 cattgttatt agcgtgggcc agggagggct gcgtaaaagc agctggtgga ggagggagag
163081 atgccgtggg accgtctggg ttcgcatgcg tgaagtatta tctgggcctg gagtgtgcaa
163141 ggcacacatg tgtccttact gcatgtgttg tcacatatgt gcaatgccat gctcctgagc

REAL-TIME PCR PROBE AND PRIMER

Methylation sequence

agatagTTTTt gtttTatagggTtgtggtgagaaaTT aatTagaTaaggTatgtgaaCGT
TattatagTaTagCGTTCGgTatTTagTaggaTtTaTtCGatgaTagttgtTaTCGTTat
TattgttattagCGtgggTTagggagggTtgCGtaaaagTagTt **ggtggaggagggagag**
atgT CGtgggaTCGtTtgggttCGTatgCGtgaagtattatTtggg**TT**tggagtgtgTaa
ggTaTaTatgtgtTT ttaTtgTatgtgttgtTaTatatgtgTaatgTTatgTtTTtgagT

Unmethylation sequence

TattgttattagTGtgggTTagggagggTtgTGtaaaagTagTt **ggtggaggagggagag**
atgT TGtgggaTTGtTtgggttTGTatgTGtgaagtattatTtggg **TT**tggagtgtgTaa
ggTaTaTatgtgtTT ttaTtgTatgtgttgtTaTatatgtgTaatgTTatgTtTTtgagT

T = **END FORWARD PRIMER**
TT = **END REVERSE PRIMER**

SHP1TAQF 5`-ggTggAggAgggAgAgATgT-3`
SHP1TAQR 5`-AACACATATATACCTTACACACTCCAAA-3`
RMETSHP1PROBE 5`-VIC-ACgAACCCAAACgATCCCACg-TAMRA-3`
RUNMETSHP1PROBE5`FAM-CACATACAAACCCAAACAATCCCACA-TAMRA-3`

BIOGRAPHY (I)

Name: Assistant professor Virote sriuranpong; principle investigator

Position: Medical instructor, Division of medical oncology, Department of internal medicine, Chulalongkorn University and The King Chulalongkorn Memorial Hospital

Education:

1984-1990 Doctor of Medicine (honored), Chulalongkorn University, Thailand
1990-1994 Diploma of Internal Medicine, Thai Medical Council, Thailand
1994-1996 Fellow in Medical Oncology, Chulalongkorn University, Thailand
1997-2001 Ph.D. in Cellular and Molecular Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, US
2001-2003 Visiting Fellow, Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD, US

Professional Experiences:

1990-1994 House Physician, Department of Medicine, Cholburi Hospital, Ministry of Public Health, Thailand
1996-2005 Instructor in Internal Medicine and Medical Oncology, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
2004-present Chief, Medical Oncology Unit, Department of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
2004-2008 Academic Affairs, Thai Society of Clinical Oncology
2008-present Vice Minister, Thai Society of Clinical Oncology
2008-present Committee Member, Academic Affairs, the Royal College of Thai Physicians
2005-present Assistant Professor in Internal Medicine and Medical Oncology, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Award and Honor:

1997-2001 Royal Thai Government Scholarship
2000 AACR-AFLAC, Inc. Scholars in Cancer Research in 91st AACR Annual Meeting
2005-2007 Recipient of the MUA-TRF New Researcher Grant, from the Ministry of University Affairs and the Thailand Research Funds.
2008-2010 Recipient of the MUA-TRF Mid-level Researcher Grant, from the Ministry of University Affairs and the Thailand Research Funds.

Professional Society Memberships:

Member, Thai Medical Council
Member, Royal College of Physician, Thailand
Member, Thai Society of Clinical Oncology
Member, American Society of Clinical Oncology

BIOGRAPHY (II)

Name : Associate professor Poonchavist Chantranuwat; Co-investigator
Position : Medical Instructor, Department of Pathology, Chulalongkorn University and The King Chulalongkorn Memorial Hospital

Education

1996 Doctor of Medicine (M.D.) Faculty of Medicine Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Postgraduate Training

1996 Diploma in clinical sciences, Faculty of medicine, Chulalongkorn university, Bangkok, Thailand

1999 Diplomate of Thai Board of Anatomic Pathology, Chulalongkorn University, certified by The Medical Council, Thailand

2003 Certificate one year visiting fellowship, Cardiovascular and Pulmonary Pathology, Department of Pathology and Laboratory Medicine, David Geffin School of Medicine, at University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

Appointment:

1996-1999: Residency training in anatomic pathology, Department of Pathology, faculty of medicine , Chulalongkorn university Hospital, Bangkok, Thailand

1996-1999: Instructor in pathology, Department of Pathology, faculty of medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

1998-2001: Lecturer in Pathology, Department of Pathology, faculty of medicine , Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

2002-2003: Visiting fellow in cardiovascular and pulmonary pathology, Department of Pathology and Laboratory Medicine, David Geffin School of Medicine, at University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

2002-2006: Assistant professor, Department of Pathology, faculty of medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

2006 to present: Associated professor, Department of Pathology, faculty of medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Memberships:

1996 to present: Member of The Medical Council, Thailand

1999 to present: Member international Academy of Pathology (IAP, Thailand division)

2002 to present: Member of Royal college of Pathologists of Thailand

Grants Awarded:

1. Ratchadapiseksompotch fund year 2004, No. 10: Comparative study of polymerase chain reaction for diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis on pappanicolaou-stained needle aspirated smear
2. Ratchadapiseksompotch fund year 2004, No. 16: Prevalence of COX-2 in epithelial ovarian cancer.

BIOGRAPHY (III)

Name : Chanida Vinayanuwattikun; Co-investigator
Position : Medical Instructor, Division of Medical oncology, Department of Medical Oncology, The King Chulalongkorn Memorial Hospital

Office address : Division of medical oncology, Department of medicine
4th floor Wongvanij building, Chulalongkorn Hospital, Bangkok
E-mail: nutechu@gmail.com

Education

1994-2000	Faculty of Medicine Siriraj Hospital Medical School, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Postgraduate Training

2008-2011	PhD Candidate, Biomedical Sciences Graduate Program, Chulalongkorn University
2006-2008	Fellowship of Medical Oncology, Siriraj Hospital, Mahidol University
2003-2006	Residency of internal medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital
2000-2003	Internship of internal medicine division, Rajchaburi Hospital,Thailand

Certification and Licensure

2008	ECFMG certification, USA Certification of Medical Oncology, Thailand Certification of attendance, 'SCT: standard course in clinical trials by Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
2006	Certificate of Internal Medicine, Thailand
2004	Certificate of Postgraduate Clinical Medical Sciences, Mahidol University, Thailand
2000	Certificate of Medical Licensure, Thailand