

การศึกษาถึงความชุกของการตรวจพบระดับของสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์โมโซมชนิดที่ 1 ที่
ปรากฏในพลาสมาผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดที่เซลล์ไม่เกิดระยะลุกลาม



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

prevalence of plasma non-tumor-derived circulating DNA originated from T-cell
lymphocyte presenting in advanced non-small cell lung cancer

Mr. Bowon Weerasubpong



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

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาถึงความชุกของการตรวจพบระดับของสาร
พันธุกรรมอิสระจากเซลล์มิโทไซด์ชนิดที่ 1 ที่ปรากฏในพ
ลาสมาผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดที่เซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม

โดย

นายบวร วีระสีบพงศ์

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ดร. แพทย์หญิง ชนิดา วินะยานุวัตติคุณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง ปวีณา สุสันฐิตพงษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ดร. แพทย์หญิง ชนิดา วินะยานุวัตติคุณ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ โอบาส พุทธเจริญ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(แพทย์หญิง ณิชญา ตริฎิโรเตช)

บวร วีระสืบพงศ์ : การศึกษาถึงความชุกของการตรวจพบระดับของสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที ที่ปรากฏในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดที่เซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม (prevalence of plasma non-tumor-derived circulating DNA originated from T-cell lymphocyte presenting in advanced non-small cell lung cancer) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ดร. พญ. ชนิตา วินะยานุวัติกุล, หน้า.

ที่มา: circulating cell free DNA ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กมีความสำคัญในแง่การเป็นปัจจัยพยากรณ์โรค โดยที่มาของ circulating cell free DNA มาจากทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งอื่นๆ การศึกษานี้จึงทำขึ้นเพื่อตอบคำถามเรื่องแหล่งกำเนิดของ circulating cell free DNA ที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็ง ว่ามาจาก T cell หรือไม่

วิธีการศึกษา: ทำการตรวจ T cell derived circulating cell free DNA จากพลาสมาของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม มาทำการตรวจ semiquantitative PCR โดยตรวจหา VDJ segment gene ของ T cell โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาความชุกของการตรวจพบ T cell derived circulating cell free DNA นอกจากนี้ยังมีการเอาชิ้นเนื้อมาทำการตรวจ tumor-infiltrating lymphocyte โดยย้อมดู CD3 เพื่อหาความสัมพันธ์กับ T cell derived circulating cell free DNA และปัจจัยอื่นๆ รวมทั้งอัตราการรอดชีวิตโดยรวมของผู้ป่วย

ผลการศึกษา: ผู้ป่วยทั้งสิ้น 106 คน ตรวจพบระดับของ T cell derived circulating cell free DNA โดยพบมีความชุกเท่ากับร้อยละ 73 และไม่พบว่า T cell derived circulating cell free DNA มีความสัมพันธ์ กับ CD3 positive TIL นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนระหว่าง T cell derived circulating cell free DNA ต่อRPP30 มีแนวโน้มที่จะเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคในแง่ของอัตราการรอดชีวิตโดยรวม อีกทั้งจากการวิเคราะห์ multivariate เพื่อดูความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยพบว่า การสูบบุหรี่มีความสัมพันธ์กับ ระดับของ T cell derived circulating cell free DNA คือ ผู้ป่วยที่สูบบุหรี่จะตรวจพบระดับของ T cell derived circulating cell free DNA น้อยกว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผล: พบว่ามี T cell derived circulating cell free DNA เป็นส่วนหนึ่งของ circulating cell free DNA ที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กจริง

ภาควิชา อายุรศาสตร์ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2560

5974071030 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: CIRCULATING CELL FREE DNA / NSCLC / TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTE

BOWON WEERASUBPONG: prevalence of plasma non-tumor-derived circulating DNA originated from T-cell lymphocyte presenting in advanced non-small cell lung cancer. ADVISOR: CHANIDA VINAYANUWATTIKUN, pp.

background: circulating cell-free DNA which was associated with prognosis in lung cancer patient derived from both tumor and non-tumor cell. In this study, we investigated the association of T cell- derived circulating cell free DNA in plasma of advanced stage non-small cell lung cancer patient with tumor-infiltrating lymphocyte. Methods: semi quantitative PCR with VDJ segment of T cell primer was used to detect T cell- derived circulating cell free DNA in plasma of 106 patients diagnosed with advanced stage non-small-cell lung cancer. Tissue sample were used to evaluate tumor-infiltrating lymphocyte and correlation with T cell- derived circulating cell free DNA level and survival were analyzed. Results: T cell- derived circulating cell free DNA was detected in 73% of patients. Correlation was not found between T cell- derived circulating cell free DNA level and tumor-infiltrating lymphocyte level. From multivariable analysis, smoking status was the only factor which had correlation with T cell- derived circulating cell free DNA level($P<0.001$). Overall survival was not statistically significant different between high and low level of T cell- derived circulating cell free DNA. Conclusion: from our study, T cell might be one of the origins of non-tumor- derived circulating cell free DNA in advanced stage non-small-cell cancer patients.

Department: Medicine

Student's Signature

Field of Study: Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมายไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ชนิดา วินะยานุวัตติคุณ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย ที่ช่วยให้คำแนะนำ ช่วยปรับปรุงแก้ไข ให้ข้อคิด และแนะแนวความคิดให้สามารถไปต่อยอดทำต่อได้และขอขอบพระคุณคณาจารย์หน่วยมะเร็งวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ ทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษาในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณพยาบาลประจำหน่วยมะเร็งวิทยาทุกท่าน ที่คอยเป็นธุระในการเจาะเลือดผู้ป่วยและหาที่เก็บเลือด รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือเรื่องการทำ PCR รวมทั้งช่วยให้ความรู้พื้นฐาน แนวทางการทำ ให้คำแนะนำในการทำ และเทคนิคในการทำแต่ละขั้นตอน รวมถึงการแปลผลลัพธ์ที่ได้

ทางผู้วิจัยรู้สึกทราบบ้างในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือรวมถึงผู้ป่วยที่ให้ความร่วมมือในงานวิจัยทุกท่าน

สุดท้ายนี้ต้องขอขอบพระคุณทั้งบิดามารดา และพี่น้องที่คอยให้กำลังใจในการทำงานมาโดยตลอด รวมถึงเพื่อนๆของผู้วิจัยทุกคนที่ได้ให้การช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอดเช่นกัน

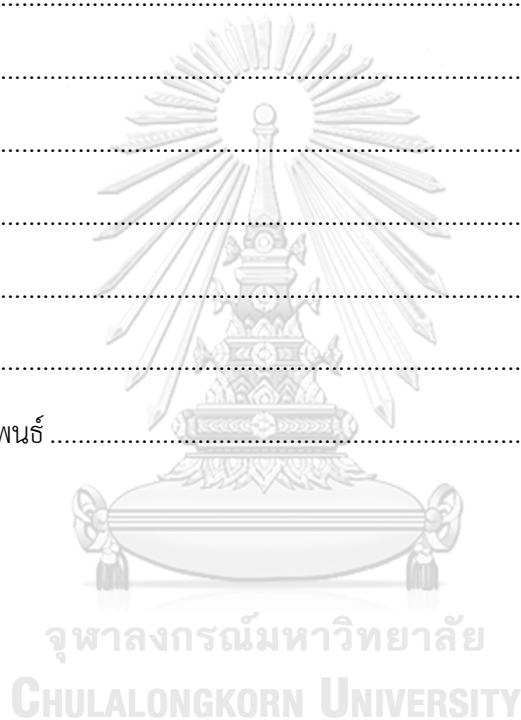
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale).....	1
1.2 คำถามของการวิจัย (Research question).....	6
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)	6
1.4 สมมติฐาน (hypothesis).....	7
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (conceptual framework).....	7
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (assumption).....	7
1.7 คำสำคัญ (keywords).....	7
1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในงานวิจัย (operational definition).....	8
1.9 รูปแบบการวิจัย (research design).....	8
1.10 วิธีการศึกษาวิจัยโดยย่อ	8
1.11 ปัญหาทางจริยธรรม.....	9
1.12 ข้อจำกัดทางการวิจัย (limitations).....	10
1.13 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (expected benefit and application) .	10
1.14 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการการแก้ไข (obstacles and strategies to solve the problems).....	10

บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม	12
1 Cancer immunity.....	12
2 circulating cell free DNA in cancer patient.....	16
3 Tumor-infiltrating lymphocyte	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	22
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design).....	22
3.2 ระเบียบการวิจัย (Research methodology).....	22
3.2.1 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample).....	22
3.2.2 เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมการศึกษา (Inclusion criteria).....	22
3.2.3 เกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria).....	22
3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง	23
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน	23
3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	26
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	26
3.7 การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and Time schedule).....	28
3.8 งบประมาณ (Budgets)	29
3.9 สถานที่ทำวิจัย (Venue of the Study).....	29
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	30
4.1 คุณลักษณะของประชากรในการศึกษา.....	30
4.2 T cell-derived circulating cell free DNA and tumor infiltrating lymphocyte.....	31
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNAและปัจจัยต่างๆ.....	35
4.4 วิเคราะห์ปัจจัยต่างๆกับอัตราการรอดชีวิต	38
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	42

5.1 อภิปรายผล	42
5.2 จุดแข็งของการวิจัย	45
5.3 สรุปผลการศึกษา	47
5.4 ข้อเสนอแนะ	47
.....	49
รายการอ้างอิง	49
ภาคผนวก ก	54
ภาคผนวก ข	56
ภาคผนวก ค	57
ภาคผนวก ง.....	58
ภาคผนวก จ	59
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	63



สารบัญตาราง

ตาราง 1 ตารางแสดงรายชื่อและsequence ของ primer ในการศึกษาของ Robins et al.....	19
ตาราง 2 แสดงระยะเวลาการดำเนินการวิจัย.....	28
ตาราง 3 แสดงค่าใช้จ่ายโดยประมาณในการวิจัย	29
ตาราง 4 แสดงคุณลักษณะพื้นฐานของประชากรที่นำมาศึกษา.....	32
ตาราง 5 แสดงคุณลักษณะพื้นฐานของประชากรที่นำมาศึกษา โดยแบ่งเป็นกลุ่มตามระดับของ อัตราส่วนระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNA ต่อ ระดับ RPP30	33
ตาราง 6 แสดงการวิเคราะห์ univariate และmultivariate ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับระดับT cell-derived circulating cell free DNA	38
ตาราง 7 แสดงผลการวิเคราะห์การรอดชีวิตสัมพันธ์กับปัจจัยต่างๆโดยวิธี log rank test	39

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิ 1 แสดงแนวทางการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะ	5
แผนภูมิ 2 แสดงกรอบแนวความคิดของการวิจัย	7
แผนภูมิ 3 แสดงการขั้นตอนการดำเนินการศึกษา และจำนวนผู้ป่วยในแต่ละขั้นตอน.....	31
แผนภูมิ 4 แสดงการกระจายตัวของ ระดับ T cell derived cell free DNA ซึ่งกระจายตัวแบบไม่เป็นปกติ(non-normal distribution)	34
แผนภูมิ 5 แสดงการกระจายตัวของ ระดับ RPP30 ซึ่งกระจายตัวแบบไม่เป็นปกติ(non-normal distribution).....	34
แผนภูมิ 6 แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่างค่าTIL ในกลุ่มของระดับT cell-derived circulating cell free DNAต่ำและสูง	36
แผนภูมิ 7 แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่างค่า non neutrophil WBC ในกลุ่มของระดับT cell-derived circulating cell free DNAต่ำและสูง	36
แผนภูมิ 8 แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่างค่า TIL ในกลุ่มของสัดส่วนระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNAและ RPP30 ต่ำและสูง.....	37
แผนภูมิ 9 แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่างค่า TIL ในกลุ่มของสัดส่วนระหว่าง RPP30 ต่ำและสูง.....	37
แผนภูมิ 10 Kaplan-Meier survival curve แสดงอัตราการรอดชีวิตภาพรวมของผู้ป่วยทุกคนในการศึกษา นี้ โดยมีmedian overall survival อยู่ที่ 10.5 เดือน	39
แผนภูมิ 11 Kaplan-Meier survival curve แสดงอัตราการรอดชีวิตภาพรวมเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีค่าระดับT cell-derived circulating cell free DNAต่ำ และสูง ..	40
แผนภูมิ 12 Kaplan-Meier survival curve แสดงอัตราการรอดชีวิตภาพรวมเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีค่าระดับTIL ต่ำ และสูง	41
แผนภูมิ 13 Kaplan-Meier survival curve แสดงอัตราการรอดชีวิตภาพรวมเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีสัดส่วนระหว่างระดับ T cell-derived circulating cell free DNA และ ระดับ RPP30 ต่ำ และสูง	41

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

PCR	polymerase chain reaction
TIL	tumor- infiltrating lymphocyte
Cir cfDNA	circulating cell free DNA
OS	overall survival
PFS	progression free survival
ORR	objective response rate
EGFR	epidermal growth factor receptor
ALK	anaplastic lymphokinase



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

มะเร็งปอดเป็นมะเร็งที่พบบ่อยมากเป็นอันดับที่สี่ในประเทศไทย มีจำนวนผู้ป่วยรายใหม่อยู่ที่ร้อยละ 10 ของมะเร็งทั้งหมด รองจากมะเร็งเต้านม มะเร็งตับและท่อน้ำดี และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ตามข้อมูลของทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล ปี2558(1) ซึ่งถ้าจำแนกตามเพศแล้ว พบว่าในเพศชายจะพบเป็นลำดับที่สาม ในขณะที่เพศหญิงจะพบเป็นลำดับที่สี่ โดยที่ถ้าจำแนกตามระยะที่พบเมื่อแรกวินิจฉัยจะพบว่าระยะที่สี่พบบ่อยมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 67.6 ของผู้ป่วยรายใหม่ทั้งหมด ซึ่งเป็นระยะที่มีการแพร่กระจายของตัวโรคแล้ว โอกาสที่จะรักษาแล้วหายขาดค่อนข้างน้อย ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของการรักษา จึงเป็นการรักษาในแง่บรรเทาอาการ(palliative aim) ซึ่งการรักษาหลักคือการให้ยาเคมีบำบัดหรือยากลุ่มอื่นๆที่ออกฤทธิ์ทั้งร่างกาย (systemic treatment) โดยที่การรักษาอื่นๆ ได้แก่ การผ่าตัด หรือการฉายแสง จะเป็นการรักษาเสริมเท่านั้น

ในแง่การรักษามะเร็งปอดในระยะแพร่กระจายหรือระยะที่สี่นั้น การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดเป็นการรักษามาตรฐานมาตั้งแต่ในอดีต โดยมาตรฐานคือการให้ยาเคมีบำบัดกลุ่มแพลตตินัม(platinum) ซึ่งที่มีข้อมูลการใช้แล้วมีประโยชน์คือ cisplatin หรือ carboplatin ร่วมกับการให้ยาเคมีบำบัด อีกหนึ่งชนิด ได้แก่ gemcitabine pemetrexed paclitaxel ฯลฯ (2-4) ซึ่งตามข้อมูลของ metanalysis โดย non-small cell lung cancer collaborative group(5) พบว่าการให้การรักษาแบบประคับประคองร่วมกับการให้เคมีบำบัด ให้ผลการรักษาในแง่ของเพิ่มอัตราการรอดชีวิต ได้มากกว่าการรักษาแบบประคับประคองเพียงอย่างเดียว โดยลดความเสี่ยงในการเสียชีวิตร้อยละ 27 ระยะเวลาโดยเฉลี่ยที่ผู้ป่วยครึ่งหนึ่งจะเสียชีวิตในกลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัด(median overall survival) เท่ากับ 9 เดือน เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้แต่การรักษาประคับประคอง ซึ่งเท่ากับ 3 เดือน(4, 6)

นอกจากการใช้เคมีบำบัด ในปัจจุบันก็มีการตรวจยีนกลายพันธุ์ อาทิ EGFR mutation, ALK rearrangement เป็นต้น ซึ่งในกรณีที่ผู้ป่วยตรวจแล้วพบว่ามีกลายพันธุ์บางชนิดที่จำเพาะต่อการให้ยาพุ่งเป้า(targeted therapy) ก็จะสามารถให้ยาพุ่งเป้าในการรักษาได้ เช่น EGFR tyrosine kinase inhibitor, ALK inhibitor เป็นต้น ซึ่งตามการศึกษา

หลายการศึกษาพบว่าการใช้ยาพุ่งเป้าดังกล่าว ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ก็จะให้ผลการรักษาในแง่ของการชลอการเติบโตมะเร็งได้ดีกว่ากลุ่มที่ให้ยาเคมีบำบัด(7, 8) ซึ่งการรักษาด้วยยาพุ่งเป้าจึงเป็นการรักษามาตรฐานในปัจจุบัน ในกรณีที่ผู้ป่วยตรวจพบว่ามีการกลายพันธุ์ที่จำเพาะกับการใช้ยา แต่เนื่องจากในการใช้ยาพุ่งเป้า จะมีเพียงผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์เท่านั้นที่ใช้ยาแล้วจะมีโอกาสตอบสนองสูง ดังนั้นจึงมีการวิจัยเพื่อหาตัวชี้วัดทางโมเลกุล(molecular biomarker) เช่นการตรวจ EGFR mutation จากชิ้นเนื้อมะเร็ง หรือ จาก cell free DNA ในพลาสมา หรือการตรวจหา ALK rearrangement ในชิ้นเนื้อมะเร็ง เป็นต้น มากขึ้นในปัจจุบัน เพื่อให้การรักษามะเร็งเป็นไปในลักษณะที่จำเพาะกับมะเร็งของผู้ป่วยแต่ละคนมากที่สุด (personalized medicine) ซึ่งจะทำให้การรักษามีประสิทธิภาพสูงที่สุด และได้รับผลข้างเคียงจากการรักษาที่ไม่จำเป็นให้น้อยสุด เป็นประโยชน์สูงสุดต่อผู้ป่วยนั่นเอง

ในปัจจุบัน circulating cell free DNA ได้เข้ามามีบทบาทในแง่ตัวชี้วัดทางโมเลกุล (Biomarker) ในหลายด้านโดยเฉพาะในทางมะเร็งวิทยา โดยนำมาประยุกต์ ใช้ในแง่ของ diagnostic, predictive และ prognostic biomarker (9) โดยที่มีการศึกษา พบว่าระดับของ circulating cell free DNA (cir-cfDNA) ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งมีระดับสูงกว่าในบุคคลทั่วไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (10) ทำให้เกิดการศึกษาดูมาอีกหลายการศึกษาเรื่องต้นกำเนิดของ circulating cell free DNA ซึ่งส่วนหนึ่งพบว่ามีต้นกำเนิดมาจากสารพันธุกรรมเซลล์มะเร็ง (tumor-derived cir-cfDNA) (11) นอกจากนั้นยังพบว่าระดับของ tumor-derived cir-cfDNA ที่สูงนั้นมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิต (overall survival) ที่สั้นลงและระยะเวลาการควบคุมโรค (Progression-free survival) ที่สั้นลง ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิดที่เซลล์ไม่เล็กระยะลุกลาม (12) ในแง่ของการศึกษาเรื่อง cir-cfDNA ในส่วนที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งนั้น นั้น มีความเป็นไปได้ที่จะมาจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่รอบๆก้อนมะเร็ง อาทิ เซลผนังเยื่อหลอดเลือด (endothelial cell) หรือ เซลเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด อาทิ ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) แมคโครฟาจ (Macrophage) เป็นต้น โดยจากการศึกษาของ Vinayanuwattikun C et al. พบว่านอกจากระดับของ tumor-derived cir-cfDNA แล้ว ระดับของ non-tumor-derived cir-cfDNA ซึ่งมีจุดกำเนิดมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวก็มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามอีกด้วย (13)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนายากระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย เพื่อใช้ควบคุมโรคมะเร็ง (immunomodulating therapy) อาทิ anti PD1/PDL-1 Antibody blockage หรือ anti CTLA-4 Antibody blockage ในการรักษามะเร็ง โดยเริ่มศึกษาวิจัยในมะเร็งผิวหนังชนิด เม็ดสี (malignant melanoma) และต่อมาได้มีการศึกษาวิจัยในมะเร็งชนิดอื่นๆซึ่งรวมถึง มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก โดยศึกษาประสิทธิภาพทั้งในการรักษาเป็นสูตรแรก (First-line treatment) (14) หรือให้การรักษาเป็นสูตรที่สอง (15, 16) ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีใน ประชากรบางกลุ่ม ทั้งนี้ได้มีการศึกษาวิจัยในแง่ตัวชี้วัดชีวโมเลกุลควบคู่กันเพื่อใช้พยากรณ์ ผู้ป่วยที่ได้ประสิทธิภาพในการรักษาสูงสุด ที่มีข้อมูลอยู่บ้างได้แก่ การยับยั้ง PD-L1 > 50% ในชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการรักษาด้วยยา pembrolizumab (14) แต่มีลักษณะความไม่สอดคล้องของผลการตอบสนองการรักษาต่อกลุ่มผู้ป่วยที่ย้อมไม่ติด PD-L1 ซึ่งทำให้นักวิจัยยังมีการศึกษาเพื่อพัฒนาตัวชี้วัดชีวโมเลกุลที่สัมพันธ์กับประสิทธิภาพของ ยาได้ดีกว่าการยับยั้ง PD-L1 ในชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วย

ในการศึกษาเรื่องปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิต (prognostic factors) ของ ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กนั้น มีการศึกษามากมายและมีปัจจัยมากมายที่มีผล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวผู้ป่วย ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรักษา และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวโรคเอง ซึ่งหนึ่งในปัจจัยที่มีการศึกษากันมากขึ้นในปัจจุบันคือ เซลล์ลิมโฟไซต์ในก้อนมะเร็ง (tumor infiltrating lymphocyte, TIL) โดยการศึกษาแต่ละ การศึกษามีทั้งที่ให้ผลไปในทางเดียวกัน และขัดแย้งกัน อาทิ การศึกษาจาก *Wakabayashi O. et al.*(17) ซึ่งทำการศึกษา TIL ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก และพบว่าในผู้ป่วยที่ ชิ้นเนื้อมะเร็งมีการตรวจพบเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ติดการย้อมสี CD8 จำนวนมาก โดยพบอยู่ใน ตำแหน่งของภายในก้อนมะเร็ง (tumor nest) จะสัมพันธ์กับภาวะการรอดชีวิตที่ลดลงเมื่อ เทียบกับกลุ่มที่พบการติดสีน้อยกว่า ในทางตรงกันข้ามการที่ตรวจพบมีเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ติด การย้อมสี CD4 ทั้งในบริเวณของก้อนมะเร็ง และstromal area จะสัมพันธ์กับอัตราการรอด ชีวิตที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่พบการติดสีน้อยกว่า ในทางตรงกันข้าม การศึกษาจาก *Hiraoka K. et al.*(18) ทำการศึกษาค้นคว้า คือ เอาชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ ไม่เล็ก มาทำกันย้อมศึกษา TIL ด้วย CD4 แล CD8 โดยผลพบว่าในผู้ป่วยที่ตรวจพบว่าชิ้นเนื้อ มีเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ย้อมติดสีของ CD4 แล CD8 จำนวนมาก จะสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ ดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่พบการย้อมติดสีน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม มีการศึกษาเป็น metanalysis โดย *Gooden MJM. et al.*(19) ซึ่งทำการวิเคราะห์เอาการศึกษาที่ดูเรื่องของ ความสัมพันธ์ระหว่าง TIL และอัตราการรอดชีวิต โดยผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยที่ตรวจพบมี เซลล์ลิมโฟไซต์ที่มีการติดสี CD3 แล CD8 จำนวนมาก จะสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่

ดีกว่า ดังนั้นจากการศึกษาที่กล่าวถึงจะพบว่า เซลล์ทีโพไซต์ชนิด T ได้แก่ เซลล์ที่ย้อมติดสี CD3 CD4 หรือ CD8 มีความสัมพันธ์ในแง่การเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคที่สัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

ในแง่ของต้นกำเนิดของ non tumor-derived circulating cell free DNA ในปัจจุบัน ยังไม่มีการศึกษาที่สามารถสรุปถึงแหล่งที่มาได้อย่างชัดเจน การศึกษาจาก *Stroun M. et al.* ได้กล่าวว่า ต้นกำเนิดของ circulating cell free DNA สามารถเกิดได้จากหลายกระบวนการ อาทิ การถูกทำลายของ circulating tumor cell, การ necrosis หรือ apoptosis ของก้อนมะเร็ง หรือเป็นการหลั่ง DNA เข้ามาในกระแสเลือดโดยตรง ซึ่งอาจจะมาจากเซลล์มะเร็งหรือ เซลล์ทีโพไซต์ก็ได้ ซึ่งการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro study) พบว่าลิโพไซต์จากคนปกติที่ไม่มีการกระตุ้นใดๆ สามารถที่จะหลั่งสารพันธุกรรม ออกมาอยู่ในสิ่งแวดล้อมรอบตัวมันเองได้ (spontaneous release)(21, 22) จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดจึงเป็นที่มาของผู้วิจัยที่ตั้งสมมติฐานว่า ชีววิทยาของ non-tumor-derived cir-cfDNA ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กน่าจะมีต้นกำเนิดมาจากลิโพไซต์ การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้น เพื่อจะศึกษาเรื่องของความชุก(prevalence) ของการตรวจพบ non-tumor-derived cir-cfDNA โดยมุ่งศึกษาเรื่องของ เซลล์ทีโพไซต์ชนิดที ในแง่ของการเป็นต้นกำเนิดของ non-tumor-derived cir-cfDNA ของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลาม ความสัมพันธ์ของระดับ non-tumor-derived cir-cfDNA กับระยะเวลาการรอดชีวิต และความเป็นไปได้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเซลล์ทีโพไซต์ชนิดทีในแง่การเป็นตัวชี้วัดชีวโมเลกุลต่อไป



แผนภูมิ 1 แสดงแนวทางการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะ4(ดัดแปลงจากแนวทางการรักษาESMO(20))

1.2 คำถามของการวิจัย (Research question)

คำถามหลัก(primary research question)

ความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์มิโทไคโตซันดที่ ในสารพันธุกรรมอิสระในส่วนที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลามเท่ากับร้อยละ50 หรือไม่

คำถามรอง (secondary research question)

- 1) ระดับของสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์มิโทไคโตซันดที่ ที่ปรากฏในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลามเป็นตัวชี้วัดทางโมเลกุลในการพยากรณ์โรคโดยสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิตหรือไม่
- 2) สัดส่วนของเซลล์มิโทไคโตซันดที่ในก้อนมะเร็ง(TIL) สัมพันธ์ กับระดับของสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์มิโทไคโตซันดที่ ที่ปรากฏในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลามหรือไม่
- 3) สัดส่วนของเซลล์มิโทไคโตซันดที่ในก้อนมะเร็ง(TIL) เป็นตัวชี้วัดทางโมเลกุลในการพยากรณ์โรคโดยสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิตหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อศึกษาหาความชุกของการตรวจหาสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์มิโทไคโตซันดที่ ในสารพันธุกรรมอิสระในส่วนที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม

วัตถุประสงค์รอง

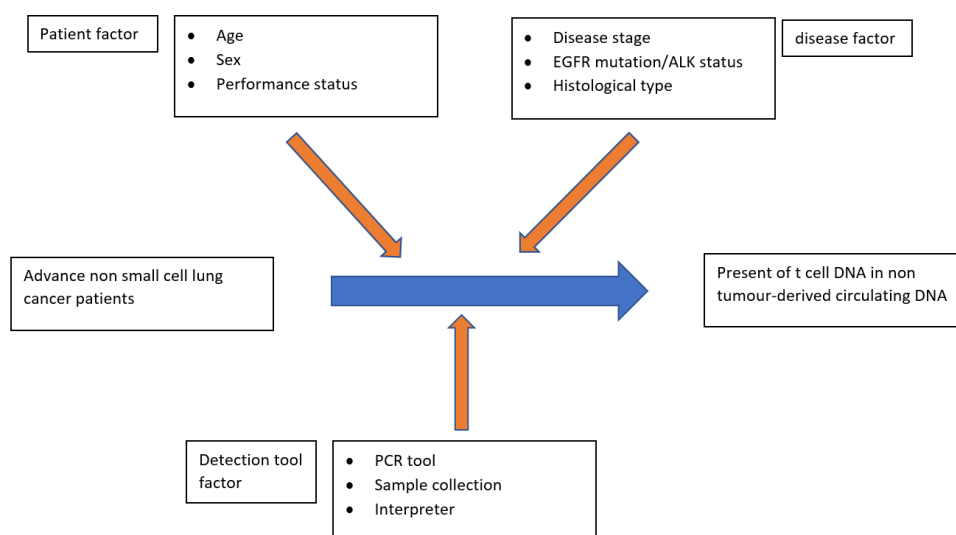
- 1) เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระดับของสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์มิโทไคโตซันดที่ ที่ปรากฏในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลามและบทบาทความเป็นตัวชี้วัดทางโมเลกุลในการพยากรณ์โรค โดยหาความสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิต
- 2) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของเซลล์มิโทไคโตซันดที่ในก้อนมะเร็ง(TIL) สัมพันธ์ กับระดับของสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์มิโทไคโตซันดที่ ที่ปรากฏในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม
- 3) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของเซลล์มิโทไคโตซันดที่ในก้อนมะเร็ง(TIL) ในการเป็นตัวชี้วัดทางโมเลกุลในการพยากรณ์โรคโดยสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิต

1.4 สมมติฐาน (hypothesis)

H0: ตรวจพบความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมจากเซลล์มะเร็งชนิดที่จากส่วนประกอบสารพันธุกรรมอิสระที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม น้อยกว่าร้อยละ 50

H1: พบความชุกของการตรวจพบสารพันธุกรรมจากเซลล์มะเร็งชนิดที่จากส่วนประกอบสารพันธุกรรมอิสระที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งในพลาสมาของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (conceptual framework)



แผนภูมิ 2 แสดงกรอบแนวความคิดของการวิจัย

1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (assumption)

- 1) ผู้ป่วยต้องได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม ที่ยังไม่ได้รับการรักษาด้วยยา กลุ่มเคมีบำบัด ยาออกฤทธิ์เฉพาะจุดหรือยากุ่ม immunotherapy มาก่อน ณ จุดที่ทำการศึกษา
- 2) การตรวจเลือดจะต้องทำการตรวจโดยเครื่องมือที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เท่านั้น

1.7 คำสำคัญ (keywords)

Circulating DNA

Non-small cell lung cancer

T cell lymphocyte

Tumor infiltrating lymphocyte

Non tumor-derived circulating cell free DNA

1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในงานวิจัย (operational definition)

ระยะเวลาการรอดชีวิต (overall survival) หมายถึงระยะเวลาของผู้ป่วยนับตั้งแต่เข้าร่วมการศึกษาวิจัยที่มีชีวิตรอดจากการเสียชีวิตจากทุกสาเหตุ ทั้งที่เกี่ยวกับตัวโรค การรักษา หรือไม่เกี่ยวข้อง

1.9 รูปแบบการวิจัย (research design)

เป็นการศึกษาเชิง retrospective cohort study โดยคณะผู้วิจัยจะร่วมกันทำการเก็บตัวอย่างชีววัตถุอันได้แก่ส่วนประกอบของเลือดและข้อมูลพื้นฐาน การรักษา และผลการรักษาของอาสาสมัครโดยใช้แบบเก็บข้อมูล (Clinical record from; CRF) ดังเอกสารแนบโดยเป็นการเก็บข้อมูลไปข้างหน้า

1.10 วิธีการศึกษาวิจัยโดยย่อ

อาสาสมัครที่มีอายุมากกว่า 18 ปี ขึ้นไป จะได้รับการพิจารณาตามเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้า รวมถึงไม่ตรงตามเกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษาจะถูกเชิญชวนให้เข้าร่วมการศึกษาวิจัย

กระบวนการขอความยินยอม (Informed consent) นั้น โดยผู้วิจัยหรือผู้ช่วยวิจัยจะเป็นทั้งผู้ให้ข้อมูลคำอธิบายวัตถุประสงค์ วิธีการที่จะปฏิบัติต่ออาสาสมัคร ประโยชน์และความเสี่ยง รวมถึงตอบข้อสงสัย และจะให้เวลาตัดสินใจโดยอิสระ ก่อนลงนามให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย ภายหลังจากอาสาสมัครให้ความยินยอม ผู้วิจัยหรือผู้ช่วยวิจัยจะดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 15 ml (เทียบเท่า 1 ซ้อนโต๊ะ) โดยทำการเก็บในโอกาสเดียวกับที่อาสาสมัครเจาะเลือดเพื่อทำการให้น้ำเกลือก่อนการวินิจฉัยหรือรักษา แล้วนำไปปั่นเพื่อแยกเฉพาะส่วน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการตรวจต่อไป การตรวจหาสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์ิมโฟไซต์ชนิดทีในพลาสมา จะทำโดยใช้ QX200™ Droplet Digital™ PCR System โดยใช้ลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่จำเพาะ V-D-J segment ของ T-cell receptor beta chain กับเซลล์ิมโฟไซต์ชนิดที

ในการนำเอาซีรัมมาศึกษา เริ่มโดยการนำตัวอย่าง circulating DNA ใน plasma ที่ได้ปั่นแยกไว้และเก็บไว้หน้านั้น มาผสมเข้ากับน้ำยาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่

1. 10 μ l of 2X Taqman[®] universal PCR master mix
2. 0.4 μ l of 10 μ M TCR β variable (V) forward primer
3. 0.4 μ l of 10 μ M TCR β joining (J) reverse primers
4. 0.4 μ l of 10 μ M TCR β variable Taqman probes
5. 0.4 μ l of 10 μ M RPP30 primer and probe
6. 4 μ l of plasma-circulating DNA samples

จากนั้นนำน้ำที่ผสมไว้ของแต่ละกลุ่มตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR โดยทำเทียบกับ standard T cell DNA เพื่อเป็น standard curve ในการทำการคำนวณหาปริมาณของ DNA ในตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR เครื่องจะทำการคำนวณ และแปลผลออกมาเป็นจำนวนรอบ(cycle) ของการทำ PCR ที่ทำให้เกิดการดูดซับแสงตามค่าที่กำหนดไว้ จากนั้นนำมาคำนวณกลับเป็นจำนวน copy DNA ตาม standard curve ซึ่งจะทำการคำนวณโดยเครื่อง PCR โดยในแต่ละตัวอย่างจะทำการตรวจตัวอย่างละ 2 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย เพื่อลดค่าคลาดเคลื่อนจากเครื่องมือและตัวผู้ทดสอบ จากนั้นอ่านผลโดยผู้วิจัยแล้วนำค่าที่ได้ ไปคำนวณตามคำถามการวิจัยที่ตั้งไว้ต่อไป

ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์ิมโฟไซต์ชนิดที่ ๑ นี้ ผู้วิจัยขอเก็บตัวอย่างเลือดที่เหลือภายหลังการศึกษาวิจัยในถังบรรจุชีวภัณฑ์แช่แข็งที่ใช้ในโตรเจนเหลวที่ห้องปฏิบัติการ 713 ชั้น 7 อาคารแพทยพัฒน์ โดยทำการเก็บตัวอย่างดังกล่าวเป็นระยะเวลา 20 ปี

ในการศึกษาครั้งนี้จะดำเนินการเก็บข้อมูล และศึกษาทั้งในแง่ของการรักษาและผลการรักษา ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2555 จนถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2560 โดยให้คำจำกัดความว่าคนที่เกิดเหตุการณ์ก่อนจุดเวลานั้นว่า “เหตุการณ์” เช่น การเสียชีวิต หรือการก้าวหน้าของโรค และให้คำจำกัดความว่าคนที่ไม่เกิดเหตุการณ์เมื่อถึงจุดเวลานั้นว่า “เซนเซอร์” เพื่อนำไปประกอบในการคำนวณเรื่องความสัมพันธ์กับช่วงเวลาการรอดชีวิตและช่วงเวลาการไม่มีการก้าวหน้าของโรคต่อไป โดยการสุ่มตัวอย่างนั้น ใช้วิธี nonprobability sampling แบบ accidental sampling

1.11 ปัญหาทางจริยธรรม

ครอบคลุมหลักจริยธรรมการวิจัยในคน 3 ข้อ ได้แก่

- 1) หลักความเคารพในบุคคล (respect for person) คือ ผู้วิจัยจะให้ข้อมูลอย่างครบถ้วน จนกว่าอาสาสมัครจะมีความเข้าใจในโครงการวิจัยเป็นอย่างดีและตัดสินใจอย่างอิสระในการให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย และผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้เข้าร่วมในการวิจัย โดยในแบบบันทึกข้อมูลและทะเบียนข้อมูลพื้นฐานจะไม่สามารถระบุถึงตัวผู้เข้าร่วมในการวิจัยได้
- 2) หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ และไม่มีความเสี่ยงเพิ่มเติมต่อตัวอาสาสมัครในการเจาะเลือดเนื่องจากเป็นขั้นตอนการตรวจ และ/หรือรักษาตามมาตรฐานโรคนั้นๆ ของอาสาสมัครอยู่แล้ว
- 3) หลักความยุติธรรม (Justice) คือมีเกณฑ์การคัดเลือกเข้าและออกชัดเจน มีการกระจายความเสี่ยงและผลประโยชน์อย่างเท่าเทียมกัน

1.12 ข้อจำกัดทางการวิจัย (limitations)

เทคนิคการศึกษาหาสารพันธุกรรมอิสระของ T-cell lymphocyte เป็นเทคนิคที่มีความยาก เนื่องจากลำดับสารพันธุกรรมมีความหลากหลาย และเนื่องจากปริมาณสารพันธุกรรมในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กอาจมีปริมาณไม่มากพอ จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิค QX200™ Droplet Digital™ PCR System ซึ่งอาจเกิดผลบวกหลงได้

1.13 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย (expected benefit and application)

บทความทางวิชาการในระดับนานาชาติคาดว่าจะอย่างน้อยจะสามารถตีพิมพ์ในวารสาร Asian Biomedicine นอกจากนี้ยังเป็นการศึกษาเพื่อทราบองค์ความรู้ใหม่ ทำให้ทราบถึง biology ของ non-tumor-derived circulating DNA ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลาม อาจจะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อการศึกษาต่อในแง่ของการเป็นตัวชี้วัดทางโมเลกุลในการทำนายผลการรักษาจากยาในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunotherapy)

1.14 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการการแก้ไข (obstacles and strategies to solve the problems)

จำนวนอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการอาจไม่เพียงพอและอาจเกิดลักษณะของผลบวกหลงจากการทดสอบ ผู้วิจัยมีการวางแผนแก้ไขโดยอาจขยายเวลาในการรวบรวมอาสาสมัครมากขึ้น และควบคุมความถูกต้องทางห้องปฏิบัติการโดยมีการทดสอบกับตัว

ควบคุมที่เป็นลบ (negative control) โดยใช้สารพันธุกรรมจากเซลล์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่เซลล์ิมโฟไซต์



บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of related literatures)

1 Cancer immunity

ในปัจจุบันการศึกษาเรื่องภาวะภูมิคุ้มกันกับโรคมะเร็งมีความก้าวหน้ามากขึ้น เพื่อความเข้าใจและการพัฒนาเกี่ยวกับรักษาที่ดีขึ้น โดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแบ่งได้ดังนี้

- 1) Innate immunity ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีนคอมพลีเมนต์ (complement protein) และเซลล์ที่เกี่ยวข้อง เช่น NK cell, dendritic cell เป็นต้น โดยระบบนี้ทำหน้าที่เป็นด่านแรกในการจัดการกับสิ่งแปลกปลอม มีความรวดเร็ว แต่จะขาดความจำเพาะเจาะจง
- 2) Adaptive immunity ประกอบไปด้วยสองระบบ คือ humoral immune response และ cell mediated immune response ซึ่งจะใช้เวลาในการกระตุ้นมากกว่า แต่จะมีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมสูง

โดยที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย เช่น เชื้อโรคต่างๆ รวมไปถึงเซลล์มะเร็งด้วย แต่อย่างไรก็ตาม มะเร็งแต่ละชนิดก็มีความสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงตัวเอง ทำให้เกิดกระบวนการบางอย่างที่จะทำให้สามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้แม้ว่าคนๆนั้นจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานปกติก็ตาม

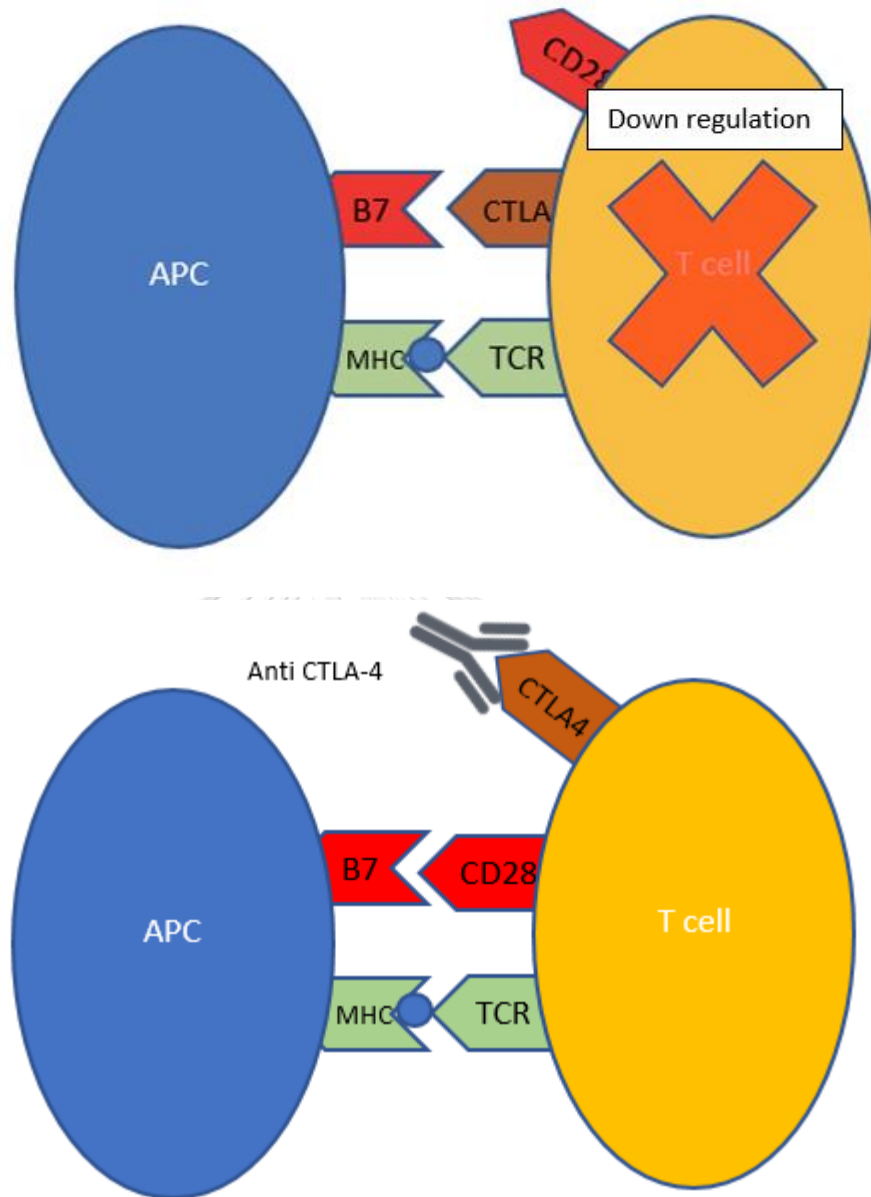
Cancer immunity cycle เป็นวัฏจักรการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ทำต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีความสำคัญในแง่การนำไปประยุกต์ เพื่อการผลิทยาмаใช้ในการปรับภูมิเพื่อรักษา มะเร็งได้ โดยในวัฏจักรดังกล่าวนี้ ประกอบด้วย

- 1) Priming phase เมื่อเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกของ antigen บางชนิดที่แปลกปลอม ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะรับรู้ โดยมีเซลล์ เรียกว่า antigen presenting cell ทำการจัดการและนำเสนอ antigen ดังกล่าวผ่านทาง MHC molecule จากนั้นเซลล์จะเดินไปที่ต่อมน้ำเหลือง และที่นี้เอง antigen presenting cell จะทำการนำเสนอ antigen นี้ให้กับ T cell ร่วมกับ co-stimulatory signal คือ สัญญาณจาก B7 family protein บน antigen presenting cell เพื่อจับกับ CD28 บน T cell ทำให้ T cell ถูกกระตุ้น

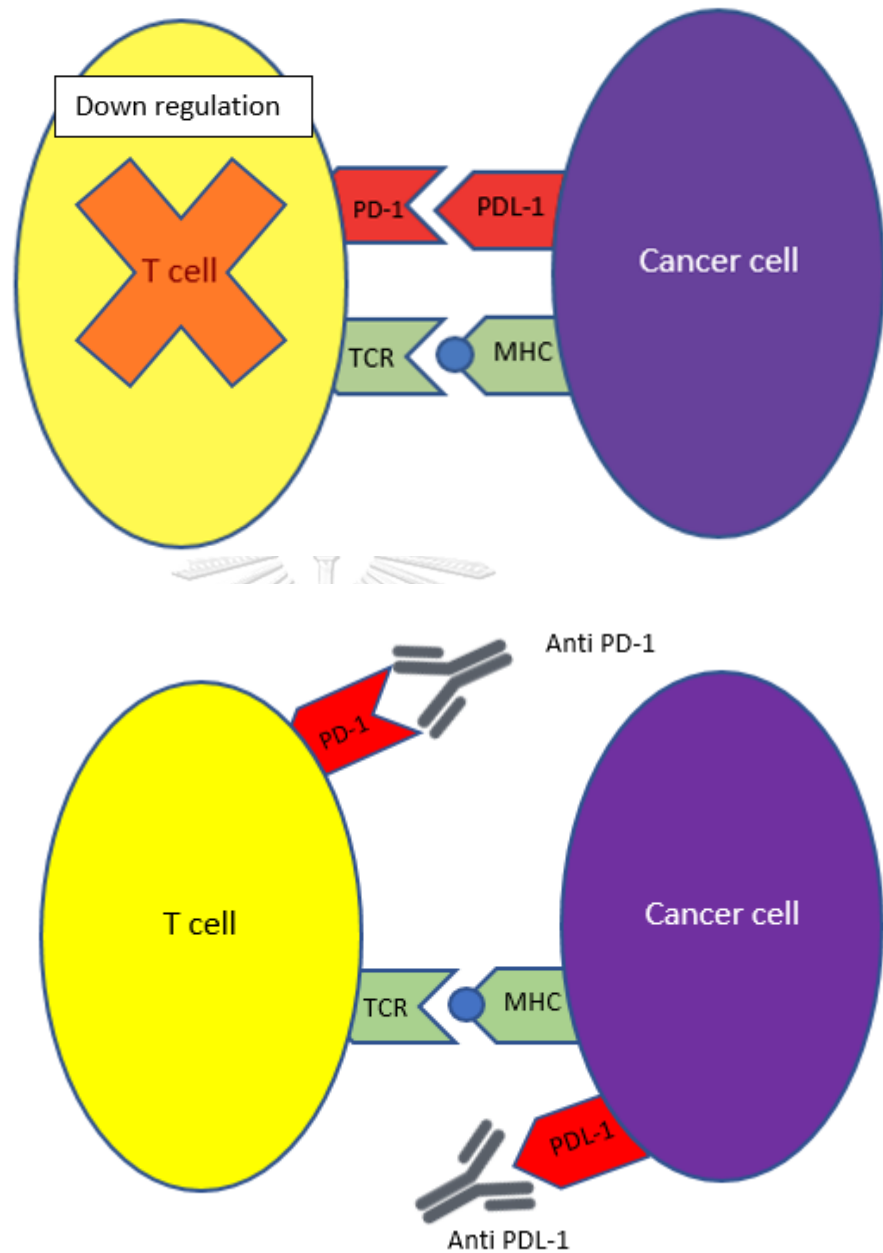
2) Effector phase เมื่อ T cell ถูกกระตุ้น ก็จะเดินทางไปยังตำแหน่งที่มีเซลล์มะเร็งอยู่ จากนั้นก็จะจับกับเซลล์มะเร็งและทำลายเซลล์มะเร็งในที่สุด

อย่างไรก็ตาม ร่างกายก็จะมีกระบวนการยับยั้งการกระตุ้น T cell เพื่อไม่ให้ T cell ถูกกระตุ้นมากเกินไป จนเกิดภาวะ autoimmune reaction ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเป็นภาวะปกติของร่างกาย แต่ในทางกลับกัน มะเร็งบางชนิดสามารถใช้กระบวนการเดียวกันนี้ในการทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถไปทำลายมะเร็งได้ รวมถึงวิธีการอื่นๆที่จะยับยั้งไม่ให้ระบบภูมิคุ้มกันมาทำลาย เช่น การนำเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็น immunosuppression ได้แก่ regulatory T cell, myeloid-derived suppressive cell เป็นต้น เข้ามาอยู่ในตำแหน่งก่อนมะเร็ง

ปัจจุบันในแง่ของการรักษาด้วยการใช้ยากระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) มีหลายกลไกในการออกฤทธิ์และมีใช้ในปัจจุบัน เช่น anti-CTLA4 ซึ่งจะทำงานที่ priming phase โดยจะไปจับกับ CTLA4 บน T cell ทำให้ไม่สามารถไปจับกับ B7 molecule ได้ จึงทำให้ B7 สามารถจับกับ CD28 ได้มากขึ้นและสามารถกระตุ้น T cell เพื่อไปทำลายมะเร็งได้มากขึ้น หรือ anti PD-1/antiPDL-1 ที่ทำงานใน effector phase โดยไปจับที่ PD-1 หรือ PDL-1 ทำให้ T cell สามารถถูกกระตุ้นเพื่อไปทำลายมะเร็งต่อไปได้ เป็นต้น(23, 24)



รูป 1 แสดง priming phase ของ cancer immunity cycle ภาพบนเมื่อมีการกระตุ้น T cell จนถึงระดับหนึ่ง จะเกิด negative feedback โดยการแสดงออกของ CTLA4 บน T cell ไปจับกับ B7 บน antigen presenting cell ทำให้ยับยั้งการทำงานของ T cell, ภาพล่าง เมื่อให้ยา anti CTLA-4 จะไปแย่งจับกับ CTLA-4 บน T cell ทำให้ยังคงเกิดการกระตุ้น T cell ต่อไป จนทำให้ภูมิคุ้มกันสามารถไปทำลายเซลล์มะเร็งได้



รูป 2 แสดง effector phase ของ cancer immunity cycle ภาพบน เมื่อเซลล์มะเร็งสร้าง PDL-1 จะสามารถไปจับกับ PD-1 receptor บน T cell ซึ่งจะทำให้การทำงานของ T cell ถูกยับยั้ง, เมื่อให้ ยาเข้าไป ได้แก่ anti PD-1 ซึ่งจะไปจับกับ PD-1 receptor หรือ anti PDL-1 ซึ่งจะไปจับกับ PDL-1 ligand ซึ่งยาทั้งสองชนิดนี้จะทำให้สัญญาณการยับยั้งการทำงานของ T cell หายไป ทำให้การ กระตุ้นการทำงานของ T cell ยังเกิดต่อเนื่อง เพื่อไปทำลายเซลล์มะเร็งต่อไป

2 circulating cell free DNA in cancer patient

จากการศึกษาของ *Sirera, et al.*(12) ได้ทำการศึกษาเรื่องของระดับ circulating DNA โดยใช้ free human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) เป็นตัวแทนของ circulating DNA ในผู้ป่วยวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก เพื่อดูความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่โรคลุกลาม (time to tumor progression:TTP) และระยะเวลาการรอดชีวิตโดยรวม (overall survival:OS) โดยผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับ *hTERT* ก่อนการรักษา มะเร็งที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 49.8 ng/ml จะมี median TTP และ OS 6.3 และ 10.9 เดือน ตามลำดับ ในขณะที่ ผู้ป่วยที่มีระดับ *hTERT* ก่อนการรักษา มะเร็งมีค่ามากกว่า 49.8 ng/ml จะมี median TTP และ OS 4.9 และ 9.3 เดือน ตามลำดับ โดยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.001, 0.012) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าระดับของ circulating DNA ที่สูงขึ้น (ซึ่งจากการศึกษาวัดโดยใช้ *hTERT* เป็นตัวแทน) สัมพันธ์กับระยะเวลาที่โรคลุกลามที่เร็วขึ้น และระยะเวลาการรอดชีวิตที่ลดลง

ในแง่ของการเป็น biomarker ของ circulating DNA ในผู้ป่วยวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กนั้น มีการศึกษามากมายที่ให้ผลทั้งไปในทางเดียวกันและขัดแย้งกัน โดยมีการศึกษาในลักษณะเป็น meta-analysis ของ *Zongbi Yi, et al.*(25) นำเอาการศึกษาที่ดู circulating DNA ในผู้ป่วยวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะต่างๆ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 9 การศึกษา ได้จำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 1170 คน นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ circulating DNA กับการรอดชีวิตโดยรวม (overall survival) ซึ่งผลการศึกษาพบว่าระดับ circulating DNA ที่สูงขึ้น มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คิดเป็น hazard ratio = 1.57 โดยความสัมพันธ์นี้จะเห็นได้ชัดเจนมากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นระยะ 3 และ 4 ทำให้เห็นว่าระดับของ circulating DNA มีความสำคัญในแง่การเป็นปัจจัยบ่งชี้พยากรณ์โรคของผู้ป่วยวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

ในแง่ของแหล่งกำเนิดของ circulating DNA เชื่อว่ามาจากเซลล์มะเร็งเองปล่อยสารพันธุกรรมเข้ามาในกระแสเลือดจากกลไกต่างๆกัน แต่หลังจากนั้นก็มีการศึกษาของ *Vinayanuwattikun et al.*(13) ได้ทำการศึกษาเรื่องระดับของสารพันธุกรรมที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์อื่นๆที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งที่ปรากฏอยู่ในกระแสเลือด (non tumor-derived circulating DNA) กับความสัมพันธ์ในแง่การเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลาม โดยจากผลการศึกษาพบว่า ระดับของ non tumor-derived circulating DNA ซึ่งใช้การตรวจดู unmethylated *SHP1* Promoter 2 (unmethylated *SHP1P2*) เป็นตัวแทน มีระดับที่สูงกว่าคนทั่วไปที่ไม่ได้เป็นมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

และระดับของ non tumor-derived circulating DNA สัมพันธ์กับการพยากรณ์ระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยถ้าระดับของ unmethylated SHP1P2 สูงขึ้น จะพบว่าระยะเวลาการรอดชีวิตภาพรวมจะน้อยลง จากข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าทั้งระดับของ cir-cfDNA ทั้งหมด และระดับของ non tumor-derived circulating DNA นั้น ก็มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่วินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

ในแง่ของแหล่งกำเนิดของ non tumor-derived circulating DNA นั้น ยังไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่ามีแหล่งกำเนิดมาจากที่ใด ซึ่งจากการศึกษาเดียวกันของ *Vinayanuwattikun et al. (13)* ได้ตั้งสมมติฐานว่าอาจมีแหล่งกำเนิดมาจาก circulating leukocyte โดยได้ทำการศึกษา โดยการดูความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับของ non tumor-derived circulating DNA และระดับของ circulating leukocyte ซึ่งพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน จึงทำให้ยังไม่สามารถสรุปถึงแหล่งกำเนิดที่ชัดเจนของ non tumor-derived circulating DNA

ต่อมาในการศึกษาเกี่ยวกับแหล่งกำเนิดของ non-tumor-derived circulating DNA นั้น ก็ได้มีการศึกษาของ *Anker et al. (22)* ได้ทำการศึกษาเพื่อหาข้อสนับสนุนเรื่องการพบว่าสารพันธุกรรมนอกเซลล์ (extracellular DNA) จากเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ทำการเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงในห้องทดลองนั้น มีต้นกำเนิดมาจากการหลั่งออกมาจากจากเซลล์ลิมโฟไซต์เอง มากกว่าการตายของเซลล์ที่วางแผนไว้ (apoptosis) โดยผลจากการศึกษาทำให้ได้ข้อสนับสนุนเรื่อง สารพันธุกรรมนอกเซลล์มาจากการหลั่งออกมาของเซลล์ลิมโฟไซต์เพราะว่า

- 1) ปริมาณสารพันธุกรรมที่พบนั้นเท่าเดิม แม้ว่าจะเพาะเลี้ยง (incubate) เซลล์ลิมโฟไซต์ไปนานเท่าไร ซึ่งอาจจะแปลได้ว่าระดับสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้นไม่ได้สัมพันธ์กับการตายของเซลล์
- 2) อัตราการตายของเซลล์ลิมโฟไซต์ไม่ส่งผลกระทบต่อระดับของสารพันธุกรรมนอกเซลล์
- 3) ผลของ mechanical stress โดยในที่นี้คือปั่นแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ด้วยความเร็วแล้วนำกลับมาเพาะเลี้ยง ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อระดับของสารพันธุกรรมนอกเซลล์
- 4) Specific activity ของสารพันธุกรรมนอกเซลล์และในเซลล์ที่ต่างกัน อาจจะบอกได้ว่าสารพันธุกรรมนอกเซลล์ไม่ได้มาจากการที่เซลล์ตาย

จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้เป็นเหตุผลที่สนับสนุนว่า สารพันธุกรรมนอกเซลล์ที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากการที่เซลล์ลิมโฟไซต์หลั่งสารพันธุกรรมมากกว่าเกิดจากการตายของเซลล์

ในการตรวจดูเรื่องความเป็นไปได้เรื่องแหล่งกำเนิดของ non-tumor-derived circulating DNA ว่ามีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ลิมโฟไซต์หรือไม่นั้น ในการศึกษานี้นำเอาการตรวจหายีนส์ที่จำเพาะกับการตรวจหาเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที่ซึ่งก็คือ การตรวจหาลำดับเบสของ

สารพันธุกรรมบนยีนของ beta chain of TCR (VDJ segments) โดยใช้วิธีตรวจแบบ digital polymerase chain reaction (ddPCR) ซึ่งอ้างอิงมาจากข้อมูลของ *Robins et al.*(26) ซึ่งได้ทำการศึกษาเรื่องการตรวจเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งรังไข่โดยผลการศึกษา

- 1) ไม่พบลักษณะของ clonal expansion จากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยแต่ละราย
- 2) พบว่าในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ระยะที่ 3 หรือ 4 ที่มีระยะเวลารอดชีวิตที่เกิน 5 ปี จะมี average fraction of tumor-infiltrating lymphocyte ที่มากกว่าเมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคเดียวกันที่มีระยะเวลารอดชีวิตที่น้อยกว่าสองปี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเป็นไปได้ที่ fraction TIL มีความสัมพันธ์กับตัวโรคในลักษณะที่เป็นปัจจัยพยากรณ์โรคได้

จากรูปแบบการศึกษานี้ สามารถนำมาประยุกต์คือการนำเอาการตรวจ TCR beta chain ที่ตำแหน่ง VDJ segment เพื่อนำตรวจเป็นตัวแทนของ non tumor-derived circulating cell free DNA ที่มีต้นกำเนิดมาจาก T cell ซึ่งโดยในการศึกษาของ *Robins et al.* ได้ทำการตรวจ PCR โดยใช้ forward primer จาก V segment gene ทั้งสิ้นเป็นจำนวน 45 sequences ร่วมกับใช้ reverse primer เป็น J gene จำนวนทั้งสิ้น 13 sequences ดังตารางที่ 1 แต่จากผลการศึกษาที่พบว่า TIL ที่ตรวจได้นั้น ไม่พบความเป็น clonality ที่ specific กล่าวคือ ไม่ได้พบ clone ของ T cell ใดมากเป็นพิเศษ ดังนั้นจากข้อจำกัดเรื่องงบประมาณในการศึกษาของข้าพเจ้า และจากผลการศึกษานี้ ซึ่งในรายละเอียดจะพบว่า subgroup gene D พบได้ในสัดส่วนที่มากที่สุดคือประมาณ 20% จึงได้นำ gene ในกลุ่มนี้มาทำการศึกษาในการศึกษาของข้าพเจ้า ซึ่งถือว่าเป็นการศึกษาในลักษณะเป็น semiquantitative เพื่อหาถึงความเป็นไปได้ในการตรวจพบ เป็นเบื้องต้นก่อน และสามารถนำไปทำการศึกษาต่อได้ในอนาคตตามผลการทดสอบที่ได้ต่อไป

ตาราง 1 ตารางแสดงรายชื่อและsequence ของ primer ในการศึกษาของ Robins et al.

ลำดับ	ชื่อ primer	sequences									
1	V02	TTC	GAT	GAT	CAA	TTC	TCA	GTT	GAA	AGG	CC
2	V03-1	CCT	AAA	TCT	CCA	GAC	AAA	GCT	CAC	TTA	AA
3	V04-1	CTG	AAT	GCC	CCA	ACA	GCT	CTC	TCT	TAA	AC
4	V04-2/3	CTG	AAT	GCC	CCA	ACA	GCT	CTC	ACT	TAT	TC
5	V05-1	TGG	TCG	ATT	CTC	AGG	GCG	CCA	GTT	CTC	TA
6	V05-3	TAA	TCG	ATT	CTC	AGG	GCG	CCA	GTT	CCA	TG
7	V05-4	TCC	TAG	ATT	CTC	AGG	TCT	CCA	GTT	CCC	TA
8	V05-5	AAG	AGG	AAA	CTT	CCC	TGA	TCG	ATT	CTC	AGC
9	V05-6	GGC	AAC	TTC	CCT	GAT	CGA	TTC	TCA	GGT	CA
10	V05-8	GGA	AAC	TTC	CCT	CCT	AGA	TTT	TCA	GGT	CG
11	V06-1	GTC	CCC	AAT	GGC	TAC	AAT	GTC	TCC	AGA	TT
12	V06-2/3	GCC	AAA	GGA	GAG	GTC	CCT	GAT	GGC	TAC	AA
13	V06-4	GTC	CCT	GAT	GGT	TAT	AGT	GTC	TCC	AGA	GC
14	V06-5	AAG	GAG	AAG	TCC	CCA	ATG	GCT	ACA	ATG	TC
15	V06-6	GAC	AAA	GGA	GAA	GTC	CCG	AAT	GGC	TAC	AAC
16	V06-7	GTT	CCC	AAT	GGC	TAC	AAT	GTC	TCC	AGA	TC
17	V06-8	CTC	TAG	ATT	AAA	CAC	AGA	GGA	TTT	CCC	AC
18	V06-9	AAG	GAG	AAG	TCC	CCG	ATG	GCT	ACA	ATG	TA
19	V07-1	TCC	CCG	TGA	TCG	GTT	CTC	TGC	ACA	GAG	GT
20	V07-2	AGT	GAT	CGC	TTC	TCT	GCA	GAG	AGG	ACT	GG
21	V07-3	GGC	TGC	CCA	ACG	ATC	GGT	TCT	TTG	CAG	T
22	V07-4	GGC	GGC	CCA	GTG	GTC	GGT	TCT	CTG	CAG	AG
23	V07-6/7	ATG	ATC	GGT	TCT	CTG	CAG	AGA	GGC	CTG	AGG
24	V07-8	GCT	GCC	CAG	TGA	TCG	CTT	CTT	TGC	AGA	AA
25	V07-9	GGT	TCT	CTG	CAG	AGA	GGC	CTA	AGG	GAT	CT
26	V09	GTT	CCC	TGA	CTT	GCA	CTC	TGA	ACT	AAA	C
27	V10-1	AAC	AAA	GGA	GAA	GTC	TCA	GAT	GGC	TAC	AG
28	V10-2	GAT	AAA	GGA	GAA	GTC	CCC	GAT	GGC	TAT	GT
29	V10-3	GAC	AAA	GGA	GAA	GTC	TCA	GAT	GGC	TAT	AG
30	V11-1/2/3	CTA	AGG	ATC	GAT	TTT	CTG	CAG	AGA	GGC	TC
31	V12-3/4	TCG	ATT	CTC	AGC	TAA	GAT	GCC	TAA	TGC	
32	V12-5	TTC	TCA	GCA	GAG	ATG	CCT	GAT	GCA	ACT	TTA
33	V13	CTG	ATC	GAT	TCT	CAG	CTC	AAC	AGT	TCA	GT
34	V14	TCT	TAG	CTG	AAA	GGA	CTG	GAG	GGA	CGT	AT
35	V15	GCC	GAA	CAC	TTC	TTT	CTG	CTT	TCT	TGA	C

36	V16	TTC	AGC	TAA	GTG	CCT	CCC	AAA	TTC	ACC	CT
37	V18	ATT	TTC	TGC	TGA	ATT	TCC	CAA	AGA	GGG	CC
38	V19	TAT	AGC	TGA	AGG	GTA	CAG	CGT	CTC	TCG	GG
39	V20-1	ATG	CAA	GCC	TGA	CCT	TGT	CCA	CTC	TGA	CA
40	V24-1	ATC	TCT	GAT	GGA	TAC	AGT	GTC	TCT	CGA	CA
41	V25-1	TTT	CCT	CTG	AGT	CAA	CAG	TCT	CCA	GAA	TA
42	V27	TCC	TGA	AGG	GTA	CAA	AGT	CTC	TCG	AAA	AG
43	V28	TCC	TGA	GGG	GTA	CAG	TGT	CTC	TAG	AGA	GA
44	V29-1	CAT	CAG	CCG	CCC	AAA	CCT	AAC	ATT	CTC	AA
45	V30	GAC	CCC	AGG	ACC	GGC	AGT	TCA	TCC	TGA	GT

ในปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลามได้ก้าวหน้าไปจากเดิมมาก โดยตัวเลือกในการรักษามีความหลากหลายมากขึ้นและมีการศึกษาถึงการกลายพันธุ์ของตัวมะเร็งที่สามารถนำยามารักษาได้อย่างตรงจุดเรียกว่า ยาพุ่งเป้า(targeted therapy) เช่น EGFR TKI ใน ผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่ตรวจพบมีการกลายพันธุ์ของตัวรับ EGFR หรือ ยาด้าน ALK ใน ผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่ตรวจพบมีการกลายพันธุ์ของ ALK(ALK rearrangement) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำเอายากระตุ้นภูมิคุ้มกันมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม ดังข้อมูลของ *Reck M, et al.*(14) ที่ศึกษาการใช้ยา pembrolizumab เทียบกับการให้ยาเคมีบำบัด ในผู้ป่วยวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกระยะลุกลาม ที่ไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน โดยผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ได้ยา pembrolizumab ซึ่งเป็น immunotherapy ให้ประสิทธิภาพในแง่ของระยะเวลาที่ไม่มีอาการกำเริบของโรค(progression free survival) ดีกว่ากลุ่มที่ได้ ยาเคมีบำบัด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในการศึกษานี้เลือกเอา PDL-1 มาเป็น biomarker ซึ่งต้องมีการแสดงออกของ PDL-1 มากกว่า 50% แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันก็มียากระตุ้นภูมิคุ้มกัน หรือ immunotherapy ออกมาหลายชนิด รวมทั้งนำใช้สำหรับการรักษาโรคมะเร็งหลากหลายชนิด แต่ PDL-1 เองก็ไม่ได้เป็นbiomarker ที่สมบูรณ์แบบสำหรับใช้ในทุกระยะ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการพยายามศึกษาหา biomarker ใหม่ๆเพื่อนำมาใช้เป็นสิ่งที่จะคัดเลือกผู้ป่วยที่จะได้ประโยชน์จากการใช้ยามากที่สุด

3 Tumor-infiltrating lymphocyte

Tumor-infiltrating lymphocyte หรือ TIL เป็นหนึ่งในส่วนประกอบที่อยู่รอบๆ ก้อนมะเร็ง (microenvironment) ซึ่งมีการศึกษาตรวจดูเรื่อง TIL ในชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กนั้น ในลักษณะของ meta-analysis ของ *Zeng et al.* ซึ่ง

ศึกษาดูในแง่ของการเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคและปัจจัยทำนายผลการรักษา (prognostic and predictive factor) ของ TIL โดยนำเอา 24 การศึกษาที่เกี่ยวข้อง จำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 7006 คน มาทำการวิเคราะห์ ซึ่งในแต่ละการศึกษา มีการวิเคราะห์ TIL แตกต่างวิธีกันออกไป ตั้งแต่การนับด้วยการย้อม H&E หรือทำการย้อมพิเศษที่จำเพาะต่อโปรตีนบางชนิด (immunohistochemistry staining) อาทิ CD3 CD4 CD8 FoxP3 เป็นต้น โดยจากการวิเคราะห์พบว่าการย้อมด้วย CD3 ในผู้ป่วยที่ตรวจพบมีปริมาณ CD3 ในชิ้นมะเร็งเป็นจำนวนมาก จะสัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิตที่ลดลง โดยมี hazard ratio เท่ากับ 0.77 (P value = 0.009) นอกจากนั้นในการย้อมด้วย CD4 และ CD8 ก็ได้ผลลัพธ์ไปในทางเดียวกัน คือพบว่า คนที่มีปริมาณ CD4 หรือ CD8 ในก้อนมะเร็งสูง จะสัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิตที่ลดลงเช่นกัน โดยมีค่า hazard ratio เท่ากับ 0.78 และ 0.74 ตามลำดับ ในทางตรงข้าม พบว่า การมี FoxP3 ปริมาณสูงในก้อนมะเร็ง จะสัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิตที่มากขึ้น คิดเป็น hazard ratio เท่ากับ 1.69 ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงดูเหมือนว่า TIL จะเป็นปัจจัยหนึ่งที่อาจจะพยากรณ์โรคได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันก็ยังไม่มีความชัดเจนว่าการศึกษา TIL นั้น จะใช้วิธีการย้อมชิ้นเนื้ออย่างไรจึงจะเหมาะสมในการนำไปใช้ได้มากที่สุด

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการศึกษาเชิง retrospective cohort study โดยคณะผู้วิจัยจะร่วมกันทำการเก็บตัวอย่างชีววัตถุอันได้แก่ส่วนประกอบของเลือดและข้อมูลพื้นฐาน การรักษา และผลการรักษาของอาสาสมัครโดยใช้แบบเก็บข้อมูล (Clinical record from; CRF) ดังเอกสารแนบโดยเป็นการเก็บข้อมูลไปข้างหน้า

3.2 ระเบียบการวิจัย (Research methodology)

3.2.1 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

ประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ระยะลุกลาม

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study Population)

อาสาสมัครที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ระยะลุกลาม เชื้อชาติไทยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัย และรับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.2.2 เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมการศึกษา (Inclusion criteria)

- 1) ผู้ป่วยอายุมากกว่า 18 ปีขึ้นไป
- 2) วินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ในระยะลุกลาม (Stage IV) โดยมีผลการตรวจชิ้นเนื้อ (Histological diagnosis) ยืนยัน
- 3) Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status ตั้งแต่ 0-2
- 4) สามารถปฏิบัติตามระเบียบวิธีวิจัยได้และให้ความยินยอมเข้าร่วมการวิจัย
- 5) ผู้ป่วยจะต้องมี life expectancy มากกว่าหรือเท่ากับ 12 สัปดาห์
- 6) ผู้ป่วยจะต้องมีโอกาสได้รับการรักษาตามมาตรฐานของการรักษามะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ในระยะลุกลาม

3.2.3 เกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

- 1) ได้รับการรักษามะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ในระยะลุกลามมาก่อนเข้าร่วมการศึกษา
- 2) มีโรคประจำตัวเป็นโรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน (autoimmune disease)

- 3) ได้รับยาจำพวกยากดภูมิหรือsteroidที่มากกว่า 10 มิลลิกรัม ต่อวันของprednisolone หรือเทียบเท่า ภายใน 3 วันก่อนเข้าการศึกษา

3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$n = (Z^2 \times P(1 - P))/e^2$$

เป็นการคำนวณหากลุ่มตัวอย่างของการศึกษาในลักษณะเพื่อศึกษาหาความชุกของ descriptive study ซึ่งเป็นคำถามหลักของการศึกษารั้งนี้ โดยที่ยังไม่เคยมีการศึกษาในอดีตที่เคยศึกษาความชุกของการตรวจพบแบบนี้มาก่อน ดังนั้นเนื่องจากทางผู้วิจัยมีความเห็นว่าสารพันธุกรรมอิสระในส่วนใหญ่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามนั้น องค์ประกอบส่วนใหญ่น่าจะมาจากสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้นในการคำนวณหาขนาดตัวอย่าง จะขอตั้งให้

$$P = 0.5$$

Z ของค่า 95% Confidence interval ได้เท่ากับ 1.96

e ใช้ที่ 0.15

ดังนั้นจะคำนวณได้ค่าจำนวนกลุ่มตัวอย่างประชากรในการศึกษาทั้งหมดประมาณ 43 คน

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

- 1) อาสาสมัครที่มีอายุมากกว่า 18 ปี ขึ้นไปที่พิจารณาตามเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าร่วมถึงไม่ตรงตามเกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากกรวิจัยจะถูกเชิญชวนให้เข้าร่วมการศึกษาวิจัย
- 2) กระบวนการขอความยินยอม (Informed consent) นั้น โดยผู้วิจัยหรือผู้ช่วยวิจัยจะเป็นทั้งผู้ให้ข้อมูลคำอธิบายวัตถุประสงค์ วิธีการที่จะปฏิบัติต่ออาสาสมัคร ประโยชน์และความเสี่ยง รวมถึงตอบข้อสงสัย และจะให้เวลาตัดสินใจโดยอิสระ ก่อนลงนามให้ความยินยอมเข้าร่วมในการวิจัย
- 3) ภายหลังจากอาสาสมัครให้ความยินยอม ผู้วิจัยหรือผู้ช่วยวิจัยจะดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 15 ml (เทียบเท่า 1 ซ้อนโต๊ะ) ใส่เก็บไว้ในหลอด EDTA โดยทำการเก็บในโอกาสเดียวกับที่อาสาสมัครเจาะเลือดเพื่อทำการให้น้ำเกลือก่อนการวินิจฉัยหรือรักษา

- 4) นำเลือดไปปั่นเพื่อแยกเฉพาะส่วน จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการตรวจต่อไป
- 5) ขั้นตอนการปั่นแยก DNA
 1. นำเลือด EDTA 6 ml มาทำการปั่น(centrifuge)ที่ความเร็ว 1600g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนประกอบต่างๆของเลือด
 2. แยกชุดเก็บเอาเฉพาะส่วนที่เป็นพลาสมาเพื่อทำการสกัด DNA ต่อ โดยใช้พลาสมาปริมาณ 800 μ l
 3. ทำการปิเปตชุดเอาน้ำยา QIAGEN protease ปริมาณ 40 μ l ใส่ลงไป ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
 4. ดูดเอาพลาสมาปริมาณ 400 μ l ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่เตรียมไว้
 5. ใส่ น้ำยา buffer AL ปริมาณ 400 μ l ลงในหลอดเดียวกัน จากนั้นทำการ mix ด้วยเครื่อง pulse-vortexing เป็นเวลา 15 วินาที
 6. จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไป incubate ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
 7. นำเอามา centrifuge อีกเล็กน้อย
 8. จากนั้นใส่น้ำยา ethanol 96% 400 μ l เข้าไปในส่วนผสมทั้งหมด และ mix ด้วย pulse-vortexing 15 วินาที แล้วนำเป็น centrifuge อีกเล็กน้อย
 9. จากนั้นนำเอาส่วนผสมที่ได้ ใส่เข้าไปใน QIAamp Mini spin column โดยไม่ให้เลอะขอบ ปิดฝา แล้ว centrifuge ที่ 6000g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำเอา QIAamp Mini spin column ไปใส่ใน clean 2ml collection tube
 10. จากนั้นเปิด QIAamp Mini spin column แล้วใส่น้ำยา buffer AW1 500 μ l ปิดฝา แล้ว centrifuge ที่ 6000g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำเอา QIAamp Mini spin column ไปใส่ใน clean 2ml collection tube
 11. จากนั้นเปิด QIAamp Mini spin column แล้วใส่น้ำยา buffer AW2 500 μ l ปิดฝา แล้ว centrifuge ที่ 20000g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำเอา QIAamp Mini spin column ไปใส่ใน clean 2ml collection tube แล้ว centrifuge ที่ความเร็วเต็มที่ 1 นาที

12. จากนั้นนำเอา QIAamp Mini spin column ใส่ไปในหลอด microcentrifuge 1.5ml เปิด QIAamp Mini spin column แล้วใส่ น้ำยา buffer AE 30 μ l แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง(15-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1นาทิจากนั้น นำเอาไป centrifuge ที่ 6000g เป็นเวลา 1 นาที
- 6) การตรวจหาสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์ิมโฟไซต์ชนิดทีในพลาสมา จะทำโดยใช้ QX200™ Droplet Digital™ PCR System โดยใช้ลำดับเบสของสารพันธุกรรมที่จำเพาะ V-D-J segment ของ T-cell receptor beta chain กับเซลล์ิมโฟไซต์ชนิดที
- 7) ในการนำเอาซีรัมมาศึกษา เริ่มโดยการนำตัวอย่าง circulating DNA ใน plasma ที่ได้ปั่นแยกไว้และเก็บไว้นั้น มาผสมเข้ากับน้ำยาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่
1. 10 μ l of 2X Taqman® universal PCR master mix
 2. 0.4 μ l of 10 μ M TCR β variable (V) forward primer
 3. 0.4 μ l of 10 μ M TCR β joining (J) reverse primers
 4. 0.4 μ l of 10 μ M TCR β variable Taqman probes
 5. 0.4 μ l of 10 μ M RPP30 primer and probe
 6. 4 μ l of plasma-circulating DNA samples
- 8) จากนั้นนำน้ำที่ผสมไว้ของแต่ละกลุ่มตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR โดยทำเทียบกับ standard T cell DNA เพื่อเป็น standard curve(ภาคผนวก ข) ในการทำการคำนวณหาปริมาณของ DNA ในตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างเข้าเครื่อง PCR เครื่องจะทำการคำนวณ และแปลผลออกมาเป็นจำนวนรอบ(cycle) ของการทำ PCR ที่ทำให้เกิดการดูดซับแสงตามค่าที่กำหนดไว้ จากนั้นนำมาคำนวณกลับเป็นจำนวน copy DNA ตาม standard curve ซึ่ง จะทำการคำนวณโดยเครื่อง PCR โดยในแต่ละตัวอย่างจะทำการตรวจตัวอย่างละ 2 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย เพื่อลดค่าคลาดเคลื่อนจากเครื่องมือและตัวผู้ทดสอบ จากนั้นอ่านผลโดยผู้วิจัยแล้ว นำค่าที่ได้ ไปคำนวณตามค่าการวิจัยที่ตั้งไว้ต่อไป
- 9) ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์ิมโฟไซต์ชนิดที หนึ่ง ผู้วิจัยขอเก็บตัวอย่างเลือดที่เหลือภายหลังการศึกษาวิจัยในถึงบรรจุชีวภัณฑ์แช่แข็ง ที่ใช้ในโตรเจนเหลวที่ห้องปฏิบัติการ 713 ชั้น 7 อาคารแพทยพัฒน์ โดยทำการเก็บตัวอย่างดังกล่าวเป็นระยะเวลา 20 ปี

ในการศึกษาครั้งนี้จะดำเนินการเก็บข้อมูล และศึกษาทั้งในแง่ของการรักษาและผลการรักษา ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2555 จนถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2560 โดยให้คำจำกัดความว่าคนที่เกิดเหตุการณ์ก่อนจุดเวลานั้นว่า “เหตุการณ์” เช่น การเสียชีวิต และให้คำจำกัดความว่าคนที่ไม่เกิดเหตุการณ์เมื่อถึงจุดเวลานั้นว่า “เซนเซอร์” เพื่อนำไปประกอบในการคำนวณเรื่องความสัมพันธ์กับช่วงเวลาการรอดชีวิตต่อไป โดยการสุ่มตัวอย่างนั้น ใช้วิธี nonprobability sampling แบบ accidental sampling

3.5 การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

ผู้วิจัยจะทำการรวบรวมข้อมูลทางคลินิกโดยทำการสืบค้นจากอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการและฐานข้อมูลพยาธิวิทยา เพื่อยืนยันการวินิจฉัยโรค นอกจากนี้ผู้วิจัยจะรวบรวมข้อมูลเชิงระบาดวิทยาของอาสาสมัครจากเวชระเบียน รวมถึงทำการติดตามอาสาสมัครในแง่ของการมีชีวิตรอด

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

- 1) การรายงานผลในแง่ของความชุกจะรายงานผลในรูปของสัดส่วนร้อยละระหว่างผู้ป่วยที่ตรวจพบระดับของสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์ลิโฟไซต์ชนิดทีในพลาสมา และผู้ป่วยทั้งหมดที่ทำการศึกษา
- 2) ในแง่ของการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่าง 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ตรวจพบระดับของสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์ลิโฟไซต์ชนิดทีในพลาสมาและกลุ่มที่ตรวจไม่พบ สำหรับข้อมูลประเภท Numerical data จะเลือกใช้วิธี Mann-Whitney U test หรือ t-test ขึ้นกับลักษณะการกระจายของข้อมูล สำหรับ Categorical data จะทำการเปรียบเทียบข้อมูลโดย Chi-square or Fisher's exact tests
- 3) การหาความสัมพันธ์ของข้อมูลเชิงปริมาณสองชนิด เช่น ระดับของสารพันธุกรรมอิสระจากเซลล์ลิโฟไซต์ชนิดทีในพลาสมา และ สัดส่วนของเซลล์ลิโฟไซต์ในก้อนมะเร็ง เป็นต้น ใช้การเปรียบเทียบด้วย Pearson's correlation หรือ Spearman's rank correlation ขึ้นอยู่กับลักษณะการกระจายตัวของข้อมูลและลักษณะความสัมพันธ์กันของข้อมูล

- 4) ความสัมพันธ์กับข้อมูลที่เป็นลักษณะระยะเวลาจนกระทั่งเกิดเหตุการณ์ เช่น ระยะเวลารอดชีวิต (survival analysis) จะทำการวิเคราะห์โดย Log-rank test & Kaplan-Meier
- 5) ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย โปรแกรมสำเร็จรูป STATA version 14.0 และในการวิเคราะห์ทั้งหมดใช้นัยสำคัญของความแตกต่างคิดที่ค่า $p < 0.05$
- 6) การวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อระยะเวลาการอยู่รอด จะวิเคราะห์โดย cox proportional hazard regression analysis โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ STATA version 14.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูล และในการวิเคราะห์ทั้งหมดใช้นัยสำคัญของความแตกต่างคิดที่ $p\text{-value} < 0.05$



3.7 การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and Time schedule)

การดำเนินงาน	ปีที่1		ปีที่2			
	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
1.การเตรียมงาน <ul style="list-style-type: none"> เขียนโครงร่างงานวิจัย ยื่นจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ (ethics committee) เขียนขอทุนวิจัย 	↔					
2.การรวบรวมข้อมูล <ul style="list-style-type: none"> การเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือด และข้อมูลจากอาสาสมัคร ตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด และชิ้นเนื้อ เก็บรวบรวมผลจากการตรวจ ตัวอย่าง 			↔			
3.การวิเคราะห์ข้อมูล <ul style="list-style-type: none"> วิเคราะห์ข้อมูลจากอาสาสมัคร และข้อมูลจากผลการตรวจ วิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจ 					↔	
4.การเขียนรายงานสรุปผลการศึกษา <ul style="list-style-type: none"> เขียนรายงานผลการศึกษา ผล การวิเคราะห์ข้อมูล รายงานวิเคราะห์ วิจารณ์ผล การศึกษาที่ได้ 					↔	
5.รายงานสรุปผลการศึกษาทั้งหมด						↔

ตาราง 2 แสดงระยะเวลาการดำเนินการวิจัย

3.8 งบประมาณ (Budgets)

วางแผนการขอทุนวิจัยจากทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดย

รายการ	ค่าใช้จ่าย
หมวดค่าวัสดุ ได้แก่ ค่าวัสดุสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ค่าวัสดุสำนักงาน ค่าตรวจทางห้องปฏิบัติการ - ค่าทำการตรวจ ddPCR ค่า primer ค่า probe	140,000
หมวดค่าครุภัณฑ์ - ค่าเอกสารและวัสดุงานธุรการ	10,000
รวมจำนวนเงินทั้งสิ้น	150,000 บาท

ตาราง 3 แสดงค่าใช้จ่ายโดยประมาณในการวิจัย

3.9 สถานที่ทำวิจัย (Venue of the Study)

ห้องปฏิบัติการ 713 ชั้น 7 อาคารแพทย์พัฒน์และห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ชั้น 13 ตึก อปร.คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

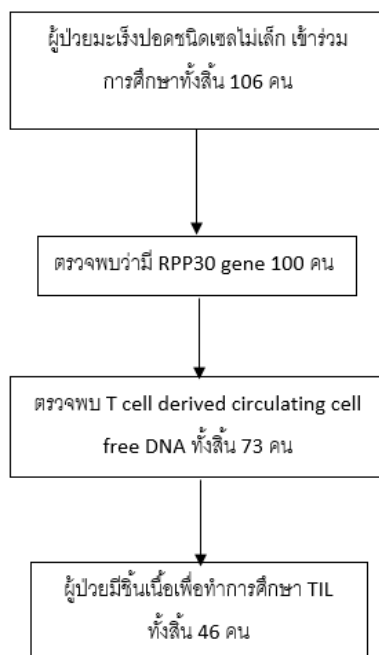
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 คุณลักษณะของประชากรในการศึกษา

ประชากรที่นำมาศึกษาทั้งหมด 106 คน โดยที่ทุกคนที่เข้ามาในการศึกษา ตรวจพบว่าผลเป็นลบสำหรับการตรวจ RPP30 ซึ่งเป็น positive control ที่แสดงถึง total circulating DNA ซึ่งการที่ผลเป็นบวกแสดงถึงการที่สามารถตรวจพบ circulating DNA ได้ ใน 100 คนที่ตรวจผลเป็นบวก สำหรับ RPP30 พบว่าเป็นเพศชาย ร้อยละหกสิบ โดยมีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ 62.4 ปี (range 38-89 ปี) ทุกคนได้รับการวินิจฉัยเป็นระยะแพร่กระจายหรือระยะที่สี่ทั้งสิ้น ถ้าพิจารณาในแง่ของประเภทของมะเร็งตาม histology พบว่า adenocarcinoma พบได้มากที่สุดร้อยละ 76 รองลงมาคือ squamous cell carcinoma ร้อยละ 8.5 และ large cell/neuroendocrine tumor ร้อยละ 3.8 ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยไม่เคยสูบบุหรี่ คิดเป็นร้อยละ 73.3 มีผู้ป่วยที่ยังสูบบุหรี่อยู่ร้อยละ 12.2 ผู้ป่วยทุกคนมี performance status อยู่ที่ 1 ในแง่ของการรักษาที่ผู้ป่วยได้รับ ถ้าพิจารณาตามลำดับการรักษา (line of treatment) พบว่าค่ากลางลำดับการรักษาอยู่ที่ 1 โดยมีตั้งแต่ 0-5 lines of treatment โดยที่การได้รับเคมีบำบัดชนิด platinum doublet พบมากที่สุดใน line แรกของการรักษา คิดเป็นร้อยละ 89 มีผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาลำดับที่สองและสามคิดเป็นร้อยละ 40 และ 15 ตามลำดับ

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบผู้ป่วยแยกออกเป็นสองกลุ่ม โดยแบ่งตามระดับของอัตราส่วนระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNA และ RPP30 เป็นกลุ่มที่มีระดับของอัตราส่วนระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNA และ RPP30 สูงและต่ำ โดยตัดที่ค่ากลาง (median) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปัจจัยคุณลักษณะของประชากร ยกเว้น ปัจจัยเรื่องการสูบบุหรี่ โดยที่พบว่า มีผู้ป่วยที่เป็น active /former smoker มากกว่าในกลุ่มที่มีระดับของอัตราส่วนระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNA และ RPP30 ต่ำ



แผนภูมิ 3 แสดงการขั้นตอนการดำเนินการศึกษา และจำนวนผู้ป่วยในแต่ละขั้นตอน

4.2 T cell-derived circulating cell free DNA and tumor infiltrating lymphocyte

สำหรับคำถามการวิจัยหลักคือความชุกของการตรวจพบ T cell-derived circulating cell free DNA พบว่าในผู้ป่วยที่ตรวจพบว่ามีผลบวกสำหรับ RPP30 ทั้ง 100 คน ตรวจพบว่ามีผลบวกสำหรับ T cell-derived circulating cell free DNA ทั้งหมด 73 คน คิดเป็นความชุกเท่ากับร้อยละ 73 โดยที่ค่ากลาง (median) สำหรับ ระดับ T cell-derived circulating cell free DNA เท่ากับ 1.71 pg/mL ของพลาสมา (พิสัย $0-2.26 \times 10^3$) ค่ากลาง (median) สำหรับ ระดับ RPP30 เท่ากับ 4 pg/mL (พิสัย 0.004-65.74) ในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากการตรวจหา T cell-derived circulating cell free DNA ทำในลักษณะของ semiquantitative จึงมีการใช้ค่าสัดส่วนมาใช้ในการวิเคราะห์ร่วมด้วย โดยใช้ค่าสัดส่วนระหว่าง ระดับ T cell-derived circulating cell free DNA ต่อ ระดับ RPP30 โดยที่ค่ากลางของสัดส่วนนี้อยู่ที่ ร้อยละ 0.02 (พิสัย 0-37) นอกจากนี้ยังได้มีการแบ่งกลุ่มของข้อมูลทั้งค่าของ ระดับ T cell-derived circulating cell free DNA, RPP30 หรือ ค่าสัดส่วนระหว่างระดับ T cell-derived circulating cell free DNA ต่อ ระดับ RPP30 เป็นกลุ่มที่ได้ค่าระดับสูงและต่ำ แต่เนื่องจากว่ายังไม่มีค่ามาตรฐานที่ใช้สำหรับการแบ่งที่ชัดเจนในปัจจุบัน ร่วมกับการตรวจที่ยังไม่เคยมีข้อมูลมาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ค่าที่ตัดแบ่งกลุ่มด้วยค่ากลาง คือ median เนื่องด้วยข้อมูล

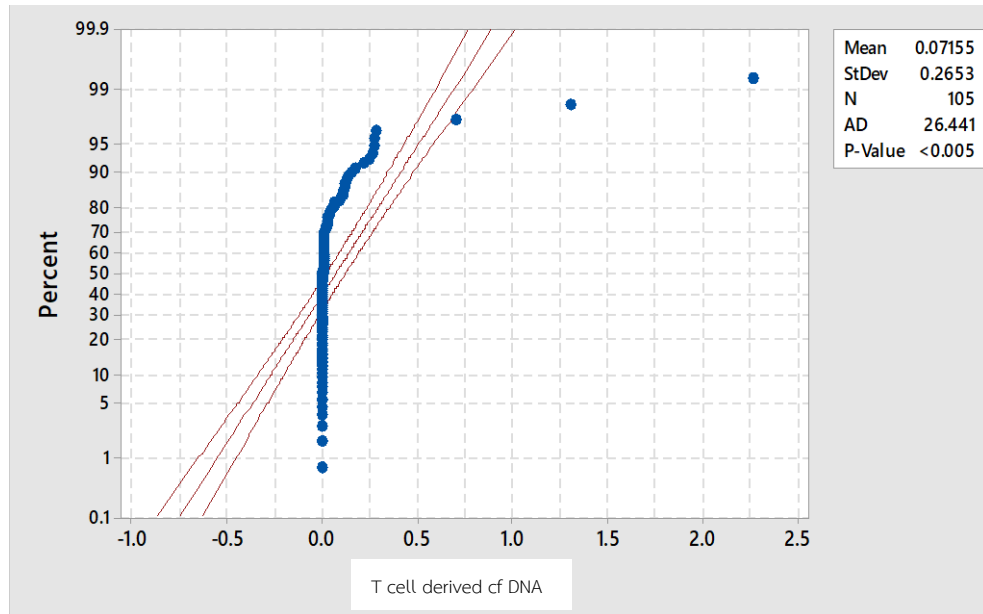
ทั้งหมดในการศึกษานี้มีการกระจายตัวแบบไม่เป็นปกติ (non-normal distribution)(กราฟที่1,2) ในส่วนของการตรวจดู tumor-infiltrating lymphocyte พบมีผู้ป่วยที่มีชิ้นเนื้อเพียงพอต่อการตรวจและทำการย้อมCD3 ได้จำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 46 คน โดยการรายงานค่าTILในการศึกษานี้จะรายงานเป็นค่าจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีCD3 ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดในพื้นที่นั้นๆ (total CD3 positive cell/total counted cell per field) ซึ่งมีค่ากลางเท่ากับ 0.22(พิสัย 0.02-2.34)

คุณลักษณะ		จำนวน(ร้อยละ)
เพศ	male	63(60)
	female	42(40)
อายุ(mean,range)		62.4(38-89)
สถานะการสูบบุหรี่	active smoker	13(12.2)
	former smoker	15(14.2)
	non smoker	77(73.3)
Histology	adenocarcinoma	80(76.1)
	squamous cell carcinoma	9(8.5)
	large cell/NET	4(3.8)
	NSCLC NOS	10(9.4)
จำนวนการรักษาที่ได้รับ (line of treatment)	median(range)	1(0-5)
ลำดับการรักษาแรก	platinum doublet CMT	90(89.1)
	EGFR TKI	6(5.9)
	ALK inhibitor	1(0.9)
จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาลำดับที่สอง		42(40)
จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาลำดับที่สาม		16(15)

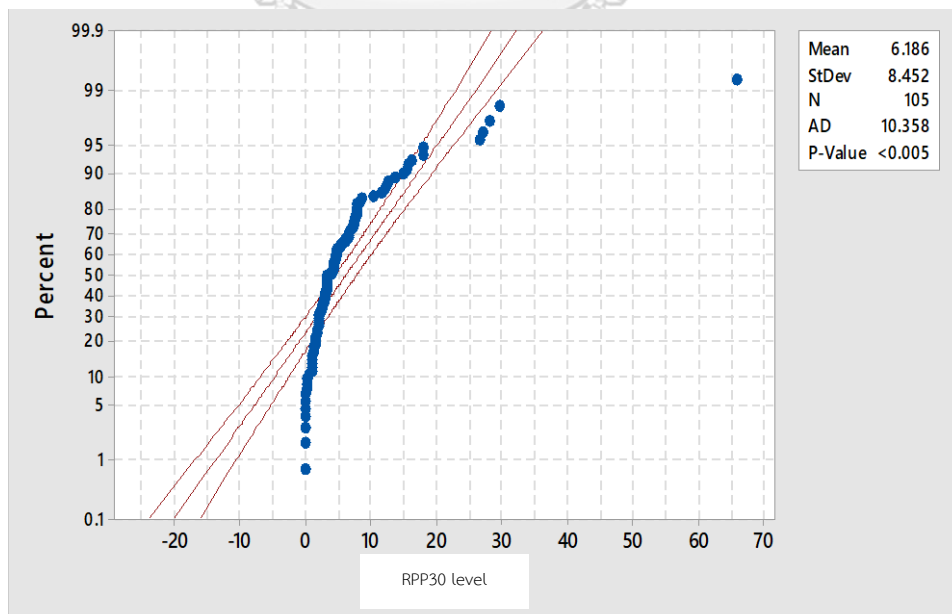
ตาราง 4 แสดงคุณลักษณะพื้นฐานของประชากรที่นำมาศึกษา

คุณลักษณะประชากร	กลุ่มที่ระดับอัตราส่วนสูง N=50 จำนวน(ร้อยละ)	กลุ่มที่ระดับอัตราส่วนสูง N=50 จำนวน(ร้อยละ)	P value
เพศ:			
• ชาย	28(56)	32(64)	0.414
• หญิง	22(44)	18(36)	
อายุ (median, พิสัย)	63(38-85)	61(38-89)	0.218
สถานะการสูบบุหรี่			0.001*
• never smoker	46(92)	29(58)	
• former smoker	2(4)	11(22)	
• active smoker	2(4)	10(20)	
Histology			0.925
• adenocarcinoma	38(76)	38(76)	
• squamous cell carcinoma	3(6)	5(10)	
• large cell/NET	8(16)	6(12)	
• NOS	1(2)	1(2)	
จำนวนการรักษาที่ได้รับ			0.582
• ≤ 2 lines	30(60)	32(64)	
• > 2 lines	20(40)	18(36)	

ตาราง 5 แสดงคุณลักษณะพื้นฐานของประชากรที่นำมาศึกษา โดยแบ่งเป็นกลุ่มตามระดับของอัตราส่วนระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNA ต่อ ระดับ RPP30



แผนภูมิ 4 แสดงการกระจายตัวของ ระดับ T cell derived cell free DNA ซึ่งกระจายตัวแบบไม่เป็นปกติ(non-normal distribution)

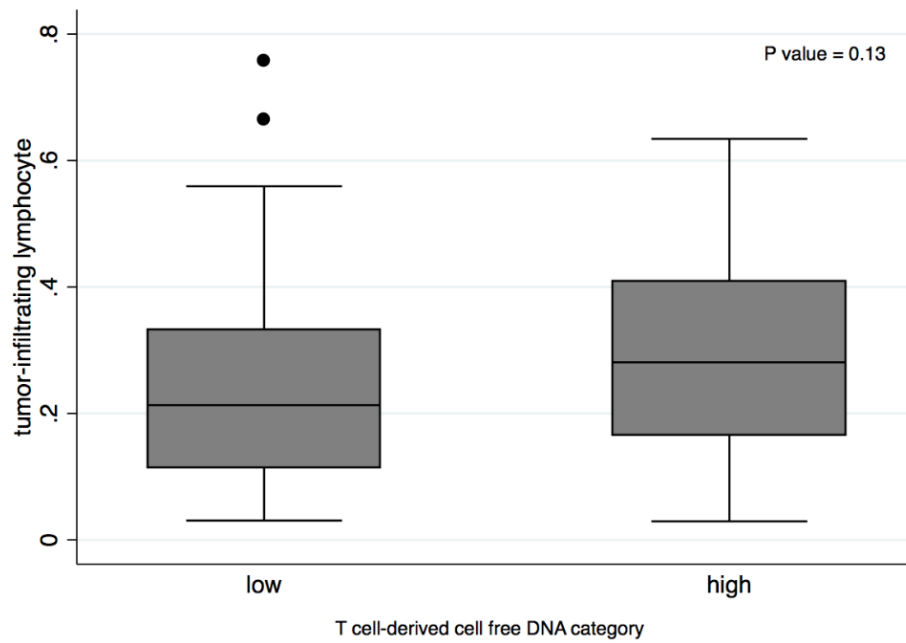


แผนภูมิ 5 แสดงการกระจายตัวของ ระดับ RPP30 ซึ่งกระจายตัวแบบไม่เป็นปกติ(non-normal distribution)

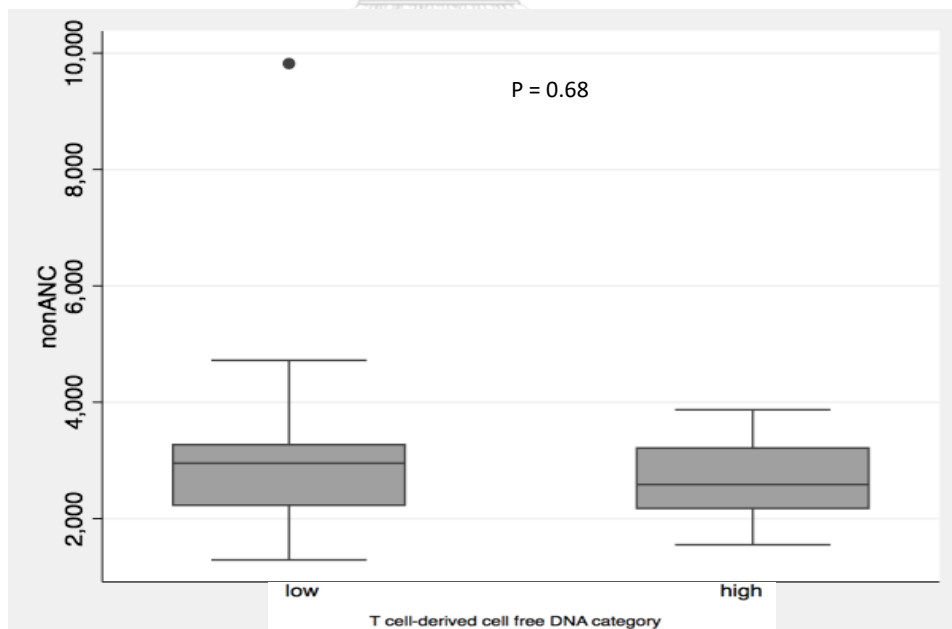
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNAและปัจจัยต่างๆ

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNAและ TIL ผลคือไม่พบมีความสัมพันธ์กันด้วยวิธีวิเคราะห์ Spearman's correlation (P value 0.137) รวมทั้งไม่พบความสัมพันธ์กับระหว่างระดับT cell-derived circulating cell free DNA ที่แบ่งกลุ่มกับค่าTIL(P value 0.15)(กราฟที่ 3) ค่า median ของTILในกลุ่มที่มีระดับT cell-derived circulating cell free DNA สูง และต่ำ เท่ากับ 0.28 and 0.21 cell/mm³ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสัดส่วนระหว่างระดับT cell-derived circulating cell free DNAและระดับ RPP30 กับ TIL ผลคือไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(กราฟที่5) ในแง่ของที่มาอีกข้อหนึ่งของ circulating cell free DNA ซึ่งเชื่อว่าอาจจะมาจาก circulating lymphocyte ในการศึกษานี้ก็ได้ ทำการศึกษาโดยหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับT cell-derived circulating cell free DNAกับจำนวนของ non neutrophil white blood cell count พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันของปัจจัยทั้งสอง(P value = 0.68) (กราฟที่4)

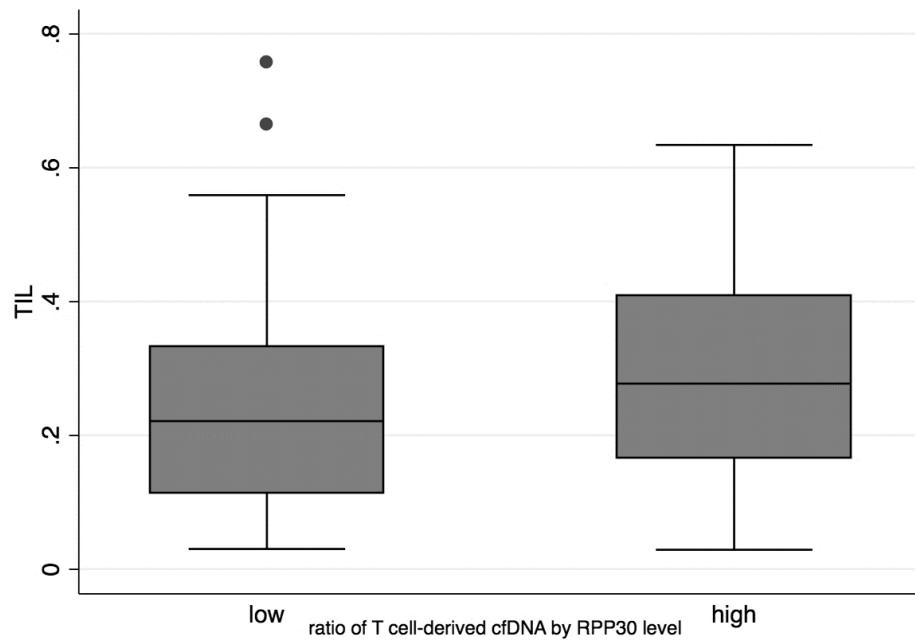
เมื่อทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของปัจจัยแต่ละตัวและระดับของT cell-derived circulating cell free DNA(univariate analysis) พบว่ามีเพียงปัจจัยเรื่องการสูบบุหรี่ที่มีความสัมพันธ์กับระดับของT cell-derived circulating cell free DNA กล่าวคือผู้ป่วยที่มีประวัติยังคงสูบบุหรี่อยู่จะพบว่ามีระดับของT cell-derived circulating cell free DNAที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้สูบบุหรี่ (P value=0.013) ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยร่วมหลายตัว(multivariate analysis) ปัจจัยเรื่องการสูบบุหรี่ก็ยังมีความสัมพันธ์กับระดับของT cell-derived circulating cell free DNA ไปในทิศทางเดิม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P=0.026)(ตารางที่ 4)



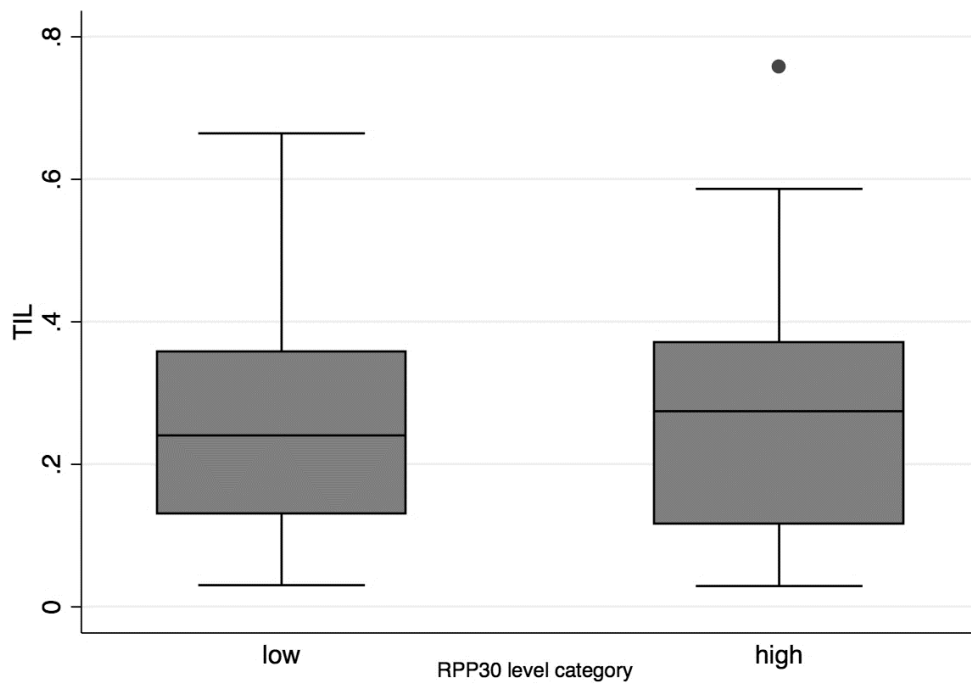
แผนภูมิ 6 แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่างค่า TIL ในกลุ่มของระดับ T cell-derived circulating cell free DNA ต่ำและสูง



แผนภูมิ 7 แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่างค่า non neutrophil WBC ในกลุ่มของระดับ T cell-derived circulating cell free DNA ต่ำและสูง



แผนภูมิ 8 แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่างค่า TIL ในกลุ่มของสัดส่วนระหว่าง T cell-derived circulating cell free DNA และ RPP30 ต่ำและสูง



แผนภูมิ 9 แสดงความสัมพันธ์เปรียบเทียบระหว่างค่า TIL ในกลุ่มของสัดส่วนระหว่าง RPP30 ต่ำและสูง

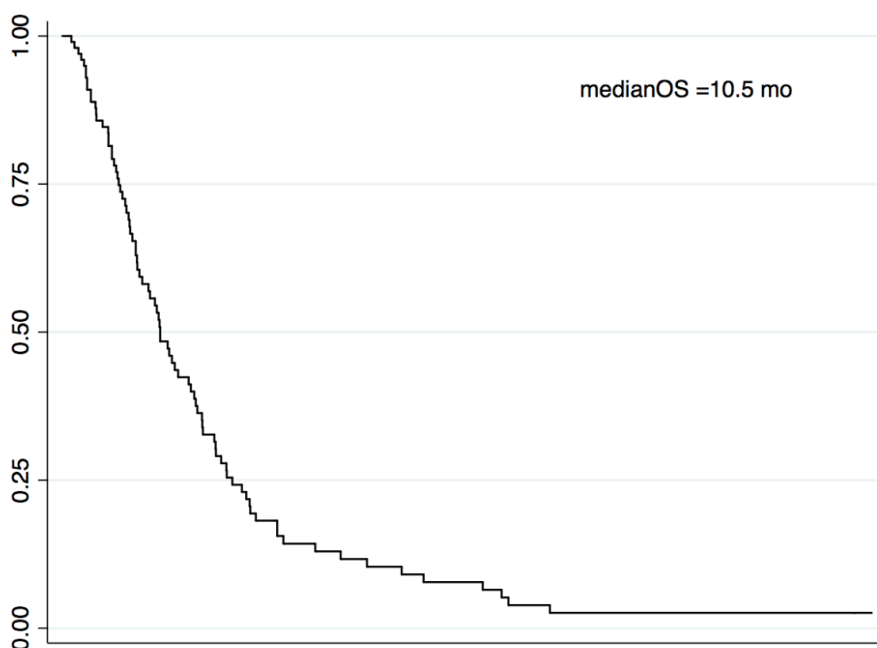
ปัจจัย	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Correlation coefficient*	P value	Correlation coefficient*	P value
อายุ (<60, >=60)	0.1014	0.425	0.114	0.396
สถานะการสูบบุหรี่ (ไม่สูบบุหรี่, ยังสูบบุหรี่อยู่)	-0.2642	<0.001**	-0.419	<0.001**
Histology (adenocarcinoma, non-adenocarcinoma)	0.0466	0.715	0.046	0.424
ระดับ RPP30 (low, high level)	0.0997	0.112	-0.017	0.902
สัดส่วน TIL (low, high level)	0.1501	0.137	0.129	0.199

ตาราง 6 แสดงการวิเคราะห์ univariate และ multivariate ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับระดับ T cell-derived circulating cell free DNA

*spearman' correlation ** P value significant ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05

4.4 วิเคราะห์ปัจจัยต่างๆกับอัตราการรอดชีวิต

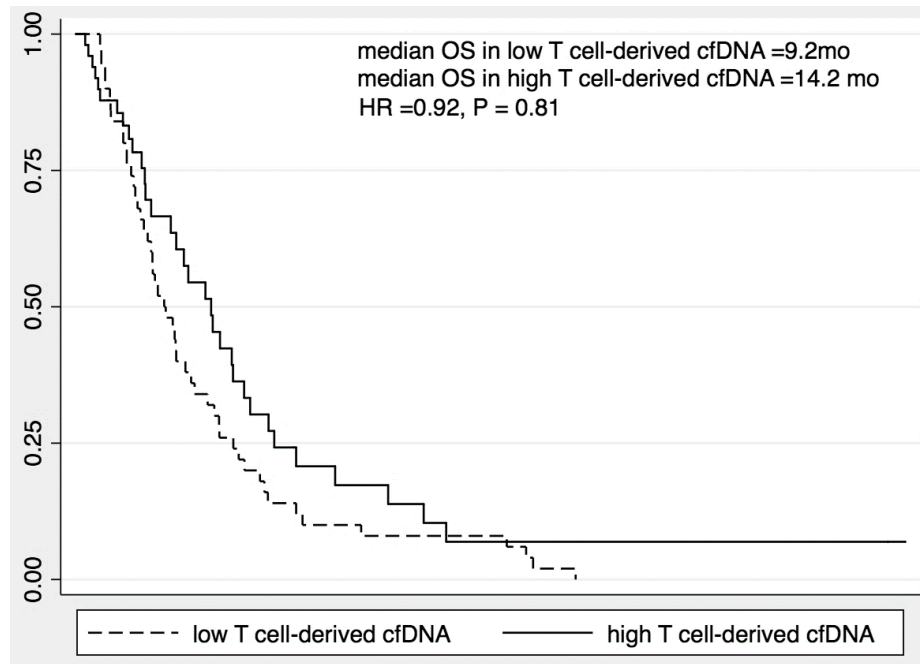
ณ จุดเวลาที่ทำการศึกษาข้อมูลพบว่า จากผู้ป่วยทั้งหมด 100 คน ค่ากลางของการติดตามผู้ป่วย (median follow up time) อยู่ที่ 8.2 เดือน (พิสัย 1-87 เดือน) มี 84 คนที่เสียชีวิต ด้วยสาเหตุที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็ง เมื่อใช้ log rank test เพื่อทำการศึกษาในแง่ของการเป็นปัจจัยพยากรณ์โรค โดยภาพรวมของประชากร พบว่าครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยทั้งหมดเสียชีวิตที่ 10.5 เดือน (median overall survival) (กราฟที่ 7) เมื่อทำการวิเคราะห์หาปัจจัยพยากรณ์โรค พบว่า มีเพียงสถานะการสูบบุหรี่เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตโดยรวมของผู้ป่วย (HR 1.41 P=0.03) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ (multivariate analysis) พบว่าสถานะการสูบบุหรี่ ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตโดยรวมของผู้ป่วยอีกต่อไป โดยที่ทั้งระดับของ T cell-derived circulating cell free DNA และ TIL ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตโดยรวมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาเรื่องสัดส่วนระหว่างระดับ T cell-derived circulating cell free DNA และ ระดับ RPP30 ในแง่ของการเป็นปัจจัยพยากรณ์โรค พบว่าค่าสัดส่วนนี้มีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญกับอัตราการรอดชีวิตโดยรวม โดยถ้าพิจารณาจากกราฟ จะพบว่ากลุ่มที่มีสัดส่วนระหว่างระดับ T cell-derived circulating cell free DNA และ ระดับ RPP30 สูง มีแนวโน้มที่จะมีอัตราการรอดชีวิตโดยรวมที่ดีกว่ากลุ่มที่มีค่าสัดส่วนนี้ต่ำกว่า (HR=0.667, P=0.072)



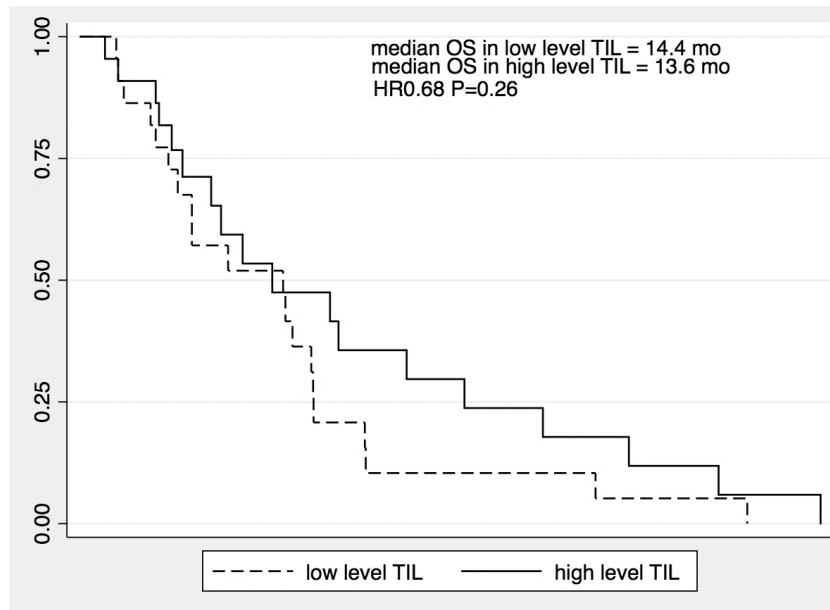
แผนภูมิ 10 Kaplan-Meier survival curve แสดงอัตราการรอดชีวิตภาพรวมของผู้ป่วยทุกคนในการศึกษาี้ โดยมี median overall survival อยู่ที่ 10.5 เดือน

ปัจจัย	Univariate, HR	P value	Multivariate, HR	P value
อายุ (<60, >/=60)	1.04	0.84	1.23	0.6
สถานะการสูบบุหรี่ (non, active smoker)	1.41	0.03*	3.17	0.06
Histology (adenocarcinoma, non-adenocarcinoma)	0.99	0.97	0.76	0.51
จำนวนการรักษาที่ได้รับ(≥2,<2)	0.54	0.3	-	-
สัดส่วน T-cirDNA/RPP30 (ต่ำ,สูง)	0.67	0.07	1.09	0.83
ระดับของRPP30 level (low, high level)	1.28	0.27	1.55	0.3
สัดส่วนTIL (low, high level)	0.68	0.25	0.67	0.28

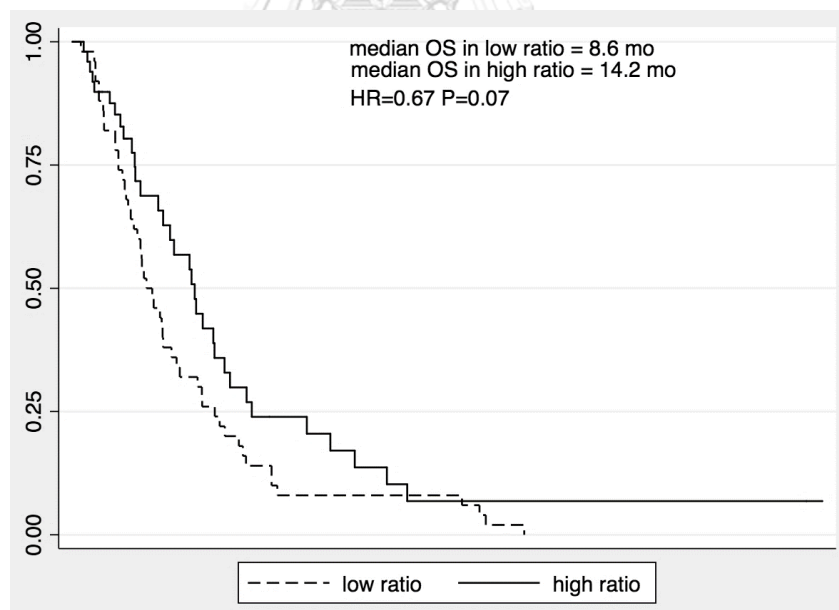
ตาราง 7 แสดงผลการวิเคราะห์การรอดชีวิตสัมพันธ์กับปัจจัยต่างๆโดยวิธี log rank test



แผนภูมิ 11 Kaplan-Meier survival curve แสดงอัตราการรอดชีวิตภาพรวมเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีค่าระดับ T cell-derived circulating cell free DNA ต่ำ และสูง



แผนภูมิ 12 Kaplan-Meier survival curve แสดงอัตราการรอดชีวิตภาพรวมเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีค่าระดับTIL ต่ำ และสูง



แผนภูมิ 13 Kaplan-Meier survival curve แสดงอัตราการรอดชีวิตภาพรวมเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่มีสัดส่วนระหว่างระดับ T cell-derived circulating cell free DNA และ ระดับ RPP30 ต่ำ และสูง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

ในแง่ของการเป็นปัจจัยทำนายโรคนั้น ระดับของ circulating cell free DNA ในพลาสมาของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กในระยะลุกลามนั้น เมื่อพบว่ามีระดับสูงจะพบว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบในระดับที่ต่ำกว่า ตามผลการศึกษาหลายๆการศึกษาในอดีต(12, 27-29) ซึ่งส่วนใหญ่ของที่มาของ circulating cell free DNA ก็มาจากเซลล์มะเร็งด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น จากการศึกษาของ *Diehl F., et al.*(30) ได้กล่าวถึงว่าหนึ่งในกลไกการเกิดของ circulating cell free DNA มาจากกระบวนการ necrosis ของก้อนมะเร็งทั้งจากการรักษาหรือเกิดขึ้น โดยที่ปกติแล้วรอบๆก้อนมะเร็งก็จะมีองค์ประกอบที่เป็นเซลล์ปกติมากมาย อาทิ dendritic cell หรือเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ได้แก่ lymphocyte เมื่อเกิดภาวะ necrosis จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่มาเก็บกินเซลล์หรือซากเซลล์บริเวณใกล้เคียง (scavenger cell) รวมถึง macrophage ซึ่งจะเข้ามาทำการย่อยและเก็บกินเซลล์ต่างๆทั้งเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติโดยรอบก้อนมะเร็งด้วย หลังจากนั้นก็จะมีการปลดปล่อยเอา DNA ของเซลล์ที่ถูกเก็บกินออกมาในกระแสเลือด ซึ่งอาจจะเป็นหนึ่งในกลไกการเกิดของ circulating cell free DNA หรือจากหลักฐานของการศึกษาโดย *Lui Y., et al.*(31) ซึ่งทำการศึกษาดูโดยเอาผู้ป่วยที่ทำการปลูกถ่ายไขกระดูก โดยเป็นลักษณะ sex mismatch คือตัว donor และ recipient คนละเพศกัน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาที่มาของ circulating cell free DNA ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ โดยจากการศึกษาพบว่า circulating cell free DNA ที่ตรวจพบมีลักษณะ DNA ที่เข้ากันได้กับ donor นั้นหมายความว่า circulating cell free DNA ที่ตรวจได้ มีที่มาจาก hematopoietic cell ซึ่งจะมี DNA ที่เหมือนกับจาก donor ดังนั้นจากข้อมูลที่มีในปัจจุบัน จะสามารถให้สมมติฐานได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่ circulating cell free DNA ในส่วนที่ได้มาจากเซลล์มะเร็งนั้นอาจจะมาจากเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบเลือด ได้แก่ lymphocyte ซึ่งถ้าโดยกระบวนการเกิด อาจเป็นไปได้ว่าจะมาจากเซลล์ lymphocyte ที่อยู่รอบก้อนมะเร็ง หรือ TIL เพื่อที่จะพิสูจน์สมมติฐานนี้ ในการศึกษาของข้าพเจ้าจึงได้หาความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับของ circulating cell free DNA ในส่วนที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็ง ตรวจว่ามาจาก lymphocyte นั้น มีความสัมพันธ์กับ TIL หรือไม่ โดยผลการศึกษาพบว่าไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างสองปัจจัยดังกล่าว นอกจากนั้น จากข้อมูลที่กล่าวถึงความเป็นไปได้ที่แหล่งกำเนิดของ circulating cell free DNA จะมาจาก hematopoietic cell นั้น ในการศึกษาของข้าพเจ้า ก็ได้มีการตรวจดูถึงความสัมพันธ์ของระดับ เม็ด

เลือดขาวในกระแสเลือดและระดับของ T cell-derived circulating cell free DNA ซึ่งผลการวิจัยก็ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างสองปัจจัยดังกล่าวเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้พบว่า ระดับของ circulating cell free DNA ในส่วนที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งที่เพิ่มขึ้นนั้น มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง เช่นเดียวกับข้อมูลในการศึกษาของ *Vinayanuwattikun C., et al.*(13)

การตรวจดู circulating cell free DNA ในส่วนที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็ง ในการศึกษาของข้าพเจ้า ตรวจโดยการนำเอา circulating cell free DNA มาทำ PCR โดยใช้ VDJ segment gene เป็น primer ในการตรวจหา ซึ่งมีความจำเพาะกับการตรวจดู T cell ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งใน TIL และมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กตามข้อมูลจากการศึกษาของ *Wakabayashi O.*(17) และ *Hiraoka K.*(18) โดยผลการศึกษาของข้าพเจ้าตรวจพบร้อยละ 73 ของผู้ป่วยทั้งหมด แต่ในแง่ของการความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยนั้น พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการศึกษานี้จะค้ำกับผลการศึกษาก่อนหน้า โดยผลการศึกษาที่ได้ต่างกันอาจจะอธิบายได้จากหลายปัจจัย ได้แก่

- 1) องค์ประกอบทั้งหมดของ circulating cell free DNA ในส่วนที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งนั้น อาจไม่ได้มาจาก lymphocyte ชนิดที่เพียงอย่างเดียว เนื่องจากที่ได้กล่าวไปข้างต้นว่ากระบวนการเกิดของ circulating cell free DNA อาจเกิดจากการ necrosis ของเซลล์อื่นๆ ที่อยู่รอบๆ ก้อนมะเร็ง อาทิ macrophage, เซลล์เยื่อหุ้มผนังเส้นเลือด หรือเซลล์ lymphocyte ชนิดอื่น ได้แก่ B cell เป็นต้น ดังนั้นการวัดว่า circulating cell free DNA ที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็งในส่วนที่มาจาก T cell เพียงอย่างเดียวจะทำให้ความสัมพันธ์ในภาพรวมทั้งหมดลดลงได้
- 2) เนื่องจากการศึกษานี้คำนวณขนาดตัวอย่าง (sample size) ตามคำถามวิจัยหลักคือเรื่องของ prevalence ของการตรวจพบ T cell derived circulating cell free DNA ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่การศึกษานี้ จะให้ power ไม่เพียงพอ (underpower) ในการศึกษาความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิต

ในการศึกษานี้ ได้ทำการหาความสัมพันธ์ระหว่าง T cell derived circulating cell free DNA กับ TIL ซึ่งจากการศึกษานี้ได้ทำการตรวจหา TIL ด้วยการย้อม immunohistochemistry คือ CD3 เนื่องจากในหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ อาทิ การศึกษาจาก *Tian, C., et al.*(32) ได้ทำโดยเลือกเอา CD3 และ CD8 มาทำการย้อมขึ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก แล้วมาดูความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิต ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยที่ตรวจพบ CD3 ในสัดส่วนที่สูงกว่า จะมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าผู้ป่วยที่ตรวจพบน้อย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของข้าพเจ้าไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กันของ T cell derived circulating cell free DNA กับ TIL ที่ตรวจด้วย CD3 ซึ่งผลการศึกษาที่พบอาจอธิบายได้จากหลายเหตุผล ได้แก่

- 1) นอกจากการตรวจ TIL ด้วย CD3 แล้ว ในหลายการศึกษาที่ได้กล่าวไปข้างต้น เช่น จาก *Wakabayashi O.* และ *Hiraoka K.* (17, 18) ซึ่งตรวจพบว่าการตรวจ TIL ด้วย CD4 และ CD8 พบมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยเช่นกัน ดังนั้นจากการศึกษาข้าพเจ้าที่ตรวจด้วย CD3 เพียงอย่างเดียวอย่างไม่เพียงพอที่จะทำให้เห็นความสัมพันธ์
- 2) เนื่องจากชิ้นเนื้อส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการตรวจในการศึกษานี้ส่วนใหญ่ได้มาจากการเก็บชิ้นเนื้อตรวจ (biopsy) หลายหลายตำแหน่ง เช่น จากตัวก้อนมะเร็งหลัก (primary tumor) หรือจากก้อนในตำแหน่งที่มีการกระจายไป (metastatic site) ร่วมกับข้อมูลการศึกษาของ *Jamal-Hanjani M., et al.* (33) ซึ่งตรวจพบความหลากหลายของการแสดงออกของมะเร็ง (intratumoral heterogeneity) ภายในผู้ป่วยคนเดียวจากชิ้นเนื้อหลายตำแหน่งในร่างกาย หรือแม้กระทั่งชิ้นเนื้อหลายชิ้นที่มาจากก้อนมะเร็งก้อนเดียวแต่หลายด้านของก้อน ซึ่งเมื่อนำมาตรวจดูลักษณะการกลายพันธุ์ ทั้งในแง่ของ ชนิดของการกลายพันธุ์ และ somatic copy number alteration ก็พบว่ามีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญบางสถิติ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าจากการศึกษาของข้าพเจ้าที่ชิ้นเนื้อส่วนใหญ่ได้จากการ biopsy อาจจะไม่ได้อาจจะเป็นตัวแทนของมะเร็งทั้งหมด จึงส่งผลให้สุดท้ายผลการศึกษาออกมาไม่พบความสัมพันธ์

จากการวิเคราะห์ทั้งแบบ univariate และ multivariate ของความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับ ระดับของ T cell-derived circulating cell free DNA พบว่าการสูบบุหรี่เป็นปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับระดับของ T cell derived circulating cell free DNA กล่าวคือ ในผู้ป่วยที่มีประวัติสูบบุหรี่มาตลอด จะพบมีค่า T cell derived circulating cell free DNA ที่ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่สูบบุหรี่ ซึ่งจากการหาข้อมูลในการศึกษาที่ผ่านมา ยังไม่พบมีการอธิบายไว้ชัดเจน ในบางการศึกษามีการกล่าวถึงปัจจัยเรื่องการสูบบุหรี่กับระดับ circulating cell free DNA ในหญิงตั้งครรภ์ เช่น การศึกษาของ *Urato AC., et al.* (34) พบว่า ระดับของ total circulating cell free DNA ในหญิงตั้งครรภ์ไตรมาสที่สองที่สูบบุหรี่ มีระดับที่มากกว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ระบุแหล่งกำเนิดของ circulating cell free DNA ที่ตรวจได้ จากการค้นคว้าเพิ่มเติมระหว่างการศึกษาการสูบบุหรี่กับภาวะภูมิคุ้มกันร่างกาย *Qiu F., et al.* (25) กล่าวว่า การสูบบุหรี่นั้นส่งผลต่อการทำงานของ T cell ซึ่งจะเพิ่มระดับของ CD8 T cell แต่ละ CD4 T cell ซึ่งได้จากการตรวจดูในพลาสมาและ bronchoalveolar lavage fluid จากผู้ป่วยที่เป็น COPD และไม่ได้เป็น

COPD ดังนั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์กับผลที่ได้จากการศึกษาของข้าพเจ้า การที่ระดับของ T cell derived circulating cell free DNA ที่ลดลง ในคนที่สูบบุหรี่ อาจจะไม่สามารถสรุปได้ว่าสัมพันธ์กับกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งของ T cell ที่เปลี่ยนไปหรือไม่ อาจจะต้องมีการศึกษาที่อธิบายจำเพาะกว่านี้ต่อไป

5.2 จุดแข็งของการวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ทำเพื่อตอบคำถามในเรื่องของการหาแหล่งที่มาของ circulating cell free DNA ในส่วนที่ไม่ได้มาจากจากเซลล์มะเร็งของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ซึ่งจากการค้นหาข้อมูลยังไม่พบงานวิจัยที่ทำเพื่อตอบคำถามนี้โดยตรง โดยที่จากสมมติฐานว่า circulating cell free DNA กลุ่มนี้น่าจะมีแหล่งกำเนิดมาจาก T cell จึงได้ใช้การตรวจด้วยวิธี PCR ซึ่งมีทั้งความไวค่อนข้างสูงแม้ DNA ที่ได้จะมีปริมาณน้อย และมีความจำเพาะค่อนข้างสูงเช่นกัน เนื่องจากใช้การทำ PCR ในลักษณะที่เป็น probe specific และ primer/probe ที่ใช้ มาจาก VDJ segment ของ T cell ซึ่งเป็น gene มีความจำเพาะสูงต่อการตรวจหา T cell นอกจากนี้ จำนวนตัวอย่างที่ได้ถือว่าค่อนข้างมากในการตอบคำถามหลักของการวิจัย เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่คำนวณไว้ได้ เท่ากับ 43 คน แต่จากการวิจัย ได้จำนวนตัวอย่างถึง 106 ซึ่งจะทำให้มี power เพียงพอต่อการตอบคำถามหลักของการวิจัยได้

ในแง่ของคำถามอื่นๆของการวิจัย ได้แก่ การตรวจดู TIL ซึ่งโดยทั่วไปมีการตรวจได้หลายวิธี ตั้งแต่การนับด้วยตาจากการย้อม H&E ซึ่งมีข้อจำกัดคือขึ้นอยู่กับสายตาของผู้วัด กล่าวคือ เซลล์บางตัว ผู้วัดแต่ละอาจจะให้นิยาม เช่น เป็น lymphocyte หรือไม่ ได้ไม่เหมือนกัน ซึ่งการย้อม immunohistochemistry ก็จะช่วยลดข้อจำกัดอันนี้ได้ สำหรับการอ่านผลนั้น การศึกษาของข้าพเจ้า ได้ใช้ โปรแกรม สำเร็จรูปในการนับจำนวนเซลล์ ซึ่งเป็น โปรแกรมสำเร็จรูปที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายทั้งในการทำงานหรือการวิจัยทั่วไป ซึ่งข้อดีคือจะสามารถลดข้อจำกัดของผู้อ่าน สามารถนับจำนวนเซลล์ได้แม่นยำมากขึ้นอีกด้วย

5.3 ข้อจำกัดของการวิจัย

- 1) จากที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่าในการศึกษานี้ของข้าพเจ้า เลือกใช้ VDJ segment gene เพื่อเป็น primer ในการทำ PCR โดยที่เลือกเพียง 8 gene จากในการที่อ้างอิงไว้ (26) ซึ่งใช้ทั้งหมด 45 gene จากเหตุผลที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นคือ ผลการศึกษาของ Robins S., et al ลักษณะ T cell ที่ตรวจพบไม่มีความเป็น clonality จำเพาะ กล่าวคือพบ clone ใด clone หนึ่งของ T cell ที่มากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น จึงเลือกเพียง clone เดียวมาทำการศึกษาร่วมกับข้อจำกัดเรื่องของงบประมาณ แล้วแปลผล วิเคราะห์ผลในลักษณะ

เป็น semiquantitative แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลความไม่เป็น clonality ของ T cell ที่ประยุกต์มานั้น ไม่ได้เอามาจากผู้ป่วยมะเร็งปอด เนื่องจากไม่มีข้อมูลการศึกษา ลักษณะนี้ในผู้ป่วยมะเร็งปอด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าลักษณะของ T cell ที่พบ อาจจะต่างกับในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ตามการศึกษาของ Robins S., et al จึงเป็นข้อจำกัดหนึ่งที่อาจทำให้ไม่เห็นความสัมพันธ์ทั้งกับ TIL และ อัตราการรอดชีวิตในการศึกษานี้

- 2) เนื่องจากการศึกษานี้คำนวณขนาดของกลุ่มตัวอย่างมาเพื่อตอบคำถามหลักคือความชุกของการตรวจพบ T cell derived circulating cell free DNA ในพลาสมา ดังนั้นการที่จะตอบคำถามรองอื่นๆ เช่นความสัมพันธ์ระหว่าง TIL และ T cell derived circulating cell free DNA หรือความสัมพันธ์ของ T cell derived circulating cell free DNA ในแง่การเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคต่ออัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย จึงอาจจะทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ออกมาไม่มี power ไม่มีเพียงพอที่จะเห็นความสัมพันธ์ หรือ เห็นความแตกต่างได้ (underpower for secondary research questions)
- 3) ในการตอบคำถามที่เกี่ยวกับ TIL เนื่องจากการศึกษานี้ได้ขึ้นเนื้อเพื่อนำมาตรวจหา TIL ค่อนข้างน้อย จึงอาจจะทำให้ไม่เพียงพอที่จะวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับ TIL ได้
- 4) เนื่องจากส่วนหนึ่งของข้อมูลที่ได้จากผู้ป่วยในการศึกษานี้จำเป็นต้องได้จากการทบทวนประวัติจากเวชระเบียน และจากการโทรสอบถามจากตัวผู้ป่วยและญาติ ดังนั้นจึงอาจเกิด bias ของข้อมูลที่ได้ เช่น recall bias จากการสอบถามประวัติบางอย่างย้อนหลัง รวมถึง bias จากการเก็บข้อมูลในเวชระเบียนที่มีการบันทึกไว้ โดยไม่ได้เป็นการสอบถามตามแผนที่วางไว้ล่วงหน้า จึงอาจจะทำให้ข้อมูลมีความคลาดเคลื่อนได้เล็กน้อยในการนำมาวิเคราะห์
- 5) ชิ้นเนื้อที่นำมาศึกษาเรื่อง TIL โดยการย้อม CD3 immunohistochemistry นั้น ส่วนใหญ่เป็นชิ้นเนื้อที่ได้จากการ biopsy เป็นส่วนใหญ่ และ ตัวเนื้องอกที่ biopsy มา ก็มีทั้งเป็นก้อนหลักของมะเร็ง(primary tumor)หรือเป็นตำแหน่งที่โรคกระจายไป (metastatic site) ดังนั้นจากการที่ได้ทบทวนไว้ก่อนหน้านี้เรื่อง tumor heterogeneity การ biopsy เพียงส่วนเดียวของการอาจจะไม่ได้เป็นตัวแทนที่ดีของมะเร็งทั้งร่างกายของผู้ป่วย จึงอาจจะส่งผลต่อผลการศึกษาได้เช่นกัน

- 6) ในการเลือกใช้ CD3 เป็นตัวเลือกในการศึกษา TIL นั้น ก็เป็นข้อจำกัดอีกอย่างหนึ่งในการศึกษาเนื่องจากข้อมูลที่ได้พบทวนไว้เบื้องต้น พบว่ายังมี immunohistochemistry ตัวอื่นๆที่ย้อมดู T cell ชนิดต่างๆ และยังมีความสัมพันธ์ในแง่การเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคอีกด้วย ดังนั้นการเลือกเอา CD3 เพียงตัวเดียว เนื่องจากข้อจำกัดของปริมาณชิ้นเนื้อและเรื่องงบประมาณ นั้น อาจจะทำให้ผลการศึกษามีความคลาดเคลื่อนได้เช่นกัน

5.3 สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาเพื่อตรวจดูความชุกของ T cell derived circulating cell free DNA ด้วยวิธี PCR จากพลาสมาของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กในระยะลุกลาม พบว่ามีความชุกร้อยละ 73 โดยที่พบว่ามีแนวโน้มที่สัดส่วนของ T cell derived circulating cell free DNA ต่อ RPP30 จะเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคในแง่ของอัตราการรอดชีวิตโดยรวม และตรวจไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง T cell derived circulating cell free DNA และ CD3 positive tumor-infiltrating lymphocyte

5.4 ข้อเสนอแนะ

- 1) เนื่องด้วยข้อจำกัดทางด้านงบประมาณ และผลการศึกษาที่ตรวจพบว่า T cell derived circulating cell free DNA เป็นส่วนประกอบหนึ่งของ circulating cell free DNA ส่วนที่ไม่ได้มาจากเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการขยายการศึกษาโดยใช้การตรวจด้วย primer ให้ครบทุกตำแหน่งของ gene VDJ segment รวมถึงการตรวจ TIL ด้วย immunohistochemistry อื่นๆ ได้แก่ CD4 CD8 เป็นต้น อาจจะทำให้เห็นความสัมพันธ์ได้มากขึ้น
- 2) เนื่องด้วยข้อจำกัดของเวลาจึงทำให้มีจำนวนผู้ป่วยที่มีชิ้นเนื้อเพื่อมาทำการศึกษาเรื่อง TIL จำนวนน้อย ดังนั้นหากขยายเวลาการศึกษาออกให้มากขึ้นจะทำให้สามารถเก็บจำนวนตัวอย่างได้มากขึ้น ทำให้สามารถนำชิ้นเนื้อมาตรวจได้มากขึ้น อาจจะทำให้เห็นความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆได้มากขึ้นด้วย
- 3) ประเด็นเรื่องของความสัมพันธ์ระหว่างการสูบบุหรี่และระดับของ T cell derived circulating cell free DNA ซึ่งเป็นประเด็นที่พบในการศึกษานี้ เป็นประเด็นที่น่าสนใจและยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนในการอธิบายความสัมพันธ์ ดังนั้นจึงสามารถเป็นหัวข้อในการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต เช่น เก็บข้อมูลเพื่อเติม หาความสัมพันธ์ระหว่างการสูบบุหรี่ และ T

cell derived circulating cell free DNA รวมถึงความสัมพันธ์กับ TIL และอาจจะดูร่วมกับความสัมพันธ์ของ T cell ในเลือดด้วย เป็นต้น

- 4) ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นเรื่องของ tumor heterogeneity ตามการศึกษาของ ซึ่งได้กล่าวถึง heterogeneity ในแง่ของ mutation แต่ในแง่ของ TIL ไม่ได้มีข้อมูลชัดเจน ดังนั้นก็สามารถนำไปศึกษาต่อในแง่ของการดูความแตกต่างของ TIL จากชิ้นเนื้อที่ได้จากแต่ละตำแหน่งของมะเร็งในร่างกายของผู้ป่วยคนเดียวกัน หรืออาจจะดูร่วมการความแตกต่างระหว่างมะเร็งที่พบในระยะเริ่มต้น เทียบกับระยะแพร่กระจายได้



รายการอ้างอิง

1. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ.2559
http://www.nci.go.th/th/cancer_record/cancer_rec1.html2561
2. Kelly K, Crowley J, Bunn PA, Jr., Presant CA, Grevstad PK, Moinpour CM, et al. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non--small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol.* 2001;19(13):3210-8.
3. Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, Crino L, Gridelli C, Ricci S, et al. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(21):4285-91.
4. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2002;346(2):92-8.
5. Group N-sCLCC. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ.* 1995;311(7010):899-909.
6. Ganz PA, Figlin RA, Haskell CM, La Soto N, Siau J. Supportive care versus supportive care and combination chemotherapy in metastatic non-small cell lung cancer. Does chemotherapy make a difference? *Cancer.* 1989;63(7):1271-8.
7. Benjamin J. Solomon MB, B.S., Ph.D., Tony Mok, M.D., Dong-Wan Kim, M.D., Ph.D., Yi-Long Wu, M.D., Kazuhiko Nakagawa, M.D., Ph.D., Tarek Mekhail, M.D., Enriqueta Felip, M.D., Ph.D., Federico Cappuzzo, M.D., Jolanda Paolini, B.Sc., Tiziana Usari, B.Sc., Shrividya Iyer, Ph.D., Arlene Reisman, M.P.H., et al., First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(16):1582.
8. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361(10):947-57.

9. Aarthy R, Mani S, Velusami S, Sundarsingh S, Rajkumar T. Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Molecular diagnosis & therapy*. 2015;19(6):339-50.
10. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977;37(3):646-50.
11. Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;945:1-7.
12. Sirera R, Bremnes RM, Cabrera A, Jantus-Lewintre E, Sanmartin E, Blasco A, et al. Circulating DNA is a useful prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011;6(2):286-90.
13. Vinayanuwattikun C, Winayanuwattikun P, Chantranuwat P, Mutirangura A, Sriuranpong V. The impact of non-tumor-derived circulating nucleic acids implicates the prognosis of non-small cell lung cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2013;139(1):67-76.
14. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Czoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-33.
15. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10030):1837-46.
16. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-39.
17. Wakabayashi O, Yamazaki K, Oizumi S, Hommura F, Kinoshita I, Ogura S, et al. CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci*. 2003;94(11):1003-9.
18. Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y, et al. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer*. 2006;94(2):275-80.

19. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011;105(1):93-103.
20. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levrà MG, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl 5):v1-v27.
21. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;906:161-8.
22. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res*. 1975;35(9):2375-82.
23. Holmes EC. Immunology and lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 1976;21(3):250-8.
24. Jung CY, Antonia SJ. Tumor Immunology and Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2018;81(1):29-41.
25. Qiu F, Liang CL, Liu H, Zeng YQ, Hou S, Huang S, et al. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget*. 2017;8(1):268-84.
26. Robins HS, Ericson NG, Guenthoer J, O'Briant KC, Tewari M, Drescher CW, et al. Digital genomic quantification of tumor-infiltrating lymphocytes. *Science translational medicine*. 2013;5(214):214ra169.
27. Ai B, Liu H, Huang Y, Peng P. Circulating cell-free DNA as a prognostic and predictive biomarker in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(28):44583-95.
28. Gedvilaite V, Schweigert D, Cicenas S. Cell-free DNA in non-small cell lung cancer. *Acta Med Litu*. 2017;24(2):138-44.
29. van der Drift MA, Hol BE, Klaassen CH, Prinsen CF, van Aarssen YA, Donders R, et al. Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010;68(2):283-7.
30. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16368-73.

31. Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. 2002;48(3):421-7.
32. Tian C, Lu S, Fan Q, Zhang W, Jiao S, Zhao X, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8(+) or CD3(+) T lymphocytes and interleukin-2 expression in radically resected non-small cell lung cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(1):105-10.
33. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TBK, Veeriah S, et al. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;376(22):2109-21.
34. Urato AC, Peter I, Canick J, Lambert-Messerlian G, Pulkkinen A, Knight G, et al. Smoking in pregnancy is associated with increased total maternal serum cell-free DNA levels. *Prenat Diagn*. 2008;28(3):186-90.





ภาคผนวก ก

ตารางแสดง sequences ของ forward primer, reverse primer และ probe ที่ใช้ในการทำPCR
ในการศึกษา

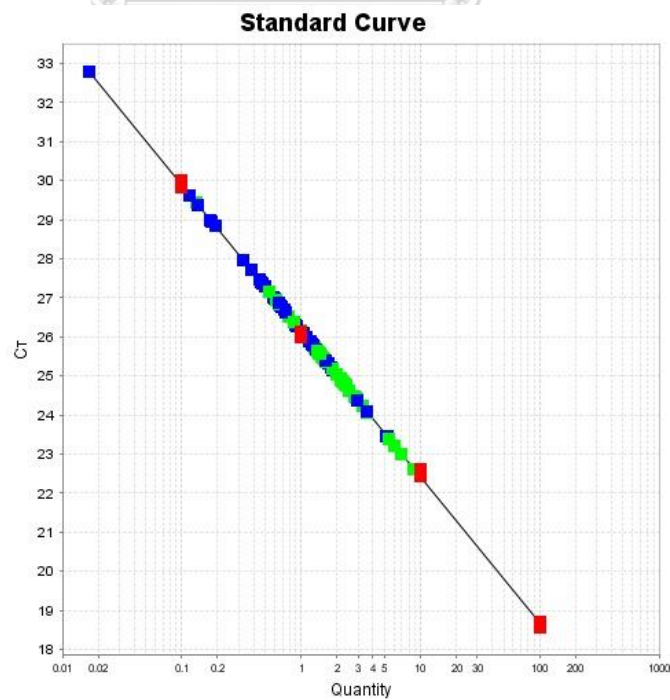
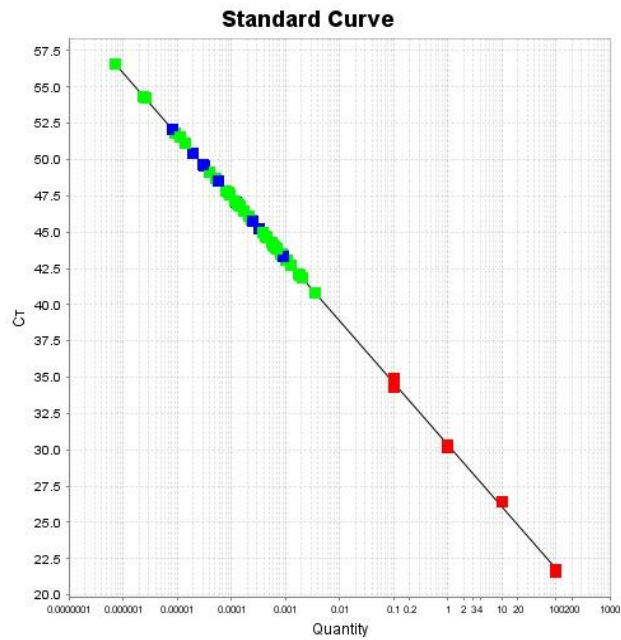
ชื่อ forward primer	Sequence (5' to 3')
V06-1	GTC CCC AAT GGC TAC AAT GTC TCC AGA TT
V06-5	AAG GAG AAG TCC CCA ATG GCT ACA ATG TC
V06-6	GAC AAA GGA GGA GTC CCG AAT GGC TAC AAC
V06-7	GTT CCC AAT GGC TAC AAT GTC TCC AGA TC
V06-8	CTC TAG ATT AAA CAC AGA GGA TTT CCC AC
V06-9	AAG GAG AAG TCC CCG ATG GCT ACA ATG TA
V18	ATT TTC TGC TGA ATT TCC CAA AGA GGG CC
V20-1	ATG CAA GCC TGA CCT TGT CCA CTC TGA CA

ชื่อ reverse primer	Sequence (5' to 3')
J1-1	TTA CCT ACA ACT GTG AGT CTG GTG CCT TGT CCA AA
J1-2	ACC TAC AAC GGT TAA CCT GGT CCC CGA ACC GAA
J1-3	ACC TAC AAC AGT GAG CCA ACT TCC CTC TCC AAA
J1-4	CCA AGA CAG AGA GCT GGG TTC CAC TGC CAA A
J1-5	ACC TAG GAT GGA GAG TCG AGT CCC ATC ACC AAA
J1-6	CCA TAC CTG TCA CAG TGA GCC TGG TCC CGT T
J2-1	CGG TGA GCC GTG TCC CTG GCC CGA A
J2-2	CCA GTA CGG TCA GCC TAG AGC CTT CTC CAA A
J2-3	ACT GTC AGC CGG GTG CCT GGG CCA AA
J2-4	AGA GCC GGG TCC CGG CGC CGA A
J2-5	GGA GCC GCG TGC CTG GCC CGA A
J2-6	CCA GCA CGG TCA GCC TGC TGC CG
J2-7	GTG AGC CTG GTG CCC GGC CCG AA

ชื่อ probe	ความจำเพาะ	Sequence (5' to 3')
V06b	V06-7,V06-9	CTGGAGTCAGCTGCTCCC
V06d	V06-1,V06-5,V06-6,V06-8,V06-9	TGCTCCCTCCCAGACATC
V18	V18	ATCCAGCAGGTAGTGCGAGG
V20	V20-1	CAGTGCCCATCCTGAAGACA

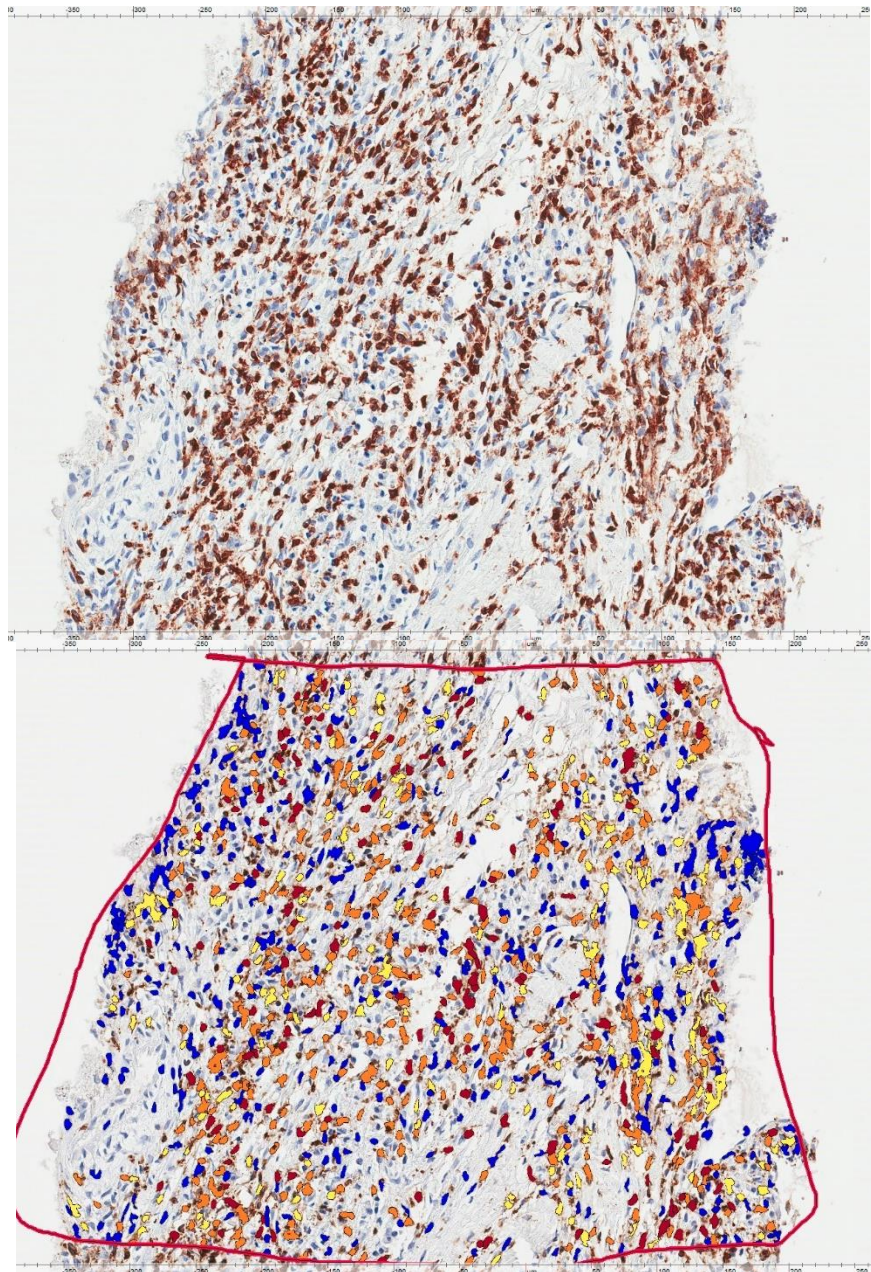
ภาคผนวก ข

กราฟ แสดงstandard curve สำหรับใช้ในการคำนวณหาปริมาณ DNA จากการทำ PCR ของ VDJ segment(กราฟบน)และRPP30(กราฟล่าง)



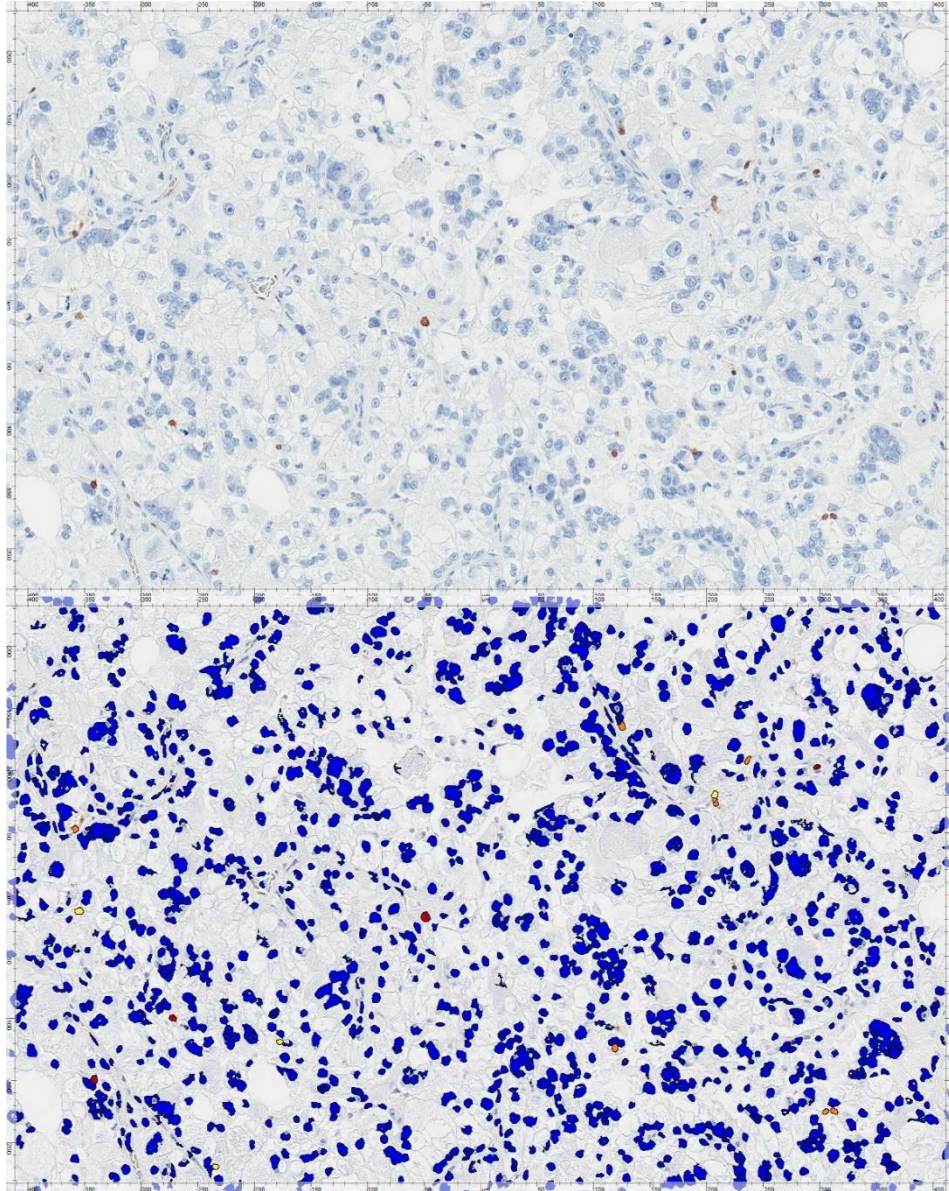
ภาคผนวก ค

รูปภาพ แสดงตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ทำการตรวจนับ CD3 positive TIL ซึ่งพบว่ามีส่วน TIL ที่สูง, ภาพบนคือภาพก่อนทำการนับด้วยโปรแกรม, ภาพล่างคือหลังทำการนับด้วยโปรแกรม



ภาคผนวก ง

รูปภาพ แสดงตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ทำการตรวจนับ CD3 positive TIL ซึ่งพบว่ามีส่วน TIL ที่น้อย,
ภาพบนคือภาพก่อนทำการนับด้วยโปรแกรม, ภาพล่างคือหลังทำการนับด้วยโปรแกรม



ภาคผนวก จ
แบบสอบถามข้อมูล

Page 1 of 5	
PID : <input type="text"/>	
prevalence of plasma non-tumor-derived circulating DNA originated from T-cell lymphocyte presenting in advanced non-small cell lung cancer	
Part A: Demographic characteristics at the first visit	
1. Date of birth <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> or age = <input type="text"/> years old <small>Enter in DD/MM/YYYY or enter in 25 year old, 20020401</small>	
2. Province of residence:First 2 zip code <input type="text"/>	
3. Gender: <input type="checkbox"/> 1. Male <input type="checkbox"/> 2. Female	
4. Weight: <input type="text"/> Kg. Height: <input type="text"/> cm.	
5. History of smoking exposure: <input type="checkbox"/> -9. Not available → Skip to Question #6	
1) Ever been a smoker? <input type="checkbox"/> 1. Yes <input type="checkbox"/> 2. No Skip to Question #6	
2) Duration of smoking: <input type="text"/> years <input type="checkbox"/> -9. Not available	
3) Duration after the last smoking: <input type="text"/> years <input type="checkbox"/> -8. Not stop yet <input type="checkbox"/> -9. Not available	
4) Average cigarettes smoked per day at time of smoking: <input type="text"/>	
Part B: Diagnosis	
6. Date of first diagnosed NSCLC: (1 st pathology date) <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>	
7. Tumor histology: <input type="checkbox"/> 1. Adenocarcinoma <input type="checkbox"/> 2. Squamous cell <input type="checkbox"/> 3. Large cell undiff <input type="checkbox"/> 4. NSCLC NOS <input type="checkbox"/> 5. Others	
8. Initial Staging: <input type="checkbox"/> Clinical staging <input type="checkbox"/> Surgical staging T= <input type="text"/> SIZE.....cm N= <input type="text"/> ___/___ M= <input type="text"/> Stage= <input type="text"/>	
9. Pathological data: Primary tumor location	
Grading.....	
Margin status	
Nodal staging <input type="checkbox"/> N1.....	
<input type="checkbox"/> N2.....	
<input type="checkbox"/> N3.....	
10. Treatment	
1) Surgery <input type="checkbox"/> 1. Yes	
<input type="checkbox"/> 2. No	
2) Adjuvant chemotherapy <input type="checkbox"/> 1. Yes <input type="checkbox"/> 2. No	
3) Regimen: <input type="checkbox"/> 1. Cis/Vino <input type="checkbox"/> 2. Cb/Pac	
<input type="checkbox"/> 3. Cis/Eto <input type="checkbox"/> 4. Others.....	
4) Radiation: <input type="checkbox"/> 1. Yes <input type="checkbox"/> 2. No	

		Page 2 of 5	
		PID : <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
5) Chemoradiation:	<input type="checkbox"/> 1. Yes	<input type="checkbox"/> 2. No	→ Skip to 7) <input type="text"/>
6) Chemoradiation regimen:	<input type="checkbox"/> 1. Cis/VP16	<input type="checkbox"/> 2. Cb/Pac	<input type="checkbox"/> 3. Cis/Vbl
7) Others	<input type="checkbox"/> 1. Yes	<input type="checkbox"/> 2. No	← <input type="text"/>
Part C: Patients status if recurrence disease			
11. Metastatic or recurrent Staging: T=	<input type="checkbox"/>	N=	<input type="checkbox"/>
		M=	<input type="checkbox"/>
12. Site of metastasis:	<input type="checkbox"/> 1. Bone	<input type="checkbox"/> 2. Lung	<input type="checkbox"/> 3. Liver
	<input type="checkbox"/> 4. Lymph node	<input type="checkbox"/> 5. Brain	<input type="checkbox"/> 6. Pleura
	<input type="checkbox"/> 7. Other, please specify.....		
13. ECOG performance status of patients upon diagnosis: score =	<input type="checkbox"/>	or	<input type="checkbox"/> -9. Not available
Part D: NSCLC Treatment for recurrence disease			
<i>1st Line Chemotherapy:</i>			
14. Regimens:	<input type="checkbox"/> 1. Platinum/Paclitaxel	<input type="checkbox"/> 2. Platinum/Gemcitabine	
	<input type="checkbox"/> 3. Platinum/Docetaxel	<input type="checkbox"/> 4. Platinum/Vinorelbine	
	<input type="checkbox"/> 5. Platinum/Others	<input type="checkbox"/> 6. Platinum as a single agent	
	<input type="checkbox"/> 7. Docetaxel	<input type="checkbox"/> 8. Pemetrexed	
	<input type="checkbox"/> 9. Gefitinib	<input type="checkbox"/> 10. Erlotinib	
	<input type="checkbox"/> 11. Other		
15. First date of the treatment:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> 215
16. Date of max response:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> 215
17. Max response:	<input type="checkbox"/> 1. CR	<input type="checkbox"/> 2. PR	<input type="checkbox"/> 3. SD <input type="checkbox"/> 4. PD <input type="checkbox"/> -9. Not available
18. Date of progression:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> 215
19. First date of the last chemotherapy cycle:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/> 215
20. Total	<input type="text"/>	cycles	
21. Reason stopping treatment:	<input type="checkbox"/> 1. PD	<input type="checkbox"/> 2. Complete	<input type="checkbox"/> 3. Intolerant
	<input type="checkbox"/> 4. Others		
22. Dose modification:	<input type="checkbox"/> 1. Yes	<input type="checkbox"/> 2. No	
23. AE:			
<i>2nd Line Chemotherapy:</i>			

		Page 3 of 5
		PID : <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
24. Regimens:	<input type="checkbox"/> 1. Platinum/Paclitaxel <input type="checkbox"/> 3. Platinum/Docetaxel <input type="checkbox"/> 5. Platinum/Others <input type="checkbox"/> 7. Docetaxel <input type="checkbox"/> 9. Gefitinib <input type="checkbox"/> 11. Other	<input type="checkbox"/> 2. Platinum/Gemcitabine <input type="checkbox"/> 4. Platinum/Vinorelbine <input type="checkbox"/> 6. Platinum as a single agent <input type="checkbox"/> 8. Pemetrexed <input type="checkbox"/> 10. Erlotinib
25. First date of the treatment:	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 2 <input type="text"/> 5	
26. Date of max response:	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 2 <input type="text"/> 5	
27. Max response:	<input type="checkbox"/> 1. CR <input type="checkbox"/> 2. PR <input type="checkbox"/> 3. SD <input type="checkbox"/> 4. PD <input type="checkbox"/> -9. Not available	
28. Date of progression:	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 2 <input type="text"/> 5	
29. First date of the last chemotherapy cycle:	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 2 <input type="text"/> 5	
30. Total	<input type="text"/> <input type="text"/> cycles	
31. Reason stopping treatment:	<input type="checkbox"/> 1. PD <input type="checkbox"/> 2. Complete <input type="checkbox"/> 3. Intolerant <input type="checkbox"/> 4. Others	
32. Dose modification:	<input type="checkbox"/> 1. Yes <input type="checkbox"/> 2. No	
33. AE:	
<i>3rd Line Chemotherapy:</i>		
34. Regimens:	<input type="checkbox"/> 1. Platinum/Paclitaxel <input type="checkbox"/> 3. Platinum/Docetaxel <input type="checkbox"/> 5. Platinum/Others <input type="checkbox"/> 7. Docetaxel <input type="checkbox"/> 9. Gefitinib <input type="checkbox"/> 11. Other	<input type="checkbox"/> 2. Platinum/Gemcitabine <input type="checkbox"/> 4. Platinum/Vinorelbine <input type="checkbox"/> 6. Platinum as a single agent <input type="checkbox"/> 8. Pemetrexed <input type="checkbox"/> 10. Erlotinib
35. First date of the treatment:	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 2 <input type="text"/> 5	
36. Date of max response:	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 2 <input type="text"/> 5	
37. Max response:	<input type="checkbox"/> 1. CR <input type="checkbox"/> 2. PR <input type="checkbox"/> 3. SD <input type="checkbox"/> 4. PD <input type="checkbox"/> -9. Not available	
38. Date of progression:	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 2 <input type="text"/> 5	
39. First date of the last chemotherapy cycle:	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> 2 <input type="text"/> 5	

Page 4 of 5
PID : <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 30px; height: 20px;" type="text"/>
40. Total <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> cycles
41. Reason stopping treatment: <input type="checkbox"/> 1. PD <input type="checkbox"/> 2. Complete <input type="checkbox"/> 3. Intolerant <input type="checkbox"/> 4. Others
42. Dose modification: <input type="checkbox"/> 1. Yes <input type="checkbox"/> 2. No
43. AE:
Part E: Last visit
44. The most recent status
1) Date assessed <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
2) Status: <input type="checkbox"/> 1. Death <input type="checkbox"/> 1. from Lung CA <input type="checkbox"/> 2. Others ...
Date of death: <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
<input type="checkbox"/> 2. Alive with disease <input type="checkbox"/> 3. Alive without disease
<input type="checkbox"/> 4. Lost to follow-up <input type="checkbox"/> 5. Others, specify.....
Part E: Last visit
Part F: investigation result
1. Non-tumor derived circulating tumor DNA from T cell lymphocyte <input type="checkbox"/> 1. Present <input type="checkbox"/> 2. absent
2. T-cell receptor beta chain:RPP20 ratio
T-cell receptor beta chain absolute copiesper ml of plasma
Remarks;
Date of completion this CRF <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> / <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Completed by

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล นายแพทย์ บวร วีระสีบพงศ์

Bowon Weerasubpong

วันเดือนปีเกิด วันที่ 26 ตุลาคม พ.ศ. 2530

สถานที่เกิด จังหวัดสงขลา

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2559-ปัจจุบัน กำลังศึกษาเป็นแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์
มะเร็งวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- พ.ศ. 2555-2558 สำเร็จการอบรมแพทย์ประจำบ้านสาขาวิชาอายุรศาสตร์ (ว.ว.
อายุรศาสตร์) ที่โรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดนครนายก

- พ.ศ. 2549-2554 สำเร็จการศึกษาปริญญาแพทยศาสตรบัณฑิต (พ.บ.) คณะ
แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เกรดเฉลี่ย 3.67 (เกียรตินิยมอันดับที่1)

- พ.ศ. 2543-2548 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนบางกะปิ
กรุงเทพฯ

- พ.ศ. 2537-2542 สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนบ้านบางกะปิ
กรุงเทพฯ

ประสบการณ์การทำงาน

- พ.ศ. 2555-2558 ปฏิบัติงานเป็นแพทย์ใช้ทุนที่โรงพยาบาล ศูนย์การแพทย์
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิ
โรฒ จังหวัดนครนายก