

การศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนเพื่อทำนายการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

The prediction of glottic cancer recurrence by immunohistochemical staining of  
associated proteins



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

Common Course

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนเพื่อทำนายการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง
โดย	น.ส.ศิวะพร ธนสาร
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ ศีลาวัดน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกำจร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิริพิพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สมบูรณ์ ศีลาวัดน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์นครินทร์ กิตกำจร)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดภิกา จินดาทิพย์)

..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ณัฐชยาน์ ช่วยเพ็ญ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(อาจารย์ ดร.นายแพทย์อาทิตย์ จินาวัดน์)

ศิวะพร ธนสาร : การศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนเพื่อทำนายการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่อง  
 สายเสียง. ( The prediction of glottic cancer recurrence by immunohistochemical  
 staining of associated proteins) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม :  
 รศ. ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกำธร

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมด 16 ชนิด ระหว่าง  
 กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำและกลุ่มที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ โดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่ฝังใน  
 พาราฟินบล็อกมาอ้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) ด้วยแอนติบอดี pRb780, c-  
 Met, Ki67, RPA32, CyclinD1, P53, HIF1alpha, Bcl2, BAX, BAK, Bclxl, PI3K, B-catenin, VEGF, CD44  
 และ P16 โดยการแสดงออกของโปรตีนจะถูกประเมินจากภาพถ่ายดิจิทัลโดยใช้ชุดซอฟต์แวร์ Imagescope  
 v.10.2.2.2352 (Aperio Technologies, USA) นำมาคำนวณค่ามัธยฐาน H-score และใช้สถิติ Receiver  
 operating characteristic (ROC) curve ในการเลือกจุดตัดที่เหมาะสม (cut off point) สำหรับแบ่งกลุ่มการ  
 แสดงออกของโปรตีนในผู้ป่วย จากนั้นหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลส่วนบุคคล ข้อมูลทางคลินิก และการ  
 แสดงออกของโปรตีนกับอัตราการกลับมาเป็นซ้ำ ผลการศึกษาพบว่า ค่ามัธยฐาน H-score ของแอนติบอดี  
 pRb780 เพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ ( $p=0.0012$ ) ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีน c-Met ลดลงใน  
 กลุ่มผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.0014$ ) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ  
 กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย Crude hazard ratio พบว่าการ  
 แสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง  
 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Hazard ratio=9.53, 95%CI=1.21-74.82) เมื่อวิเคราะห์ด้วย Adjusted hazard  
 ratio พบว่า การแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็ง  
 ช่องสายเสียง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Hazard ratio=8.73, 95%CI=1.09-69.75) กล่าวคือเมื่อผู้ป่วยที่มีการ  
 แสดงออกของโปรตีน pRb780 สูง ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีน c-Met ต่ำ จะมีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำได้ถึง  
 8.73 เท่า เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ต่ำ ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีน c-Met  
 สูง ดังนั้นการแสดงออกของโปรตีน pRb780 และ c-Met อาจใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพยากรณ์การกลับมาเป็น  
 ซ้ำของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงได้

สาขาวิชา      วิทยาศาสตร์การแพทย์  
 ปีการศึกษา    2564

ลายมือชื่อนิสิต .....  
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....  
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6174088230 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: glottic cancer, recurrence, immunohistochemistry

Siwaporn Thanasan : The prediction of glottic cancer recurrence by immunohistochemical staining of associated proteins. Advisor: Assoc. Prof. SOMBOON KEELAWAT, M.D. Co-advisor: Assoc. Prof. Nakarin Kitkumthorn, D.D.S.,Ph.D.

The objective of this study is to compare the 16 proteins expression between recurrent and non-recurrent glottic cancers. Pretreatment formalin-fixed paraffin-embedded tissues biopsies were stained for pRb780, c-Met, Ki67, Bcl2, RPA32, CyclinD1, P53, HIF1alpha, BAX, BAK, Bclxl, VEGF, PI3K, B-catenin, CD44 and p16. Expression of these 16 proteins was evaluated by digital image analysis using the Imagescope v.10.2.2.2352 software package (Aperio Technologies, USA) and was calculated by H-score. Receiver operating characteristic (ROC) curve was performed to select the best cut-off point of protein expressions for cancer recurrence prediction. The protein expressions and clinico-pathological data were correlated to recurrent rate and recurrence-free survival (RFS). The results indicated that pRb780 expression significantly increased in recurrent group compared to non-recurrent group. ( $p=0.0012$ ). On the other hand, c-Met expression significantly decreased in recurrent group compared to non-recurrent group. ( $p=0.0014$ ). The expression of combination proteins had an even stronger correlation with recurrent rate and RFS. Patients with high expression of pRb780 and low-expression of c-Met showed higher rate of recurrent than patients with low expression of pRb780 and high expression of c-Met. (Hazard ratio= 9.53; 95%CI=1.21-74.82). The adjusted hazard ratio of patients with high expression of pRb780 and low-expression of c-Met were 8.73 (Hazard ratio=8.73, 95%CI=1.09-69.75) compared to patients with low expression of pRb780 and high expression of c-Met. Evaluation of pRb780 and c-Met expression may be used as the predictive and prognostic information for patients with recurrent glottic cancer.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature .....

Academic Year: 2021

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมบูรณ์ ศีลาวัฒน์ หัวหน้าภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ทันตแพทย์ นครินทร์ กิตติภรณ์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย ให้คำปรึกษาเมื่อพบปัญหา รวมทั้งช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์(พิเศษ) แพทย์หญิงภัทรนถน มหัทธนสกุล อาจารย์ประจำภาควิชา โสต ศอ นาสิกวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับโรคมะเร็งช่องสายเสียงและคำแนะนำในการเก็บข้อมูลคนไข้ อันเป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. เดภิชา จินดาทิพย์ อาจารย์ ดร. ณัฐยานี ช่วยเพ็ญ และอาจารย์ ดร.นายแพทย์ อาทิตย์ จินาวัฒน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ พร้อมทั้งให้ความรู้ แนวทางการทำวิจัยและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพยาธิวิทยาและภาควิชา โสต ศอ นาสิกวิทยาทุกท่าน ที่สนับสนุนให้ใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในการทำวิจัย และให้กำลังใจจนกระทั่งงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัย "ทุน ๙๐ ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย" ที่สนับสนุนการสร้างผลงานวิจัย จนสามารถนำไปเผยแพร่ให้เกิดประโยชน์ในระดับนานาชาติ

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บุคคลในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ แรงผลักดัน รวมถึงให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศิวะพร ธนสาร

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	2
1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	3
1.6 ขอบเขตของการวิจัย.....	4
1.7 ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	4
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
1.9 คำสำคัญ.....	4
1.10 คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	6
กล่องเสียง (Larynx).....	6
มะเร็งกล่องเสียง.....	8
อุบัติการณ์ของมะเร็งกล่องเสียง.....	9



ระยะของโรคมะเร็งกล่องเสียง (Staging of laryngeal cancer).....	10
การรักษาโรคมะเร็งกล่องเสียง .....	15
การแพร่กระจายและลูกกลมของมะเร็งกล่องเสียง .....	16
การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งกล่องเสียง .....	16
การแสดงออกของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นมะเร็งซ้ำ.....	17
โปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle).....	18
โปรตีนในกลุ่ม proliferation .....	20
โปรตีนกลุ่ม Apoptosis .....	21
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการจำลองตัวของดีเอ็นเอ .....	23
โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโต.....	23
โปรตีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลูกกลมของมะเร็ง.....	24
โปรตีนกลุ่มการสร้างเส้นเลือด (Angiogenesis) .....	24
โปรตีนที่เกี่ยวข้องการอยู่รอดของเซลล์ (Cell survival).....	26
เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry).....	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	29
3.1 กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา.....	29
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology) .....	29
3.3 ขั้นตอนการวิจัย วิธีการดำเนินงาน .....	32
3.4 การเปิดเผยข้อมูลแสดงตัวตนผู้ป่วย .....	34
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	34
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	36
4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา .....	36
4.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน 16 ชนิด โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อ ผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง.....	39

4.3 การทดสอบเพื่อการวินิจฉัยโรค (Diagnostic testing) โดยวิธีวิเคราะห์เส้นโค้ง Receiver Operating Characteristics (ROC).....	43
4.4 การวิเคราะห์อุบัติการณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงโดย Kaplan-Meier.....	45
4.5 การวิเคราะห์ปัจจัยที่สัมพันธ์กับอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงโดยสถิติ Cox's Proportional Hazards Model .....	51
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ .....	54
5.1 อภิปรายผล .....	54
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	58
5.3 ข้อดีของการทำวิจัย .....	59
5.4 ข้อจำกัดของการทำวิจัย.....	59
5.5 ข้อเสนอแนะ .....	59
บรรณานุกรม.....	60
ภาคผนวก.....	70
ประวัติผู้เขียน.....	76

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดง subsites ทางกายวิภาคของกล่องเสียง.....	7
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่ามัธยฐาน H-score ระหว่างกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำและกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำที่ย้อมด้วยแอนติบอดี 16 ชนิด.....	41
ตารางที่ 3 ผลของปัจจัยส่วนบุคคล ทางคลินิก และปัจจัยทางโมเลกุล ต่อระยะเวลาการเป็นมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำสำหรับตัวแปรแรงนับ.....	47
ตารางที่ 4 ผลของปัจจัยส่วนบุคคล ทางคลินิก และปัจจัยทางโมเลกุล ต่อระยะเวลาการเป็นมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำสำหรับตัวแปรแรงนับ (ต่อ).....	48
ตารางที่ 5 ผลของปัจจัยที่สัมพันธ์กับอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงโดยสถิติ Cox's Proportional Hazards Model.....	52
ตารางที่ 6 แสดงรายละเอียดของแอนติบอดีที่ใช้สำหรับการย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี.....	70
ตารางที่ 7 การตั้งค่าการทำงานของโปรแกรม Aperio Imagescope ในการการประเมินการติดสีของนิวเคลียส (Nuclear V9).....	73
ตารางที่ 8 การตั้งค่าการทำงานของโปรแกรม Aperio Imagescope ในการการประเมินการติดสีของ.....	74
ตารางที่ 9 การตั้งค่าการทำงานของโปรแกรม Aperio Imagescope ในการการประเมินการติดสีของ.....	75

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework) .....	3
ภาพประกอบ 2 ลักษณะทางกายวิภาคของกล่องเสียง .....	6
ภาพประกอบ 3 แสดงเยื่อที่ปกคลุมบริเวณส่วนต่างๆ ของกล่องเสียง .....	8
ภาพประกอบ 4 ลักษณะของมะเร็งกล่องเสียง.....	9
ภาพประกอบ 5 การเปลี่ยนแปลงของเยื่อผิวชนิด Squamous cell ที่มีลักษณะของ Dysplasia. 10	
ภาพประกอบ 6 ลักษณะของเซลล์มะเร็ง Carcinoma in Situ (CIS) .....	11
ภาพประกอบ 7 ระยะของโรคมะเร็งกล่องเสียง.....	13
ภาพประกอบ 8 ลักษณะของเซลล์มะเร็ง.....	14
ภาพประกอบ 9 โปรตีนที่มีส่วนทำให้เกิดการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง .....	17
ภาพประกอบ 10 การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ เปลี่ยนจาก G1 เข้าสู่ระยะ S.....	19
ภาพประกอบ 11 การแสดงออกของ Ki67 ในแต่ละระยะของวัฏจักรของเซลล์ที่แตกต่างกัน (36)...	20
ภาพประกอบ 12 วิถีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย [Intrinsic (Mitochondria) pathway] (42).....	22
ภาพประกอบ 13 การควบคุมการเติบโตผ่านของผนังหลอดเลือด .....	25
ภาพประกอบ 14 ควบคุมกระบวนการของเซลล์ผ่านทาง c-Met pathway.....	26
ภาพประกอบ 15 การถ่ายทอดสัญญาณของเซลล์โดยผ่านวิถี PI3K/Akt .....	27
ภาพประกอบ 16 ตัวอย่างการติดสีของแอนติบอดีเมื่อย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีในผู้ป่วย โรคมะเร็งกล่องเสียงกลุ่มที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ .....	37
ภาพประกอบ 17 ตัวอย่างการติดสีของแอนติบอดีเมื่อย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีในผู้ป่วย โรคมะเร็งกล่องเสียงกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำ .....	38
ภาพประกอบ 18 เปรียบเทียบการติดสีของนิวเคลียสที่ย้อมด้วยแอนติบอดี pRb780, กำลังขยาย 40x: 18a = ภาพการติดสีของแอนติบอดี pRb780 เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 18b =	

ภาพการติดสีของแอนติบอดี pRb780 ที่ประเมินจากโปรแกรม Aperio Imagescope V.10.2.2.2352..... 40

ภาพประกอบ 19 เปรียบเทียบการติดสีของไซโตพลาสซึมที่ย้อมด้วยแอนติบอดี c-Met, กำลังขยาย 40x: 19a = ภาพการติดสีของแอนติบอดี c-Met เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 19b = ภาพการติดสีของแอนติบอดี c-Met ที่ประเมินจากโปรแกรม Aperio Imagescope V.10.2.2.2352.... 40

ภาพประกอบ 20 เปรียบเทียบการติดสีของเซลล์เมมเบรนที่ย้อมด้วยแอนติบอดี CD44, กำลังขยาย 40x: 20a = ภาพการติดสีของแอนติบอดี CD44 เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 20b = ภาพการติดสีของแอนติบอดี CD44 ที่ประเมินจากโปรแกรม Aperio Imagescope V.10.2.2.2352..... 40

ภาพประกอบ 21 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน H-score ของแอนติบอดี pRb780; 21a = การติดสีของแอนติบอดี pRb780 ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำและ 21b = การติดสีของแอนติบอดี pRb780 ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ..... 42

ภาพประกอบ 22 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน H-score ของแอนติบอดี c-Met; 22a = การติดสีของแอนติบอดี c-Met ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำและ 22b = การติดสีของแอนติบอดี c-Met ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ ..... 43

ภาพประกอบ 23 พื้นที่ใต้โค้ง ROC เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดี pRb780 ..... 44

ภาพประกอบ 24 พื้นที่ใต้โค้ง ROC เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดี c-Met..... 44

ภาพประกอบ 25 กราฟเส้นโค้ง แสดงอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งช่องสายเสียง..... 45

ภาพประกอบ 26 กราฟเปรียบเทียบอัตราการปลอดการกลับมาเป็นซ้ำของผู้ป่วยมะเร็งช่องสายเสียง จำแนกตามผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 (Kaplan-Meier Curve) ..... 50

ภาพประกอบ 27 กราฟเปรียบเทียบอัตราการปลอดการกลับมาเป็นซ้ำของผู้ป่วยมะเร็งช่องสายเสียง จำแนกตามผลการแสดงออกของโปรตีน c-Met (Kaplan-Meier Curve)..... 50

ภาพประกอบ 28 กราฟเปรียบเทียบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงจำแนกตามลักษณะของเซลล์มะเร็ง (Kaplan-Meier Curve) ..... 53

ภาพประกอบ 29 กราฟเปรียบเทียบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงจำแนกตาม การแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met (Kaplan-Meier Curve)..... 53

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประเทศ อัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งพบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และแนวโน้มของการเป็นมะเร็งในประเทศไทยที่สูงขึ้น มีปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมจำนวนมากที่อาจเป็นสาเหตุ ส่วนใหญ่พบว่าเกิดจากสารก่อมะเร็งที่พบในชีวิตประจำวัน ปนเปื้อนมากับอาหารและเครื่องดื่ม สารเคมีจากการสูบบุหรี่ รังสีต่าง ๆ หรือแม้แต่การได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลานาน ๆ นอกจากนั้นพฤติกรรมการกินอาหารที่เปลี่ยนไป การรับประทานอาหารที่มีกากใยน้อยลง ประชากรอ้วนมากขึ้น การสูบบุหรี่และดื่มเหล้า เป็นต้น จึงทำให้จำนวนผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งนับวันมีแต่จะเพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะเป็นผู้หญิงหรือผู้ชายก็มีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคมะเร็งได้

มะเร็งกล่องเสียง เป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองของกลุ่มโรคทางเดินหายใจส่วนบน โดยอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งกล่องเสียงทั่วโลกอยู่ที่ 2.76 ราย/ปี ต่อประชากร 100,000 คน(1) มีรายงานในปี 2018 พบมีผู้ป่วยรายใหม่ที่เป็นมะเร็งกล่องเสียงในประเทศไทยถึง 1,572 ราย โดยชนิดของมะเร็งกล่องเสียงที่พบได้บ่อยที่สุดคือ squamous cell carcinoma โดยสาเหตุของการเสียชีวิตมักเกิดจากการลุกลามและแพร่กระจายของมะเร็ง และอีกหนึ่งสาเหตุของการเสียชีวิตของโรคมะเร็งกล่องเสียง คือ การกลับมาเป็นซ้ำ (recurrence) ภายหลังจากที่ได้รับการรักษาแล้ว อาการของโรคมะเร็งที่กลับมาเป็นซ้ำจัดเป็นโรคมะเร็งที่มีความรุนแรงสูง โอกาสในการรักษาหายมีน้อย ดังนั้นการรักษาส่วนใหญ่จึงเป็นการรักษาเพื่อบรรเทาอาการ หรือประคับประคองพองอาการ มีรายงานในต่างประเทศพบว่าการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งกล่องเสียงในระยะรุนแรง (Advance stage) มีมากถึง 50% (2)

กล่องเสียงแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ กล่องเสียงส่วนที่อยู่เหนือช่องสายเสียง (Supraglottis) ส่วนบริเวณช่องสายเสียง (Glottic) และส่วนที่อยู่ใต้บริเวณช่องสายเสียง (Subglottis) ซึ่งบริเวณช่องสายเสียงพบว่าเป็นตำแหน่งที่พบการเกิดรอยโรคของมะเร็งได้มากที่สุด รองลงมาคือ บริเวณ Supraglottis และ Subglottis ตามลำดับ โดยลักษณะของเซลล์มะเร็งที่พบได้บ่อยในบริเวณช่องสายเสียงคือ well differentiated และ Moderate differentiate

ปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายกลไกการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงได้ เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล และองค์ประกอบของเซลล์ที่ซับซ้อน ทำให้การดำเนินของโรค การรักษา และผลของการรักษาในผู้ป่วยแต่ละรายให้ผลที่แตกต่างกัน ปัจจุบันการหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) กำลังเป็นที่นิยมเนื่องจากสามารถนำมาพยากรณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งได้ โดยงานวิจัยในหลายๆประเทศมีการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนก่อนและหลังการรักษาด้วยรังสีหรือการให้เคมีบำบัด พบว่า การแสดงออกของโปรตีนก่อนและหลังการรักษาในผู้ป่วยรายเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงนับว่าเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาว่าการแสดงออกโปรตีนก่อนการรักษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงในผู้ป่วยแต่ละรายจะมีค่าเท่ากันหรือไม่ และสามารถนำมาใช้พยากรณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงได้หรือไม่ เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิกำเนิด การดูแลรักษา การป้องกัน และการลดอุบัติการณ์ของการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งช่องสายเสียงได้

## 1.2 คำถามของการวิจัย

- 1.2.1 การแสดงออกในระดับโปรตีนของเนื้อเยื่อมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrent glottic cancer) กับมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrent glottic cancer) ก่อนการรักษามีความแตกต่างกันหรือไม่
- 1.2.2 ปัจจัยส่วนบุคคล ปัจจัยทางคลินิก และปัจจัยทางโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงหรือไม่

## 1.3 สมมติฐานของการวิจัย

- 1.3.1 การแสดงออกในระดับโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrent glottic cancer) กับมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrent glottic cancer) ก่อนการรักษา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
- 1.3.2 พบปัจจัยส่วนบุคคล ปัจจัยทางคลินิก และปัจจัยทางโมเลกุลมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง

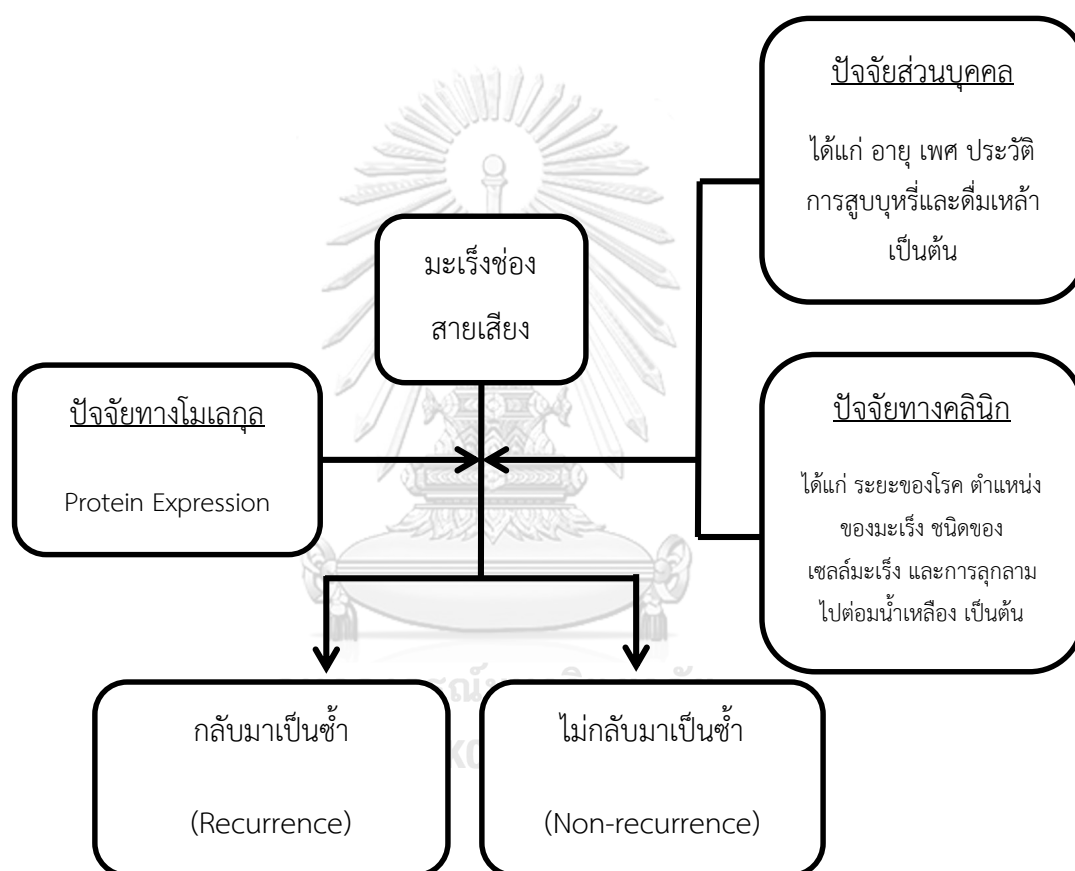
## 1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.4.1 เพื่อหาแอนติบอดี (antibody) ที่เหมาะสมสำหรับการทำนายการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงจากเนื้อเยื่อมะเร็งช่องสายเสียงก่อนการรักษา

1.4.2 เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกในระดับโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำกับมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำก่อนการรักษา

1.4.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยส่วนบุคคล ปัจจัยทางคลินิก และปัจจัยทางโมเลกุลกับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง

### 1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



ภาพประกอบ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



## 1.6 ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมด 16 ชนิด ในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ และไม่กลับมาเป็นซ้ำก่อนการรักษา โดยนำเนื้อเยื่อมะเร็งช่องสายเสียงที่ฝังในพาราฟินบล็อกมาข้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) เพื่อหาแอนติบอดีที่ดีที่สุดในการพยากรณ์การกลับมาเป็นซ้ำของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง

## 1.7 ข้อยกจำกัดของงานวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยฉบับนี้เป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลัง ทำให้ข้อมูลส่วนบุคคล ข้อมูลทางคลินิก และข้อมูลทางพยาธิวิทยาบางส่วนที่ทบทวนจากเวชระเบียนเก่า อาจจะไม่ครบถ้วนสมบูรณ์ หรืออาจมีข้อมูลบางส่วนที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาจากหลายโรงพยาบาลขาดหายไป แนวทางการแก้ไขคือ การสัมภาษณ์ผู้ป่วยเพื่อให้ได้ข้อมูลการรักษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนมากที่สุด

ชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งกล่องเสียงในพาราฟินบล็อกที่นำมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในงานวิจัยครั้งนี้ อาจมีปริมาณเซลล์มะเร็งไม่เพียงพอในการย้อมสีพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมีซึ่งมีผลต่อการรายงานผล แนวทางการแก้ไข คือ นำเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในพาราฟินดังกล่าวมาข้อมด้วยสีมาตรฐานฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin) เพื่อดูปริมาณของเซลล์มะเร็งก่อนก่อนนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

## 1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.8.1 พบแอนติบอดีที่เหมาะสม สามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง และนำไปสู่การรักษาในอนาคตได้
- 1.8.2 ทราบถึงประโยชน์ของการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งช่องสายเสียงเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาทั่วโลกสำหรับการป้องกันการกลับมาเป็นซ้ำได้
- 1.8.3 ใช้เป็นความรู้พื้นฐานของโรคมะเร็งช่องสายเสียงได้

## 1.9 คำสำคัญ

Glottic cancer, recurrence, immunohistochemistry

### 1.10 คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

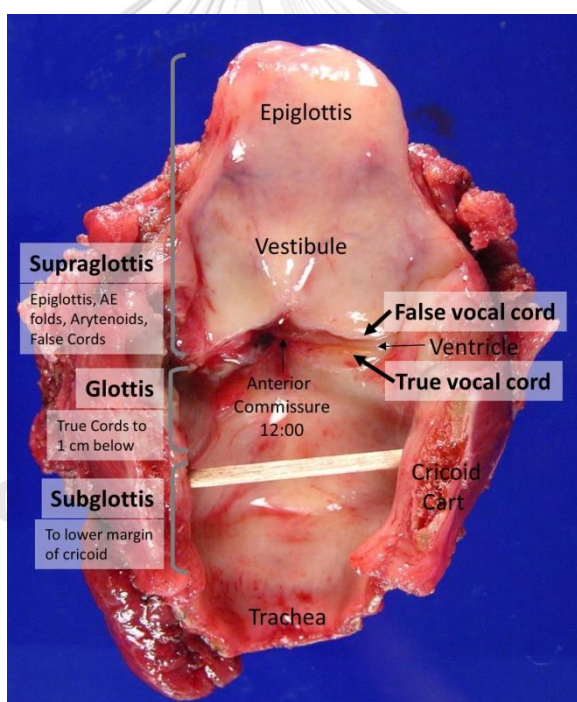
pRb	=	phospho-retinoblastoma
SCC	=	Squamous cell carcinoma
CIS	=	Carcinoma in situ
HR	=	Hazard Ratio
CCRT	=	Concurrent Chemoradiotherapy
RTU	=	Ready to use
CC1	=	Cell conditioner #1
DFS	=	Disease free survival
ROC	=	Receiver Operating Characteristic
OS	=	Overall survival

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### กล่องเสียง (Larynx)

กล่องเสียง (Larynx) เป็นอวัยวะที่อยู่บริเวณลำคอ ทำหน้าที่เป็นแหล่งเกิดเสียงให้คนเราสามารถเปล่งเสียงออกมาได้ โดยมีสายเสียง (Vocal Cords) เป็นอวัยวะสำคัญที่ทำให้เกิดเสียง ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของกล่องเสียงจะอยู่ในแนวกลางด้านหน้าของลำคอ มีกล้ามเนื้อ (strap muscle) คลุมอยู่ทางด้านหน้า สามารถคลำได้ส่วนนูนชัดเจนของกระดูก hyoid และ cricoids นอกจากนี้กล่องเสียงยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ การหายใจเข้า-ออก การกลืนอาหาร และทำหน้าที่ป้องกันท่อลมในระบบทางเดินหายใจ ลักษณะทางกายวิภาคของกล่องเสียง แบ่งเป็น Supraglottis, Glottis และ Subglottis (ตารางที่ 1)



ภาพประกอบ 2 ลักษณะทางกายวิภาคของกล่องเสียง

(ที่มา: <http://pathology.ucla.edu/workfiles/Education/Residency%20Program/Gross%20Manual/Total%20Laryngectomy.pdf>)

**Supraglottis** คือ บริเวณที่อยู่เหนือช่องสายเสียง ประกอบด้วย Epiglottis (ทั้งด้าน lingual และ laryngeal surface), Aryepiglottic folds, Arytenoids, False vocal cords และ Ventricle ขอบเขตล่างสุดคือ เส้นที่ลากแนวยาวขนานพื้น (horizontal plain) ผ่านขอบด้านข้างของ

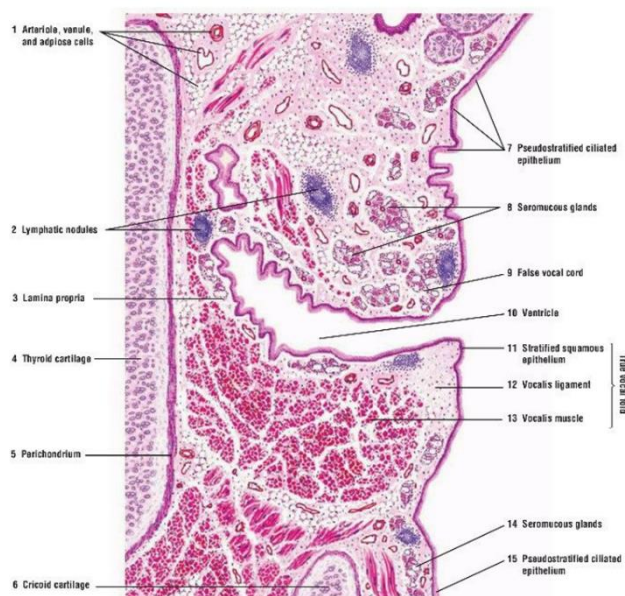
Ventricle บริเวณส่วนต่อของ superior surface ของ True vocal fold ซึ่งเยื่อ mucosa บริเวณ Supraglottis มีความแตกต่างกัน โดยในบริเวณด้านหน้าและด้านหลังของ epiglottis ไปจนถึงด้าน posterior tongue จะบุด้วยเซลล์ชนิด stratified squamous epithelium ถัดลงมาบริเวณด้านล่างของ epiglottis จะมีลักษณะของเซลล์ที่บุด้วย ciliated pseudostratified columnar epithelium ซึ่งบริเวณ submucosa ของบริเวณนี้จะเต็มไปด้วย mucous gland และ lymphatic vessels

**Glottis** หรือ ช่องสายเสียง ประกอบด้วย True vocal fold ทั้งผิวหน้าด้านบนและล่าง, Anterior และ Posterior commissures ขอบเขตล่างสุดคือ 1 เซนติเมตร ต่ำกว่าแนวขนานพื้น (horizontal plain) ของบริเวณ Supraglottis ผ่านขอบด้านข้างของ Ventricle ทั้งสองข้าง ในส่วนของเยื่อบริเวณ true vocal cords เป็น stratified squamous epithelium ปกคลุมชั้น lamina propria ที่เป็น vocal ligament บริเวณนี้มี lymphatic vessels ที่น้อย

**Subglottis** คือ ส่วนที่ต่อจากขอบล่างสุดของบริเวณ Glottis จนถึงขอบล่างของกระดูกอ่อน Cricoid เยื่อบริเวณ subglottis เป็นแบบ pseudostratified columnar epithelium(3) ดังแสดงในภาพประกอบ 3

ตารางที่ 1 แสดง subsites ทางกายวิภาคของกล่องเสียง

Site	Subsite
<b>Glottis</b>	Suprahyoid epiglottis Infrahyoid epiglottis Aryepiglottic fold, right and left (laryngeal surfaces) Arytenoids, right and left ventricular bands
<b>Glottis</b>	True vocal cords, right and left (including the anterior and posterior commissures)
<b>Subglottis</b>	No separate subsets defined



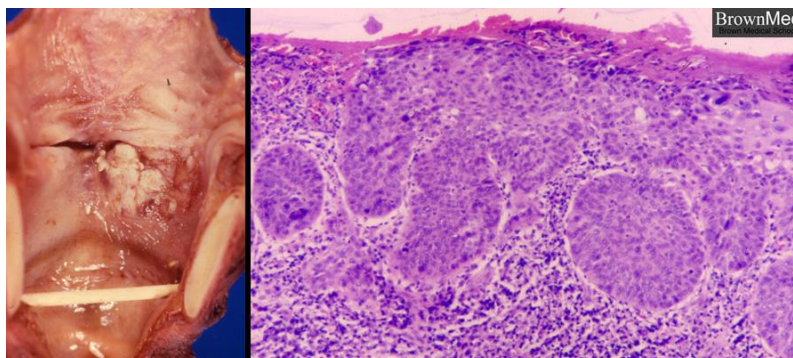
ภาพประกอบ 3 แสดงเยื่อที่ปกคลุมบริเวณส่วนต่างๆ ของกล่องเสียง

(ที่มา: <https://anatomytopics.wordpress.com/2008/12/07/7-the-anatomy-histology-and-development-of-the-pharynx-larynx-and-thyroid-gland/>)

### มะเร็งกล่องเสียง

มะเร็งกล่องเสียง (Laryngeal cancer) คือ โรครที่เกิดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อบริเวณกล่องเสียง ได้รับความเสียหายและเจริญเติบโตผิดปกติ กลายเป็นเนื้อร้ายหรือมะเร็ง มักพบในผู้สูงอายุและพบได้ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง โดยมีปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ เช่น การดื่มแอลกอฮอล์(4, 5) การสูบบุหรี่(6) รวมถึงเคยมีประวัติสมาชิกในครอบครัวเคยเป็นมะเร็งกล่องเสียง เป็นต้น อาการของมะเร็งกล่องเสียง จะแตกต่างจากอาการของมะเร็งประเภทอื่น ๆ อาการที่พบบ่อย ได้แก่ เสียงแหบ รู้สึกเจ็บขณะกลืน หรือมีอาการกลืนลำบาก พบก้อนนูนหรือมีอาการบวมที่ลำคอ ไออย่างหนัก ไอเป็นเลือด ปวดคอ ปวดหู หายใจลำบาก มีเสียงหวีดในขณะหายใจ น้ำหนักลดลง รู้สึกเหนื่อย เมื่อยล้า เป็นต้น โดยพยาธิสภาพที่พบบ่อยที่สุด คือ มะเร็งกล่องเสียงชนิด squamous cell carcinomas (SCC) มะเร็งชนิดนี้ เกิดจากเยื่อเมือก ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า เป็น infiltrative, ulcerative, exophytic ลักษณะของเซลล์มะเร็งที่พบมีได้ตั้งแต่ well-differentiated จนถึง poorly-differentiated

โดยพยาธิสภาพ บริเวณช่องสายเสียงจะพบเซลล์มะเร็งชนิด well differentiate หรือ moderately differentiated มากที่สุด ส่วนมะเร็งชนิด poorly-differentiated มักพบบริเวณ supraglottis(7)



ภาพประกอบ 4 ลักษณะของมะเร็งกล่องเสียง

(ที่มา: <https://www.brown.edu/academics/biomed/departments/pathology/residency/digital-pathology-library/head-and-neck/larynx-and-hypolarynx/squamous-cell-carcinoma-larynx>)

### อุบัติการณ์ของมะเร็งกล่องเสียง

เมื่อเทียบการระบาดทั่วโลกในปี 2017 พบผู้ป่วยรายใหม่ที่เป็นมะเร็งกล่องเสียงทั่วโลกเฉลี่ยอยู่ที่ 2.76 รายต่อประชากร 100,000 คน โดยพบอุบัติการณ์ผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่สูงสุดในแถบทวีปยุโรป (5.45 รายต่อประชากร 100,000 คน) และในกลุ่มของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งกล่องเสียงอยู่ที่ 2.59 รายต่อประชากร 100,000 คน(1)

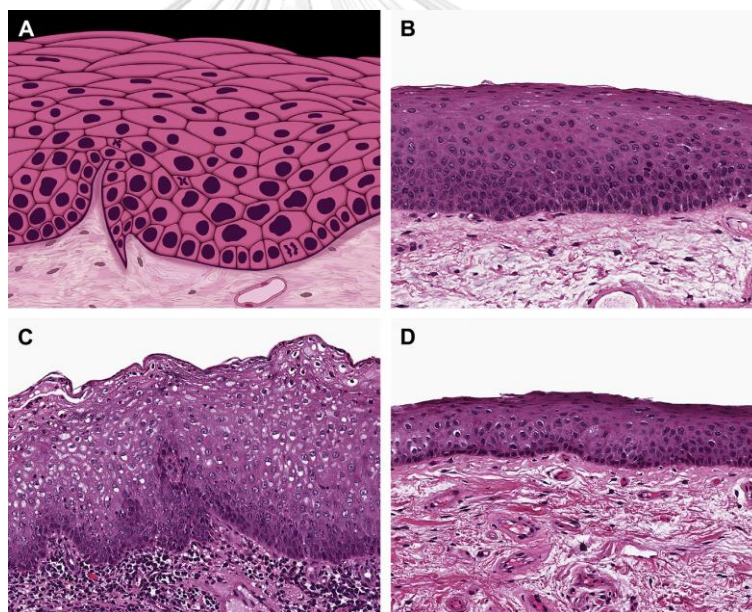
จากข้อมูลสำนักงานสถิติแห่งชาติระบุว่าอัตราการเกิดมะเร็งกล่องเสียงในประเทศไทยลดลงจาก 4.0 รายในปี 1996 เป็น 2.7 รายในปี 2011 (ต่อประชากร 100,000 คน) ต่อมาในปี 2020, Globocan Thailand รายงานผู้ป่วยรายใหม่ที่เป็นมะเร็งกล่องเสียงในประเทศไทยทั้งหมด 1,800 ราย โดยพบผู้ป่วยในผู้ชายมากกว่าหญิง (10:1) ซึ่งสอดคล้องกับที่รายงานในทวีปยุโรปก่อนหน้านี้ โรคมะเร็งกล่องเสียงมีอัตราการรอดชีวิตโดยรวมสูงสุด 2 และ 5 ปีเมื่อเทียบกับมะเร็งในช่องปาก (oropharyngeal) และ hypopharyngeal(8) มะเร็งกล่องเสียงสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกตำแหน่งของบริเวณกล่องเสียง โดยในคนไทยจะพบมะเร็งกล่องเสียงบริเวณ glottis มากที่สุด รองลงมา คือ supraglottis และ subglottis ตามลำดับ



### ระยะของโรคมะเร็งกล่องเสียง (Staging of laryngeal cancer)

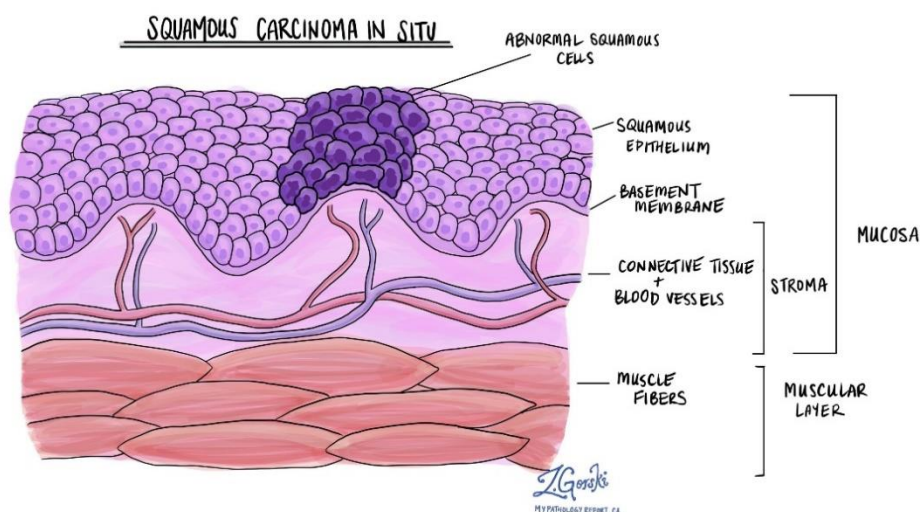
ระยะก่อนเป็นมะเร็ง (Precancerous Lesions) คือการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุกล่องเสียงก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งมีด้วยกัน 2 แบบ คือ Squamous dysplasia และ Carcinoma in Situ

Squamous Dysplasia คือ การเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของเยื่อบุผิวชนิด Squamous ลักษณะของเซลล์ที่พบว่ามีความผิดปกติของ Dysplasia มีดังต่อไปนี้ พบ nuclear hyperchromatism พบมีลักษณะของนิวเคลียสที่โตเด่น พบมีการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม พบมีนิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่หรือเล็กมาก พบมีความผิดปกติของเยื่อหุ้มนิวเคลียส หรือมีจำนวน mitosis เพิ่มขึ้น เป็นต้น (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 การเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิวชนิด Squamous cell ที่มีลักษณะของ Dysplasia (A) ลักษณะของ nuclear hyperchromasia และ มีจำนวน mitosis เพิ่มขึ้น, (B) มีการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม (C) ลักษณะของ nuclear irregularities (D) พบลักษณะของ cellularity with nuclear atypia.(9)

Carcinoma in Situ (CIS) เป็นมะเร็งชนิดไม่แพร่กระจาย โดยลักษณะของเซลล์มะเร็งมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ภายในชั้นของ Epithelium ยังไม่ลุกลามเข้าสู่ชั้นของ Basement membrane (3)



ภาพประกอบ 6 ลักษณะของเซลล์มะเร็ง Carcinoma in Situ (CIS)

(ที่มา: <https://www.mypathologyreport.ca/severe-keratinizing-squamous-dys>)

การแบ่งระยะของมะเร็ง ตามความรุนแรงของโรคโดยสมาคมมะเร็งในสหรัฐอเมริกา (American Joint Committee of Cancer Staging, AJCC version 8) ปี 1997 ได้แบ่งระยะของมะเร็งกล่องเสียง ตามระบบ TNM Classification (10) ดังนี้

Tis (Tumor in situ) หมายถึง มะเร็งระยะต้นๆ ที่อยู่บนชั้นของ epithelium ยังไม่มีแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อกล่องเสียงปกติ

T (tumor) หมายถึง ขนาดหรือการลุกลามของมะเร็งที่บริเวณตำแหน่งต้นตอ (Primary tumor) โดยปกติแล้วระยะของมะเร็งจะมีอยู่ 4 ระยะ ขึ้นอยู่กับตำแหน่งต้นตอของแต่ละที่ ซึ่งจะไม่เหมือนกัน

การแบ่งระยะของมะเร็งบริเวณ Supraglottis

T1 หมายถึง มะเร็งอยู่บริเวณตำแหน่งเดียวของ supraglottis และลักษณะของ vocal cord มีสภาพปกติ



- T2 หมายถึง มะเร็งกระจายไปมากกว่าหนึ่งแห่งของ supraglottis หรือ glottis แต่ vocal cord ยังสามารถเคลื่อนไหวได้ดี
- T3 หมายถึง มะเร็งยังกระจายอยู่ในกล่องเสียง แต่ลักษณะของ vocal cord ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้
- T4 หมายถึง มะเร็งกระจายออกไปบริเวณ thyroid cartilage หรือกระจายออกไปสู่น้ำเยื่อ บริเวณอื่นนอกบริเวณกล่องเสียง เช่น oropharynx tissues บริเวณคอ เป็นต้น

#### การแบ่งระยะของมะเร็งบริเวณ Glottis

- T1 หมายถึง มะเร็งอยู่บริเวณ vocal cord ข้างเดียวหรือ 2 ข้าง อาจกระจายไปยัง anterior หรือ posterior commissures แต่ลักษณะของ vocal cord ยังสามารถเคลื่อนไหวได้ แบ่งเป็น 2 subtypes คือ

T1a คือ ลักษณะของมะเร็งอยู่บริเวณ vocal cord ข้างเดียว

T1b คือ ลักษณะของมะเร็งกระจายไปที่บริเวณ vocal cord ทั้ง 2 ข้าง

- T2 หมายถึง มะเร็งกระจายไปยังบริเวณ supraglottis หรือ subglottic แต่ vocal cord ยังสามารถเคลื่อนไหวได้
- T3 หมายถึง มะเร็งกระจายอยู่ภายในกล่องเสียง แต่ vocal cord ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้
- T4 หมายถึง มะเร็งกระจายไปที่ cricoids หรือ thyroid cartilage หรือกระจายไปยังน้ำเยื่อ นอกบริเวณกล่องเสียง เช่น oropharynx หรือ soft tissues บริเวณคอ เป็นต้น
- N (node) หมายถึง ต่อมน้ำเหลืองที่ตรวจพบจากการคลำหรือถ่ายภาพรังสีจะมี 3 ระยะ คือ
- N0 คือ ไม่พบต่อมน้ำเหลือง
- N1 คือ พบต่อมน้ำเหลืองชนิดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 เซนติเมตร จำนวน 1 ก้อน

N2 คือ พบต่อมน้ำเหลืองขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 6 เซนติเมตร อาจมีจำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ก้อน

M (metastasis) หมายถึง การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ ที่ห่างไกลออกไปโดย

M0 หมายถึง ไม่มีการแพร่กระจาย

M1 หมายถึง มีการแพร่กระจายไปที่อวัยวะอื่นที่ห่างไกล โดยทั่วไป การแพร่กระจายของมะเร็งกล่องเสียงมักจะพบว่ามีแพร่กระจายไปยัง ปอด สมอง และกระดูก

Stage Grouping(11) คือระยะของโรคมะเร็ง เมื่อนำ ระยะ T M และ N มาจัดกลุ่ม สามารถแบ่งได้ทั้งหมด 4 ระยะได้ ดังต่อไปนี้

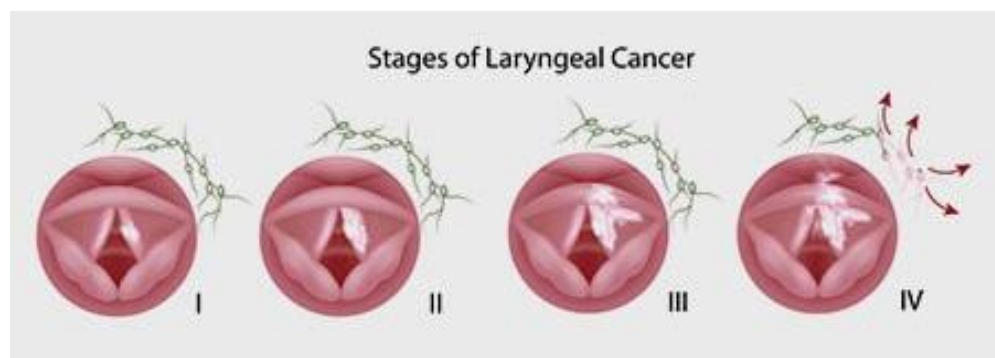
Stage 0 ได้แก่ TisNoM0

Stage I ได้แก่ T1N0M0

Stage II ได้แก่ T2N0M0

Stage III ได้แก่ T3N0M0, T1N1M0, T2N1M0 และ T3N1M0

Stage IV ได้แก่ T4N0M0, T4N1M0, AnyTN2N3M0 และ AnyTAnyNM1



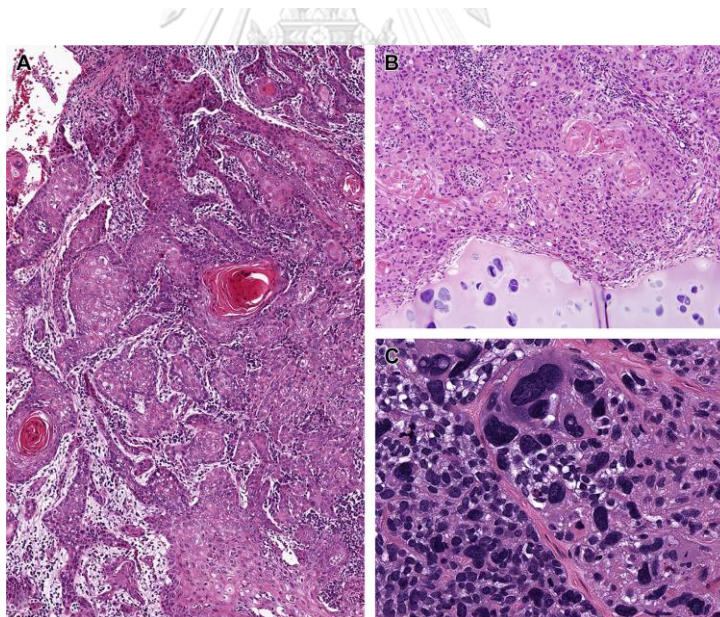
ภาพประกอบ 7 ระยะของโรคมะเร็งกล่องเสียง

(ที่มา: <https://www.yashodahospitals.com/diseases-treatments/throat-cancer-types-causes-symptoms-diagnosis-treatment/>)

### การแบ่งระยะตาม Histological grade

นอกจากจะมีการแบ่งระยะตาม T M N แล้ว เรายังสามารถแบ่งระยะของโรคตาม Histologic Grade คือ เป็นการวัดผลจากลักษณะของเซลล์มะเร็งภายใต้กล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ การแบ่งระยะตาม Histologic Grade จะช่วยให้แพทย์สามารถวางแผนการรักษาได้ โดยแบ่งเป็น 3 แบบ คือ

1. Well differentiated คือ ลักษณะของเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ปกติ มักจะเติบโตช้าและมีโอกาสน้อยที่จะแพร่กระจาย
2. Moderately differentiated คือ ลักษณะของเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะผิดปกติมากขึ้นและเติบโตเร็วขึ้นเล็กน้อย
3. Poorly differentiated คือ ลักษณะของเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะแตกต่างจากเซลล์ปกติมากและอาจเติบโตได้เร็วกว่า



ภาพประกอบ 8 ลักษณะของเซลล์มะเร็ง

Well differentiated (A), Moderately differentiated (B) และ Poorly differentiated (C) (9)

## การรักษาโรคมะเร็งกล่องเสียง

ผู้ป่วยโรคมะเร็งกล่องเสียงที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้อง มักจะเสียชีวิตภายใน 1 ปี ซึ่งสาเหตุของการเสียชีวิตมักเกิดจากการลุกลามแพร่กระจายของมะเร็ง จนอุดกกล่องเสียงทำให้หายใจไม่สะดวก หรือลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียง ได้แก่ หลอดเลือดแดงใหญ่ของลำคอทำให้เกิดเลือดออกมากผิดปกติ หรือกดหลอดอาหาร ทำให้ไม่สามารถกลืนอาหารได้ เป็นต้น ถ้าหากได้รับการรักษาตั้งแต่ระยะแรกจะสามารถช่วยให้ผู้ป่วยหายขาด และสามารถกลับมาพูดได้เป็นปกติ หรือแม้ในรายที่เป็นระยะลุกลามที่ได้รับการผ่าตัดกล่องเสียง มักจะมีชีวิตที่ยืนยาว และสามารถฝึกพูดจนสามารถสื่อสารกับคนอื่นได้ วิธีการรักษามะเร็งกล่องเสียงมีหลายวิธี ได้แก่

- 1) การผ่าตัดกล่องเสียง (Laryngectomy)(12) การรักษาโดยการผ่าตัดเป็นวิธีทางเลือกอันดับแรกของการรักษาโรคมะเร็งกล่องเสียง หลัก ๆ แล้วจะประกอบด้วย การผ่าตัดกล่องเสียงออกบางส่วนและการผ่าตัดกล่องเสียงออกทั้งหมด ซึ่งการผ่าตัดย่อมแตกต่างกันและผู้เชี่ยวชาญจะยึดตามสภาพอาการของผู้ป่วย โดยผู้ป่วยโรคมะเร็งกล่องเสียงที่ได้รับการผ่าตัดกล่องเสียงออกหมดจะมีแผลบริเวณลำคอและกลายเป็นบุคคลที่พิการทางการสื่อสาร การปรับบทบาทมาเป็นผู้ป่วยอย่างถาวรทำให้เกิดความวิตกกังวล นอกจากนี้การหายใจทางรูเปิดหลอดลมบริเวณคอตลอดชีวิตทำให้สูญเสียภาพลักษณ์
- 2) การฉายรังสี (Radiation therapy)(13) เป็นการรักษาที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งกล่องเสียงในระยะแรกเริ่ม หรือเป็นผู้ป่วยที่มีสภาพร่างกายอ่อนแอไม่เหมาะกับการผ่าตัด
- 3) การให้ยาเคมีบำบัด (Chemotherapy)(14) เป็นการรักษาที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งกล่องเสียงระยะลุกลามที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ มักใช้รักษาเพื่อช่วยลดอาการที่เกิดจากก้อนมะเร็งขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะรักษาด้วยการฉายรังสีเพียงอย่างเดียว และช่วยลดการแพร่กระจายของก้อนมะเร็งที่มีขนาดใหญ่ การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดร่วมกับการฉายรังสีในช่วงเวลาเดียวกัน (Concurrent Chemoradiotherapy; cCRT) จะช่วยลดขนาดของก้อนมะเร็งให้เล็กลง นับว่าเป็นวิธีการรักษาที่ดีกว่าการรักษาเพียงวิธีใดวิธีหนึ่ง และการรักษาวิธีนี้อาจช่วยให้สามารถรักษากล่องเสียงไว้ได้

- 4) การใช้รังสีรักษาร่วมกับยารักษาตรงเป้า (Targeted therapy)(15) เป็นการรักษาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง โดยให้ยาหรือสารไปยับยั้งกระบวนการส่งสัญญาณระดับเซลล์ ซึ่งเป็นต้นเหตุของการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง

#### การแพร่กระจายและลูกกลมของมะเร็งกล่องเสียง

1. การแพร่กระจายโดยตรง โดยโรคมะเร็งกล่องเสียงระยะสุดท้ายมักจะแพร่กระจายโดยแทรกซึมลงไป ในชั้นเยื่อของกล่องเสียงไปยังอวัยวะข้างเคียง เช่น ต่อมไทรอยด์ ซึ่งเป็นอวัยวะที่อยู่ติดกับกล่องเสียงทางด้านหน้า และหลอดอาหาร ซึ่งเป็นอวัยวะที่อยู่ติดกับกล่องเสียงทางด้านหลัง
2. การลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลือง(16) โดยจะแพร่กระจายไปยังท่อน้ำเหลืองบริเวณส่วนบนของลำคอ
3. การแพร่กระจายทางหลอดเลือด ซึ่งเซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายไปตามการไหลเวียนของเลือดทั่วร่างกายได้ เช่น ไปปอด ตับ ไต กระดูก สมอง เป็นต้น จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งกล่องเสียงมักมีการแพร่กระจายที่ปอดมากที่สุด(17)

#### การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งกล่องเสียง

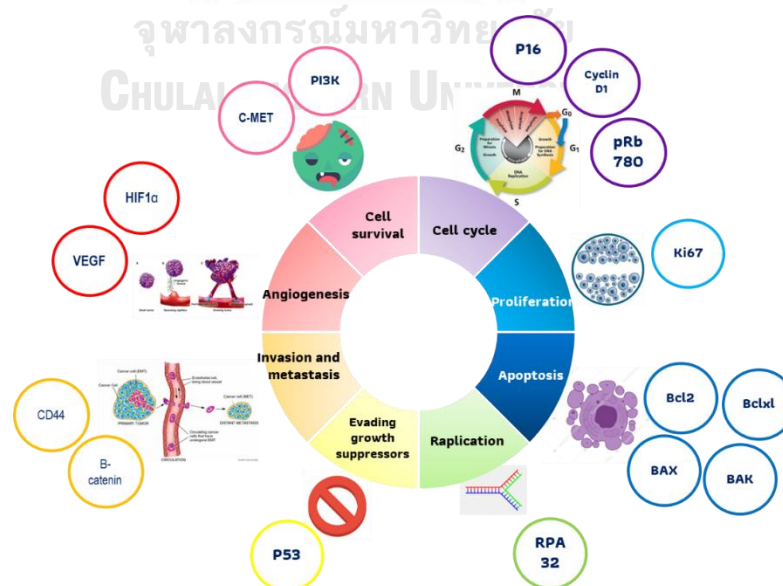
มะเร็งช่องสายเสียงเป็นมะเร็งที่พบได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับบริเวณ supraglottic และ subglottic พบว่าการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี อัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งกล่องเสียงในระยะที่ 1 คือ 5-13% และ ในระยะที่ 2 ประมาณ 25-30% (18, 19) นอกจากนี้บริเวณช่องสายเสียง (glottic) เป็นบริเวณที่พบว่ามีอาการกลับมาเป็นซ้ำได้ถึง 71% (20) โดยอัตราการรอดชีพ 5 ปีของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งช่องสายเสียง (glottic tumor) เท่ากับ 65% ซึ่งสูงกว่าบริเวณที่ไม่ใช่ช่องสายเสียง (supraglottic และ subglottic (20) โดยอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงที่ค่อนข้างสูง เป็นผลมาจากการขาดเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัย และความเข้าใจเกี่ยวกับอนุวิทยากระดับโมเลกุลของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบริเวณช่องสายเสียง โดยประมาณ 15% ของมะเร็งช่องสายเสียงที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีการฉายรังสีมักจะพบว่าการดื้อต่อรังสีรักษา (radio resistance) ซึ่งเป็นสาเหตุของการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งในช่วง 12 เดือน และยังทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเออีกด้วย การรักษาด้วยวิธีการฉายรังสีเป็นการรักษาเพื่อกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์และลดการเจริญเติบโตของเนื้องอก โดยควบคุมผ่านวัฏจักรของเซลล์หรือควบคุมการตายของเซลล์ (21)

การผ่าตัดเพื่อนำก้อนเนื้อที่เป็นมะเร็งออกไม่หมด สามารถทำให้มีโอกาสเกิดเป็นมะเร็งซ้ำได้ค่อนข้างสูง ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่ยอมหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง เช่น การสูบบุหรี่และดื่มเหล้า ทำให้มีโอกาสเกิดเป็นมะเร็งซ้ำค่อนข้างสูงเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยทางคลินิกที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง ได้แก่ Tumor staging (22), ตำแหน่งที่ตั้งของก้อนเนื้ออก (23) และการที่มะเร็งกระจายไปยังบริเวณ anterior commissure ก็เป็นตัวบ่งชี้การพยากรณ์โรคที่ไม่ดีภายหลังจากการฉายรังสีอีกด้วย (24)

ปัจจุบันได้มีการค้นคว้า ศึกษาสาเหตุของการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง โดยจากการศึกษาพบว่ามี 3 ปัจจัยหลัก ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง ได้แก่

1. ปัจจัยส่วนบุคคล เช่น สุขภาพโดยทั่วไปที่ไม่ดีของผู้ป่วย (25) ประวัติการดื่มแอลกอฮอล์ และประวัติการสูบบุหรี่อย่างต่อเนื่อง (26) เป็นต้น
2. ปัจจัยทางคลินิก เช่น วิธีการรักษา ระยะของโรคมะเร็งที่สูงขึ้น (27) ลักษณะของเซลล์มะเร็งที่พบ การลุกลามไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลือง และการลุกลามของมะเร็งไปยังบริเวณ anterior commissure เป็นต้น
3. ปัจจัยทางโมเลกุล ได้แก่ การแสดงออกของโปรตีนในกลุ่มต่างๆ ก็มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นมะเร็งซ้ำ

การแสดงออกของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นมะเร็งซ้ำ



ภาพประกอบ 9 โปรตีนที่มีส่วนทำให้เกิดการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง

โปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle)

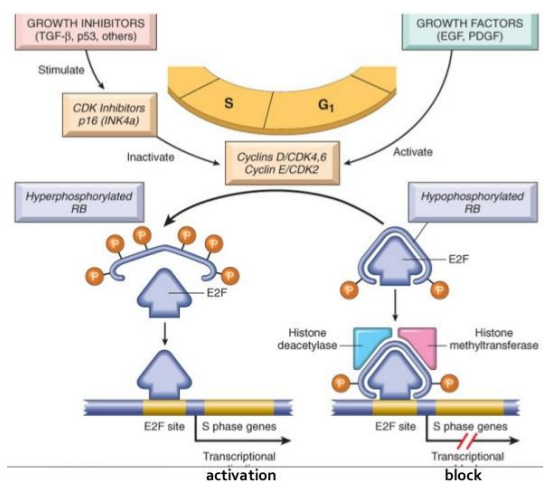
a) **Cyclin D1**

Cyclin D1 เป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการแบ่งตัวของเซลล์ ทำหน้าที่ให้ cell progression ผ่านระยะ G1 โดยในสภาวะปกติจะถูกยับยั้งด้วยโปรตีน p16 และถูกกระตุ้นเมื่อจับกับ CDK4/Cyclin D และ CDK6/Cyclin D ดังนั้นการทำหน้าที่ของ cyclin-dependent kinase ที่ผิดปกติ จะทำให้เกิดการสูญเสียการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ ซึ่งพบได้ในมะเร็งหลาย ๆ ชนิด รวมถึงการแสดงออกของ cyclin D1 ที่มากกว่าปกติจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิด local recurrence นอกจากนี้มีการศึกษาของ C.-F. Hwang และคณะพบว่า การแสดงออกของ Cyclin D1 และ p16 มีความสัมพันธ์กับ local recurrence ในมะเร็งโพรงจมูกภายหลังจากที่ได้รับการฉายรังสีแล้ว (28)

b) **Retinoblastoma protein (Rb)**

โปรตีน retinoblastoma (Rb) ทำหน้าที่คอยควบคุมให้แต่ละขั้นวงจรชีวิตของเซลล์ดำเนินไปตามปกติ อย่างเช่น ในระยะ G0 หรือ G1 โปรตีน Rb จะอยู่ในรูปที่มีหมู่ฟอสเฟตในระดับต่ำ (hypophosphorylated Rb) ทำให้จับกับโปรตีน E2F ซึ่งเป็น transcription protein ไว้ไม่ให้เข้าจับกับ promoter หรือ enhancer ของยีนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ขั้นเจริญเติบโต Cyclin D จะทำหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟตในกับโปรตีน Rb ทำให้มีหมู่ฟอสเฟตในระดับที่สูงขึ้น (hyperphosphorylated Rb) จนไม่สามารถจับกับ E2F ไว้ได้ ทำให้เซลล์ที่อยู่ในระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S (ภาพประกอบ 10) จากนั้น โปรตีน Rb จึงไปกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนจากกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวในระยะ mitosis เมื่อพ้นระยะแบ่งตัวไปแล้ว เอนไซม์ phosphatase จะสลายหมู่ฟอสเฟตออกบางส่วน ทำให้โปรตีน Rb กลับมาอยู่ในรูปที่มีหมู่ฟอสเฟตในระดับต่ำอีกครั้งเป็นการยุติการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนั้นเมื่อมีสภาวะที่ทำให้โปรตีน Rb มีหมู่ฟอสเฟตในระดับที่สูง จะทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยไม่สิ้นสุด และพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งได้ (29)





ภาพประกอบ 10 การควบคุมวัฏจักรของเซลล์ เปลี่ยนจาก G1 เข้าสู่ระยะ S

(ที่มา: <https://guardianesdelgenoma.wordpress.com/category/informacion/>)

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน pRb ในมะเร็งกล่องเสียงของ Kamal Morshed และคณะ พบว่า การแสดงออกของโปรตีน pRb มีความสัมพันธ์กับระยะของมะเร็ง (Tumor staging) และยังพบว่าในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกล่องเสียงแล้วมีการแสดงออกของโปรตีน pRb ในระดับสูง (>50%) จะมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำกว่า ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน pRb ต่ำ (<50%) (30)

ปี 2019, Li-Ang Lee และคณะ ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน pRb ในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง พบว่า การแสดงออกของโปรตีน pRb มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง(31)

### c) โปรตีน p16

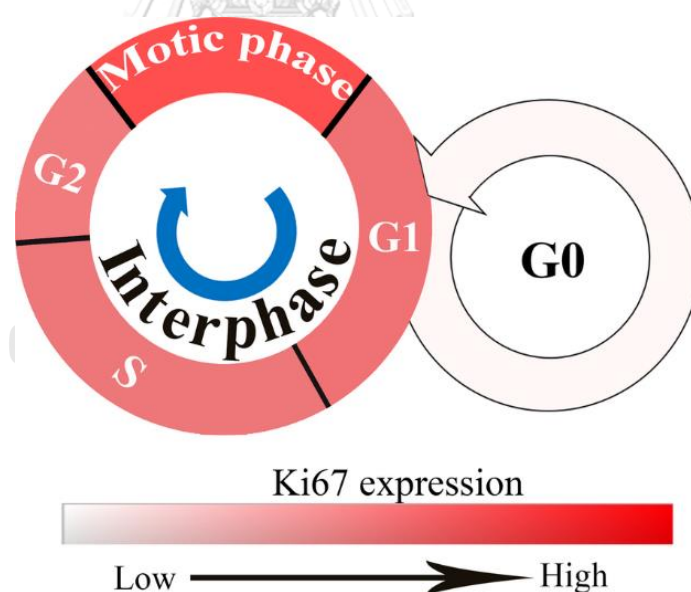
โปรตีน p16 จัดอยู่กลุ่ม tumor suppressor protein ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ผ่านทาง retinoblastoma protein (Rb) ในระยะ S phase โดยโปรตีน p16 ทำหน้าที่เป็นตัวจับกับ CDK4/6 เพื่อที่จะไม่ให้เกิดปฏิกิริยา cyclin D-CDK4/6 complex ทำให้เซลล์ไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการแบ่งตัวได้(32) การแสดงออกของโปรตีน p16 พบได้ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งปอดมดลูก มะเร็งลำไส้ มะเร็งเต้านม เป็นต้น



จากการศึกษาของ C.-F. Hwang และคณะ ได้ศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงจมูก พบว่า การสูญเสีย cyclin D1 และ p16 มีความสัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำภายหลังการฉายรังสีรักษา(33)

### โปรตีนในกลุ่ม proliferation

Ki67 เป็นโปรตีนที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ถึงการแบ่งตัวของเซลล์ (cell proliferation) การแสดงออกของ Ki67 สามารถพบได้ในทุกระยะในวัฏจักรของเซลล์ตั้งแต่ระยะ G1, S, G2 และพบมากสุดในระยะ mitotic แต่จะไม่พบในระยะ G0 (ภาพประกอบที่ 11)(34) นอกจากนี้โปรตีน Ki67 ยังเป็นตัวบอกความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งอีกด้วย โดยหากเซลล์มะเร็งมีความสามารถในการแบ่งตัวมากค่า Ki67 จะสูงซึ่งสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ในทางเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี การย้อม Ki67 จะช่วยประเมิน ดัชนีการเพิ่มจำนวน (proliferation index, PI) ในเซลล์มะเร็งได้ มักถูกนำมาใช้ทางพยาธิวิทยาเพราะสามารถช่วยประเมินได้ว่ามีเซลล์มะเร็งอยู่ในวงจรเซลล์ (cell cycle) มากน้อยเท่าใด โดยนิยามรายงานเป็นร้อยละของเซลล์มะเร็งที่ย้อมติดสี Ki67 เปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์มะเร็งทั้งหมด (35)



ภาพประกอบ 11 การแสดงออกของ Ki67 ในแต่ละระยะของวัฏจักรของเซลล์ที่แตกต่างกัน (36)

จากการศึกษาในปี 2000 ของ Christian Sittel และคณะ ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในกลุ่ม proliferation ได้แก่ Ki67 (MIB1), p53 และ Lewis-X (LeuM1) ในตัวอย่างผู้ป่วย

มะเร็งกล่องเสียง ระยะ T1 และ T2 โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม recurrent laryngeal cancer 21 ราย และกลุ่ม non-recurrent laryngeal cancer 26 ราย พบว่า ค่าเฉลี่ยของ Ki67 ในกลุ่ม recurrence laryngeal cancer ( $20.02\% \pm 8.37\%$  SD) มากกว่ากลุ่ม non-recurrence laryngeal ( $9.95\% \pm 8.86\%$  SD) อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติที่  $p$  value = 0.001 (37)

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Ki67 ในมะเร็งชนิดอื่น ๆ เช่น จากการศึกษาของ Reiki Nishimura และคณะได้ระบุว่า โปรตีน Ki67 เป็นตัวพยากรณ์เวลาการเกิดซ้ำในมะเร็งเต้านมระยะแรก โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมพบว่า ในผู้ป่วยที่มีดัชนี Ki67 มากกว่า 50% นั้นจะพบการกลับมาเป็นมะเร็งซ้ำภายใน 2 ปีหลังจากการผ่าตัด และในผู้ป่วยที่มีดัชนี Ki67 น้อยกว่า 20% นั้นจะพบว่ามีโอกาสกลับมาเป็นมะเร็งซ้ำอีกครั้งภายใน 10 ปี (38)

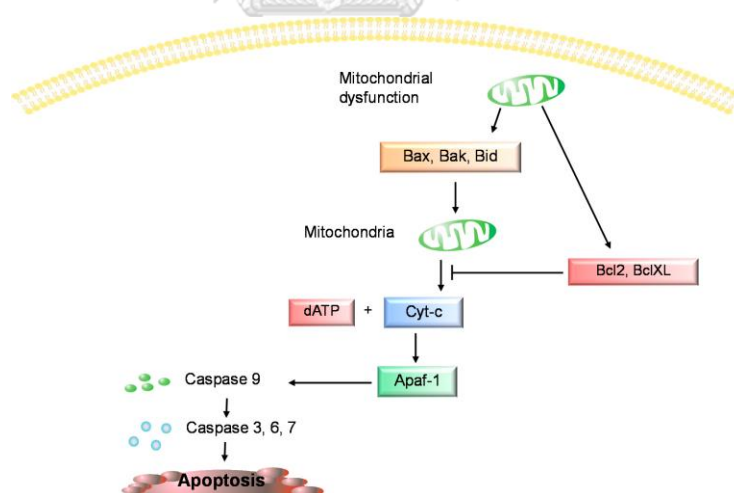
#### โปรตีนกลุ่ม Apoptosis

Apoptosis เป็นแบบแผนการตายของเซลล์ (programmed cell death) ที่ควบคุมโดยยีน มีบทบาทสำคัญในการพัฒนา และรักษาสสมดุลของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ มีลักษณะคือ เซลล์เกิดการสูญเสียปริมาตรของเซลล์ (loss of cell volume) เยื่อหุ้มเซลล์หดแฟบ (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) โครมาตินเกาะกลุ่ม (chromatin aggregation) และ ดีเอ็นเอถูกย่อยเป็นชิ้นเล็ก (endonucleocytic degradation of DNA into nucleosomal fragments) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์จะเกิดภายหลังจากขบวนการเชื่อมโยงของการสัญญาณภายในเซลล์ (cascade of cell signalling) และ ขบวนการที่อาศัยเอนไซม์ caspase ที่เป็นตัวกลาง (caspase-mediated events) โดยการควบคุมของโปรตีนที่ทำให้เกิดการตาย (proapoptotic proteins) และโปรตีนยับยั้งไม่ให้เกิดการตาย (antiapoptotic proteins)

Apoptosis ถูกควบคุมโดยยีนหลายตัวเช่น tumor suppressor genes เช่น p53 และ Tensin Homolog Deleted อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 10 (PTEN gene) และ oncogenes เช่น AKT และ Bcl2 และมีโมเลกุลเกี่ยวข้องหลายกลุ่มเช่น กลุ่ม anti-apoptotic proteins (Bcl2 และ BclXL) และ กลุ่ม pro-apoptotic proteins (Apaf-1, Bax, Bak และ caspases) (39) การตายของเซลล์แบบ Apoptosis เกิดขึ้นได้ 2 วิธีคือ วิธีภายในหรือวิธีไมโทคอนเดรีย [Intrinsic (Mitochondria) pathway] และ วิธีภายนอกหรือวิธีตัวรับการตาย [Extrinsic (Death receptor) pathway] วิธีจาก

ภายในที่มีไมโทคอนเดรียเป็นตัวกลางเกิดเมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าต่างๆเช่น แสงอัลตราไวโอเล็ต รังสีแกมมา ภาวะเครียดออกซิเดชัน หรือการใช้ยาเคมีบำบัด (oxidative stress) ที่ทำให้เกิดการชำรุดเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้น ส่วนวิถีภายนอกหรือวิถีตัวรับการตาย [Extrinsic (Death receptor) pathway] นั้น มักจะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของร่างกายที่ผิดปกติถูกกำจัดด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (Lymphocytes) หรือชนิดแมคโครเฟจ (Macrophages)

มีรายงานว่า pro- และ anti-apoptotic protein เกี่ยวข้องกับวิถีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย [Intrinsic (Mitochondria) pathway] โดยมีโปรตีนกลุ่ม Bcl2 Family ทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลการตายของเซลล์ (40) anti-apoptotic protein ได้แก่ Bcl2 และ BclXL ทำหน้าที่ในการยับยั้งการปลดปล่อย cytochrome c (Cyt-c) ในขณะที่โปรตีน Bax, Bak และ BH3 จัดอยู่ในกลุ่ม proapoptotic protein โดยส่งเสริมการปลดปล่อย Cyt-c และ deoxyadenosine triphosphate (dATP) จากไมโทคอนเดรีย ทำให้ Cyt-c จับกับ apoptotic protease activating factor (Apaf-1) เพื่อสร้าง multimeric complex ที่รับ และกระตุ้น procaspase 9 ซึ่งจะเปิดใช้งาน caspase 3 ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ (ภาพประกอบ 12) (41)



ภาพประกอบ 12 วิถีภายในหรือวิถีไมโทคอนเดรีย [Intrinsic (Mitochondria) pathway] (42)

BAX และ Bcl2 เป็นโปรตีนที่สำคัญในการควบคุม apoptotic บทบาทของ Bcl2 เป็นตัวยับยั้งการตายของเซลล์ (43) การแสดงออกมากเกินไปของ Bcl2 ในเนื้อเยื่อบางชนิดเช่นมะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งเม็ดเลือดขาวบ่งบอกถึงการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี(44) นอกจากนี้ยังพบว่าการ

แสดงออกของ Bcl2 ในมะเร็งกล่องเสียงมีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อรังสี (radioresistance) อีกด้วย (21)

BclXL เป็นหนึ่งในโปรตีน Bcl2 antiapoptotic family(45) BclXL ทำหน้าที่จับกับ proapoptotic proteins ได้แก่ BAK ผ่านทาง BH3 เป็นการป้องกันการตายของเซลล์ผ่านวิถีของไมโทคอนเดรีย(46, 47) ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการแสดงออกมากเกินไปของ antiapoptotic protein เช่น Bcl2 และ BclXL บ่อยครั้ง เกี่ยวข้องกับเคมีบำบัดและความต้านทานต่อรังสี (radioresistance)(48) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกที่มากเกินไปของ BclXL ในกลุ่ม recurrent laryngeal cancer เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อของผู้ป่วยในรายเดียวกัน (49)

#### *โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการจำลองตัวของดีเอ็นเอ*

Replication protein A (RPA) เป็นโปรตีนที่จับกับ ssDNA-binding protein (SSB) คอมเพล็กซ์ที่ประกอบด้วยสามหน่วยย่อย คือ RPA1 (70 kD), RPA2 (32 kD) และ RPA3 (14 kD) มีความเกี่ยวข้อง และเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมของ DNA จำนวนมากรวมถึงการซ่อมแซม homologous recombination (HR) ของ DNA double-strandbreaks (DSBs) จากการศึกษาของ Chen Qu และคณะ พบว่าพบว่า โปรตีน RPA32 มีผลกระทบ ต่อ radiosensitivity ของเซลล์มะเร็ง head and neck squamous cell carcinoma (HNSC) และพบว่าเมื่อมีการแสดงออกที่มากเกินไปของโปรตีน RPA3 จะช่วยเพิ่ม radioresistance และความสามารถในการซ่อมแซมดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็ง แต่ถ้ายับยั้งการแสดงออกของโปรตีน RPA3 จะทำให้เซลล์มะเร็งไวต่อการฉายรังสีและลดความสามารถในการซ่อมแซมดีเอ็นเอในผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอ และพบว่า High expression ของ RPA3 มีความสัมพันธ์ที่ไม่ดีกับ overall survival (OS) และพบอัตราการกลับเป็นซ้ำสูง ภายหลังการรักษาด้วยรังสี (50)

#### *โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโต*

โปรตีน p53 ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ที่คอยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ไม่ให้เกิดการแบ่งตัวเร็วเกินไป(51) จากการศึกษา พบว่า การกลายพันธุ์ (mutation) ของ โปรตีน p53 เกิดขึ้นได้ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งศีรษะและลำคอ(52) มะเร็งเต้านม(53) มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ(54) มะเร็งรังไข่(55) เป็นต้น และการแสดงออกของโปรตีน p53 ยังมีความสัมพันธ์กับอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งอีกด้วย(56, 57)

โปรตีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายและลุกลามของมะเร็ง

a) **CD44**

CD44 เป็น receptor ที่อยู่บนผิวเซลล์ มีบทบาทในการแพร่กระจายและลุกลามของเซลล์มะเร็ง(58) โดยควบคุมผ่าน  $\beta$ -catenin โดยเมื่อยับยั้งการทำงานของ CD44 จะส่งผลให้การแสดงออกของ  $\beta$ -catenin ลดลงไปด้วย(59) การแสดงออกของ CD44 พบได้ในมะเร็งหลายๆ ชนิด จากการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ CD44 มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งกล่องเสียง(60) มะเร็งไต(61) มะเร็งกระเพาะอาหาร(62) เป็นต้น

b)  **$\beta$ -catenin**

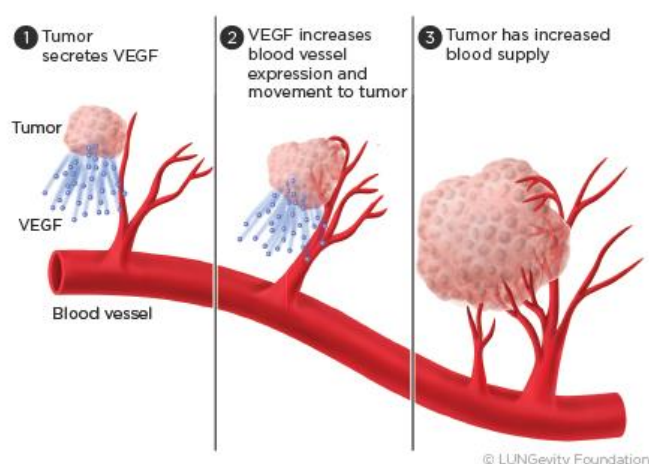
$\beta$ -catenin เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการส่งสัญญาณผ่านทาง Wnt pathway โดยการแสดงออกของ  $\beta$ -catenin สามารถทำให้เกิดเป็นมะเร็งได้(63) การส่งสัญญาณผ่าน  $\beta$ -catenin จะบ่งบอกถึงการเพิ่มจำนวน (proliferation) และการอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง(64)

โปรตีนกลุ่มการสร้างเส้นเลือด (Angiogenesis)

a) **VEGF**

VEGF เป็น growth factor ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการเติบโต (proliferation) และการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด (permeability) และยังทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการตายโดยธรรมชาติ (antiapoptotic factor) สำหรับเส้นเลือดใหม่ VEGF receptor เป็น glycoprotein ที่อยู่บนผิวของ vascular endothelium โดยสร้างได้ทั้งจากเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง ประกอบด้วย receptor 2 ชนิด คือ VEGFR1 และ VEGFR2 ซึ่งเมื่อจับกับ VEGF หรือ basic fibroblast growth factor แล้วจะกระตุ้น signal transduction ภายใน endothelial cell ให้เกิดการสร้างและเติบโตของ endothelial cell เซลล์มะเร็งสามารถกระตุ้นให้เกิด VEGFR expression มากขึ้น โดยผ่านทาง oncogene และ cytokine ต่างๆ รวมถึงภาวะ hypoxia VEGFR expression สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี โดยมีความสำคัญในการควบคุม angiogenesis หรือ การสร้างเส้นเลือดใหม่จากเส้นเลือดเดิมที่มีอยู่ซึ่งเป็นกลไกสำคัญ ประการหนึ่งต่อการลุกลามและแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ยาที่ยับยั้งการเกิด angiogenesis หรือ antiangiogenic agent สามารถยับยั้งโดยตรงโดยเป็น monoclonal antibody ต่อ VEGF ligand ซึ่งมีความสำคัญต่อการเติบโตของ endothelial cell

ของ เส้นเลือด แต่ไม่ได้มีผลทำลายเซลล์ จึงมีข้อดีกว่ายาเคมีบำบัดที่สามารถหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงของยาเคมีบำบัดและไม่เกิดปัญหาเซลล์มะเร็งดื้อยาได้ นอกจากนี้ยังมียาที่เป็น small molecule inhibitor ด้วย แต่ยาในกลุ่ม antiangiogenic agent ที่ได้รับการ อนุมัติใช้ในปัจุบัน ได้แก่ bevacizumab ซึ่งเป็น humanised monoclonal antibody ที่ยับยั้ง angiogenic signal โดยจับกับ VEGF ligand แล้วทำให้ VEGF ไม่สามารถรวมตัวกับ VEGFR ได้



ภาพประกอบ 13 การควบคุมการเติบโตผ่านของผนังหลอดเลือด

(ที่มา:<https://m.blog.naver.com/PostView.nhn?blogId=meryang63&logNo=221174984253&proxyReferer=https:%2F%2Fwww.google.co.th%2F>)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

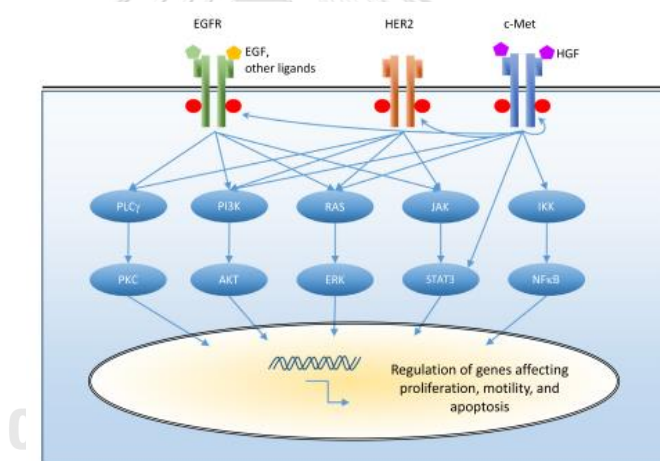
b) **HIF1alpha** CHULONGKORN UNIVERSITY

Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) เป็นโปรตีนเฮเทอโรไดเมอร์ที่ประกอบด้วยโปรตีน 2 ชนิดคือ HIF-1 $\alpha$  และ HIF-1 $\beta$  โดย HIF-1 จะกระตุ้นการถอดรหัสของยีนจำนวนมากที่เข้ารหัสโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดใหม่ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การอยู่รอด และการแพร่กระจายของเซลล์(65) การแสดงออกของ\_HIF-1 $\alpha$  พบได้ในมะเร็งหลายๆ ชนิด เช่น มะเร็งเต้านม(66) มะเร็งช่องปาก มะเร็งรังไข่(67) มะเร็งเยื่อหุ้มโพรงมดลูก มะเร็งศีรษะและลำคอ(68) เป็นต้น

## โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ (Cell survival)

### c-Met

c-Met จัดว่าเป็น oncogene ชนิดหนึ่ง ควบคุมกระบวนการของเซลล์หลายอย่าง เช่น การอยู่รอดของเซลล์ (Cell survival) กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Proliferation), invasion และการสร้างเส้นเลือด (angiogenesis) ดังแสดงในภาพประกอบ 14 การแสดงออกที่มากเกินไปของ c-Met มักจะสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี อัตราการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และการต้านทานรังสี (resistance)(69) จากการศึกษาของ Jaudah Al-Maghrabi และคณะ พบว่า การแสดงออกที่มากเกินไปของ c-Met มีความสัมพันธ์กับการเกิด recurrence ใน colorectal cancer(70) และจากการศึกษาในปี 2010, Wei Liu และคณะ พบการแสดงออกที่มากเกินไป (overexpression) ของโปรตีน c-Met ในกลุ่มของ recurrent glioblastoma multiforme (GBM) มากกว่ากลุ่ม primary GBM ( $p = 0.020$ ) (71)



ภาพประกอบ 14 ควบคุมกระบวนการของเซลล์ผ่านทาง c-Met pathway

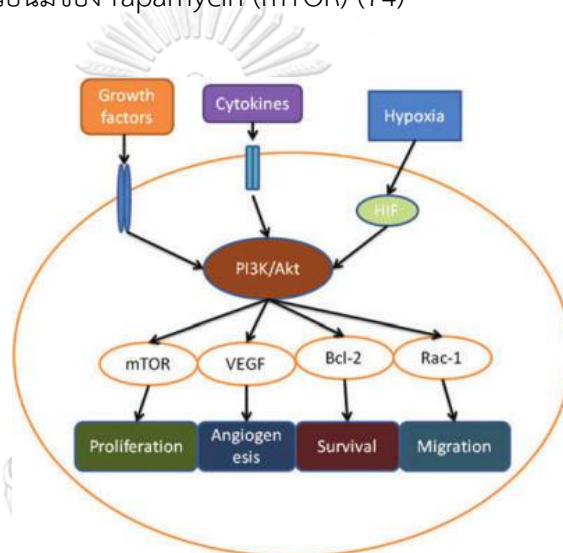
### PI3K

การถ่ายทอดสัญญาณของเซลล์โดยผ่านวิถี PI3K/Akt เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ การแบ่งตัว การเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ เมแทบอลิซึมของเซลล์ การตายของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์ และการสร้างเส้นเลือด (72) โปรตีน PI3K ถูกจัดอยู่ในกลุ่มลิปิดไคเนส (lipid kinase) เนื่องจากความสามารถในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ inositol ring ที่ตำแหน่ง 3'-OH group ในโมเลกุลของ phosphatidylinositol (PI) และ phosphoinositide (PIP, PIP2) โดยมี ATP เป็นตัวให้หมู่ฟอสเฟตทำให้เกิดเป็นโมเลกุลของ PIP, (PIP2) และ (PIP3) ซึ่ง PIP3



เป็นสารสื่อสัญญาณตัวที่สองทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ และเมแทบอลิซึมของเซลล์ เป็นต้น การกระตุ้นการทำงานที่ผิดปกติจะนำไปสู่ไปสู่การเกิดมะเร็ง โดยพบความผิดปกติของโมเลกุลเหล่านี้ในมะเร็งหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นการกลายพันธุ์ การเพิ่มจำนวนของยีน หรือการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น (73)

การกระตุ้นการทำงานของ Akt ทำให้เกิดการควบคุมการทำงานของเซลล์ (ภาพประกอบ 15) ตัวอย่างเช่น Akt ควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่าน Rac1 และ rhoA เพิ่มการอยู่รอดของเซลล์ผ่าน bcl-2 ช่วยเพิ่มการสร้างเส้นเลือด ผ่าน VEGF และเพิ่มการเพิ่มจำนวนเซลล์ผ่านการกระตุ้นของเป้าหมายของสัตว์เลี้ยวลูกด้วยนมของ rapamycin (mTOR) (74)



ภาพประกอบ 15 การถ่ายทอดสัญญาณของเซลล์โดยผ่านวิถี PI3K/Akt

CHULALONGKORN UNIVERSITY

### เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา มีความสำคัญต่อพยาธิแพทย์ในการวินิจฉัยโรค เช่น ใช้จำแนกชนิดของความผิดปกติของเนื้อเยื่อ (neoplasm) ใช้ค้นหาแหล่งกำเนิดของเซลล์มะเร็ง (primary site of tumor) ในส่วนของงานวิจัยได้มีการใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีในการพยากรณ์โรค และเป็นตัวบ่งชี้ในการรักษาโรค เป็นต้น

เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์ โดยเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา antigen-antibody reaction คือ เป็นการนำแอนติบอดีไปจับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์ (75, 76) โดยมีเอนไซม์ และ Chromogen เป็นตัวทำให้เกิดสีจนสามารถ



มองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยเป้าหมายของการนำเทคนิคนี้มาใช้ เพื่อศึกษาการ แสดงออกของโปรตีน (protein expression) ศึกษาการกระจายตัวของเซลล์มะเร็ง (distribution) และตำแหน่งของเซลล์มะเร็ง (localization).

การแปลผลย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี นิยมแปลผลในเชิงคุณภาพ (Qualitative) คือ เติงบวกกับ เติงลบ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการแปลผลการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี ได้แก่ ปริมาณแอนติเจนเป้าหมายใน เนื้อเยื่อที่ใช้ทดสอบ ความจำเพาะของแอนติเจนเฉพาะ ความไวของ primary antibody ความเข้ม ของการย้อมสีใน internal และ external control เป็นต้น(77) ในส่วนของการประเมินความเข้มข้น (intensity) ของการย้อมสีอิมมูโนฮิสโตเคมี สามารถจำแนกเกณฑ์ความเข้มข้นของการติดสีออกเป็น 4 แบบ ดังนี้ ไม่ติดสีเลย (null) ติดสีจาง (weak) ติดสีปานกลาง (moderate) ติดสีเข้ม (intense) (78, 79) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ประเมิน นอกจากนี้ยังสามารถประเมินผลการย้อมในเชิง ปริมาณ (Quantitative) ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ติดสี (Proportion) ปัจจุบันนิยมนำมาใช้ในการ นับ micro-metastases ในไขกระดูก นำมาวัด peritumoral ในหลอดเลือด และนำมาใช้ในการหา ค่า proliferation index ในการย้อมสีของ Ki67 เป็นต้น (80)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 กลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เอกสารรับรองโครงการวิจัยเลขที่ IRB no. 889/63 โดยกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาประกอบด้วยตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟินบล็อกของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งช่องสายเสียงระหว่างปีพ.ศ. 2553 ถึง 2562 ที่เข้ารับการรักษาภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยตัวอย่างจะเป็นชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องสายเสียงตั้งต้น ซึ่งถูกแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrent glottic cancer) และกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrent glottic cancer)

#### 3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

1. **รูปแบบงานวิจัย (study design)** เป็นแบบ Retrospective case control study โดยเริ่มต้นจากคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrent glottic cancer) ก่อน จากนั้นจึงหากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrent glottic cancer) เพื่อมาเป็นกลุ่มอ้างอิง จากนั้นศึกษาและเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในเนื้อเยื่อที่อยู่ในพาราฟินด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) นอกจากนี้ได้มีการเก็บรวบรวมข้อมูลย้อนหลังจากเวชระเบียนเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง
2. **รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล (data collection and analysis)**
  - a) กลุ่มประชากรที่จะศึกษา (Target population) ได้แก่ ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาด้วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ระหว่างปี 2552-2561
  - b) วิธีการเข้าถึงของอาสาสมัคร (Approach to participant)  
ผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่ได้รับการตรวจติดตามการรักษาที่ภาควิชาโสต ศอ นาสิก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ซึ่งกระบวนการขอความยินยอมทำ

โดยผู้วิจัยอธิบายข้อมูลให้แก่อาสาสมัครโดยแจกเอกสารชี้แจงข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยและเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการสำหรับอาสาสมัครนำกลับไปพิจารณาตัดสินใจ ในกรณีที่ไม่สามารถติดต่อผู้ป่วยได้ ผู้วิจัยจะทำหนังสือบันทึกข้อความขออนุญาตใช้ข้อมูลและตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ผ่านการวินิจฉัยแล้วจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

c) เกณฑ์การคัดเลือก และเกณฑ์การคัดออก

เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเพื่อเข้าร่วมการวิจัย (Inclusion criteria)

- ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งกล่องเสียงบริเวณช่องส่องสายเสียง (glottis) ชนิด Squamous cell carcinoma
- ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยรังสีรักษา (Radio therapy) หรือ รังสีรักษาร่วมกับเคมีบำบัด (Concurrent Chemoradiotherapy) หรือ การผ่าตัดนำกล่องเสียงทั้งหมดออกมา (radical resection)
- ผู้ป่วยต้องได้รับการตรวจติดตามอย่างสม่ำเสมออย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง

เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเพื่อคัดออกจากโครงการ (Exclusion criteria)

- ประวัติการรักษาผู้ป่วยไม่ต่อเนื่อง หรือ ผู้ป่วย loss follow up
- ผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา (Residual tumor case)
- ผู้ป่วยที่เคยได้รับการวินิจฉัย และรักษามะเร็งบริเวณศีรษะและลำคอก่อน
- ผู้ป่วยที่เคยได้รับการฉายแสงหรือกลืนแร่บริเวณศีรษะและลำคอก่อน
- ผู้ป่วยที่มีชิ้นเนื้อไม่เพียงพอต่อการทดลอง หรือมีสภาพชิ้นเนื้อเยื่อที่ไม่เหมาะสมกับการย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)

d) เกณฑ์การจัดกลุ่มผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrence) และกลุ่มที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrence) โดยจะติดตามการกลับมาเป็นซ้ำ recurrence ทั้งหมด 10 ปี

เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrence)

- เป็นการกลับมาเป็นซ้ำครั้งแรก ภายหลังจากที่ได้รับการรักษาเสร็จสิ้นแล้ว

เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrence)

- ไม่พบการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากที่รักษา
- e) ระบุจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่จะศึกษา และที่มาของของขนาดตัวอย่าง  
ในการวิจัยครั้งนี้ได้คำนวณหาขนาดตัวอย่างโดยใช้สูตรเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ H-score ระหว่าง 2 กลุ่ม ดังนี้

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

n	=	จำนวนขนาดตัวอย่าง
$Z_{\alpha/2}$	=	ค่าสถิติภายใต้โค้งมาตรฐาน เมื่อระดับนัยสำคัญทางสถิติ ( $\alpha = 0.05$ คือ 1.96)
$Z_{\beta}$	=	ค่าสถิติภายใต้โค้งมาตรฐาน เมื่อกำหนด ระดับอำนาจในการทดสอบ 80% คือ 0.842
$\sigma$	=	ค่าความแปรปรวนของประชากร แทนค่าด้วย SD
$\mu_1, \mu_2$	=	ค่าเฉลี่ยของประชากรกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2

อ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ (Recurrent glottic cancer) เท่ากับ  $1.81 \pm 0.65$  (SD) และในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (Non-recurrent glottic cancer) พบการแสดงออกของโปรตีน pRb780 เท่ากับ  $1.10 \pm 0.87$  (SD) ดังนั้น ในการศึกษานี้จะต้องใช้จำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น

$$n = \frac{(1.96 + 0.842)^2 \times (0.64742^2 + 0.8668^2)}{(1.8143 - 1.0955)^2}$$

$$n = 18 \text{ ราย}$$

เพราะฉะนั้นจะต้องใช้ตัวอย่างสำหรับการศึกษาคั้งนี้อย่างน้อยกลุ่มละ 18 ราย

อ้างอิง: Bernard R. Fundamentals of biostatistics. 5<sup>th</sup> ed: Duxbury press; 2000

### 3.3 ขั้นตอนการวิจัย วิธีการดำเนินงาน

1. ทบทวนข้อมูลผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง เช่น ข้อมูลพื้นฐาน ข้อมูลทางพยาธิวิทยาและข้อมูลทางคลินิก จากเวชระเบียนของภาควิชาโสต ศอ นาสิก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ตามเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเพื่อเข้าร่วมการวิจัยตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2553 ถึง 31 ธันวาคม 2562 และให้คำจำกัดความของผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ หรือเสียชีวิตจากสาเหตุใดๆก็ตามว่าเป็นเหตุการณ์ (event) และผู้ป่วยที่ไม่พบการกลับมาเป็นซ้ำ และยังมีชีวิตจนถึงเวลาที่จบการศึกษาคั้งคือ 31 ธันวาคม 2562 ว่าเป็นเซ็นเซอร์ (censor)
2. การบันทึกข้อมูล
  - a) บันทึกข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยของผู้ป่วย ได้แก่ อายุ เพศ ประวัติการสูบบุหรี่ ประวัติการดื่มแอลกอฮอล์ ระยะของมะเร็ง ข้อมูลการรักษา และสถานะการการมีชีวิตอยู่
  - b) บันทึกข้อมูลทางพยาธิวิทยา ได้แก่ ลักษณะของเซลล์มะเร็งที่พบ ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง การลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลือง การลุกลามไปยังบริเวณ Anterior commissure
  - c) บันทึกข้อมูลการกลับมาเป็นซ้ำ ได้แก่ วันที่กลับมาเป็นซ้ำ การวินิจฉัยการกลับมาเป็นซ้ำ (อาการทางคลินิก หรือการตรวจยืนยันชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา) การเสียชีวิต และสาเหตุการเสียชีวิต
3. จำแนกกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrent glottic cancer) และ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrent glottic cancer)
4. ติดต่อภาควิชาพยาธิวิทยา ขอใช้ชิ้นเนื้อมะเร็งช่องสายเสียงที่ฝังในพาราฟิน (Formalin-fixed paraffin embedded) ของผู้ป่วยทุกรายที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเพื่อเข้าร่วมการวิจัย จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่อยู่ในพาราฟินมาตัดให้ได้ความหนา 3 ไมโครเมตร แล้ววางลงบนกระจกสไลด์ จากนั้นนำไปย้อมสี Hematoxylin & Eosin เพื่อดูลักษณะและปริมาณของเซลล์มะเร็งที่อยู่ในเนื้อเยื่อนั้นๆ

5. ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน 16 ชนิด (รายละเอียดของแอนติบอดีที่ใช้สำหรับย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี แสดงในภาคผนวก) โดยนำเนื้อเยื่อที่อยู่ในพาราฟินมาตัดให้ได้ความหนา 3 ไมโครเมตร แล้ววางลงบนกระจกสไลด์แก้วที่เคลือบด้วยประจุบวก แล้วนำมาย้อมด้วยเครื่องย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยระบบอัตโนมัติ ยี่ห้อ BenchMark XT วิธีการอ่านและแปลผลของการย้อมสี immunohistochemistry จะประเมินโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ automated digital image analysis โดยทุกสไลด์จะนำภาพเข้าสู่โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย ชื่อ Aperio Imagescope V.10.2.2.2352 software package (Aperio Technologies,USA) จากนั้นสุ่มบริเวณเซลล์มะเร็งจำนวน 5 พื้นที่จากพื้นที่ทั้งหมด เพื่อลดการเกิดความลำเอียง โดยจะสุ่มเลือกตำแหน่งบริเวณบน ล่าง ซ้าย ขวา และตรงกลาง จากนั้นจะทำการให้คะแนนโดยโปรแกรมอัตโนมัติ (การตั้งค่าการทำงาน แสดงในภาคผนวก) ซึ่งจำนวนเซลล์มะเร็งทั้งหมดที่นำมาคำนวณอยู่ระหว่าง 5,000-10,000 เซลล์
6. การให้คะแนนโดยโปรแกรม Aperio Imagescope V.10.2.2.2352 software package (Aperio Technologies,USA) จะแบ่งการประเมินการติดสีออกเป็น 2 แบบ คือ ความเข้มของเซลล์ที่ติดสี (intensity) และปริมาณเซลล์มะเร็งที่ติดสี (proportion)

ความเข้มของเซลล์ที่ติดสี (intensity) เป็นการประเมินการติดสีของแอนติบอดี แบ่งเป็น 4 ระดับ ได้แก่

ไม่ติดสีเลย (0)	แทนค่าด้วย สีน้ำเงิน
ติดสีน้อย (1+)	แทนค่าด้วย สีเหลือง
ติดสีปานกลาง (2+)	แทนค่าด้วย สีส้ม
ติดสีเข้มมาก (3+)	แทนค่าด้วย สีแดง

ปริมาณเซลล์มะเร็งที่ติดสี (proportion) เป็นการวัดจำนวนเซลล์มะเร็งที่มีการติดสีซึ่งจะแสดงผลตั้งแต่ 0 ถึง 100%

7. โปรแกรมจะคำนวณการติดสีของเซลล์จากบริเวณที่ได้เลือกไว้ จากนั้นนำค่าความเข้มของเซลล์ที่ติดสี (intensity) และปริมาณเซลล์มะเร็งที่ติดสี (proportion) ที่ได้มาคำนวณเป็นค่า H-score โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{H-score} = [1 \times (\% \text{cell } 1+)] + [2 \times (\% \text{cells } 2+)] + [3 \times (\% \text{cells } 3+)]$$

อ้างอิงสูตร: Bychkov, A., Sampatanukul, P., Shuangshoti, S., & Keelawat, S. (2016). TROP-2 immunohistochemistry: a highly accurate method in the differential diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Pathology*, 48(5), 425-433.

8. นำค่า H-score ที่ได้มาเปรียบเทียบในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrent glottic cancer) และ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrent glottic cancer)
9. สรุปข้อมูล (Summarization of Data) และวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) ตามแผนการวิเคราะห์สถิติเพื่อตอบโจทย์ตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้
10. เขียนรายงานผล อภิปรายผลและสรุปผลการศึกษา

### 3.4 การเปิดเผยข้อมูลแสดงตัวตนผู้ป่วย

ข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วยจะถูกเก็บไว้เป็นความลับ จะไม่มีการนำข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วยไปเปิดเผยโดยเด็ดขาด สำหรับการนำข้อมูลไปวิเคราะห์จะใช้รหัสตัวเลขแทนผู้ป่วยแต่ละราย ส่วนในการตีพิมพ์ผลงานการวิจัยหรือการนำเสนอผลงานวิชาการจะนำเสนอในภาพรวมของผลการวิจัย จะไม่มีการนำข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วยไปเปิดเผยโดยเด็ดขาด หากมีความจำเป็นต้องแสดงข้อมูลที่เป็นตัวตนของผู้ป่วย จะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยเป็นรายลักษณะอักษรเท่านั้น

### 3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics) ข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยที่เป็น categorical data รายงานด้วยจำนวน ร้อยละ ข้อมูลที่เป็น continuous data กรณีข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติรายงานด้วยค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน กรณีข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ รายงานด้วย ค่ามัธยฐาน ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด
2. ข้อมูลเชิงอนุมาน (Inferential Statistics)
  - a) การเปรียบเทียบค่า H-score ระหว่างกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrent glottic cancer) และ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrent glottic

cancer) ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน กรณีข้อมูลแจกแจงแบบปกติใช้สถิติ Student t-test ส่วนกรณีข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ ใช้สถิติ Mann-whitney U test

- b) การประเมินคุณสมบัติการนำแอนติบอดีมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการพยากรณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง โดยการคำนวณพื้นที่ใต้โค้ง ROC (Receiver Operating Characteristic)
- c) การวิเคราะห์อัตราการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งช่องสายเสียงโดย Kaplan-Meier (KM) และนำเสนอด้วย Recurrent plot และ Median Recurrent Time.
- d) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยส่วนบุคคล ปัจจัยทางคลินิก และปัจจัยทางโมเลกุล กับอุบัติการณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง ที่มีระยะเวลาในการติดตามแต่ละรายที่แตกต่างกันโดยนับเวลาตั้งแต่มารักษาจนกระทั่งพบการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง โดยนำเสนอด้วย Person Time
- e) การวิเคราะห์ปัจจัยที่สัมพันธ์กับการกลับมาเป็นซ้ำโดยสถิติ COX's Proportional Hazards Model และ นำเสนอด้วย Hazard Ratio (HR:95%CI)

3. ทุกการทดสอบกำหนดค่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่  $p$ -value < 0.05



## บทที่ 4

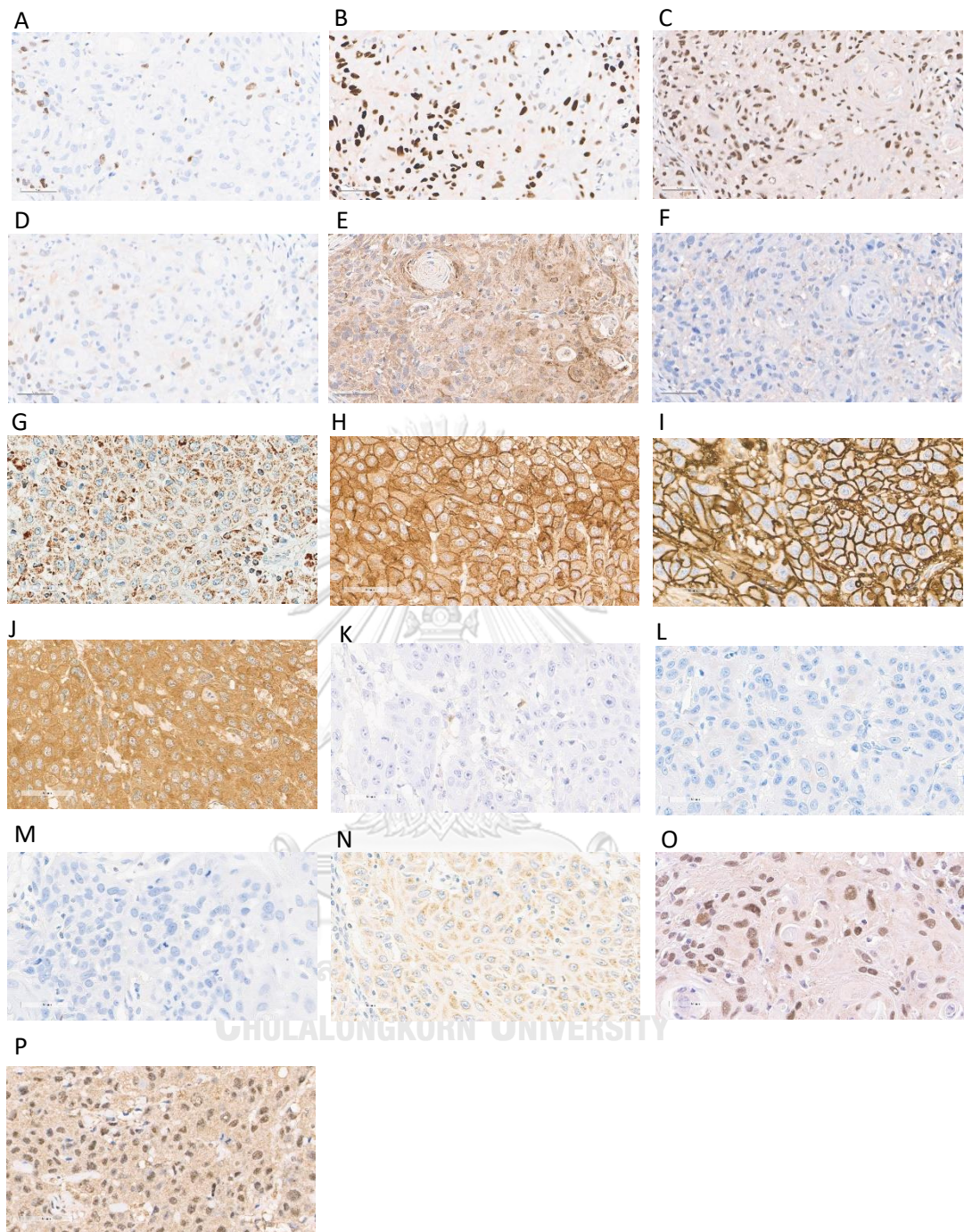
### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา

นับตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2553 ถึง ธันวาคม 2562 พบผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่อยู่ในเกณฑ์การเข้าร่วมการศึกษา จำนวนทั้งหมด 41 ราย โดยอายุเฉลี่ยของผู้ป่วย เท่ากับ 64 ปี ซึ่งกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นเพศชายทั้งหมด ตลอดระยะเวลาในการศึกษาทั้งหมด 10 ปี พบมีผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ จำนวนทั้งหมด 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 36.6 และผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ จำนวน 26 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.4

เมื่อพิจารณาปัจจัยส่วนบุคคลของผู้ป่วยทั้งหมด 41 ราย พบผู้ป่วยที่มีประวัติการสูบบุหรี่ 27 ราย โดยในจำนวนนี้มีเพียง 9 รายที่พบว่ากลับมาเป็นโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำ และพบผู้ป่วยมีประวัติดื่มแอลกอฮอล์ทั้งหมด 26 ราย โดยพบว่าผู้ป่วย 9 รายที่พบว่าเป็นโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำ

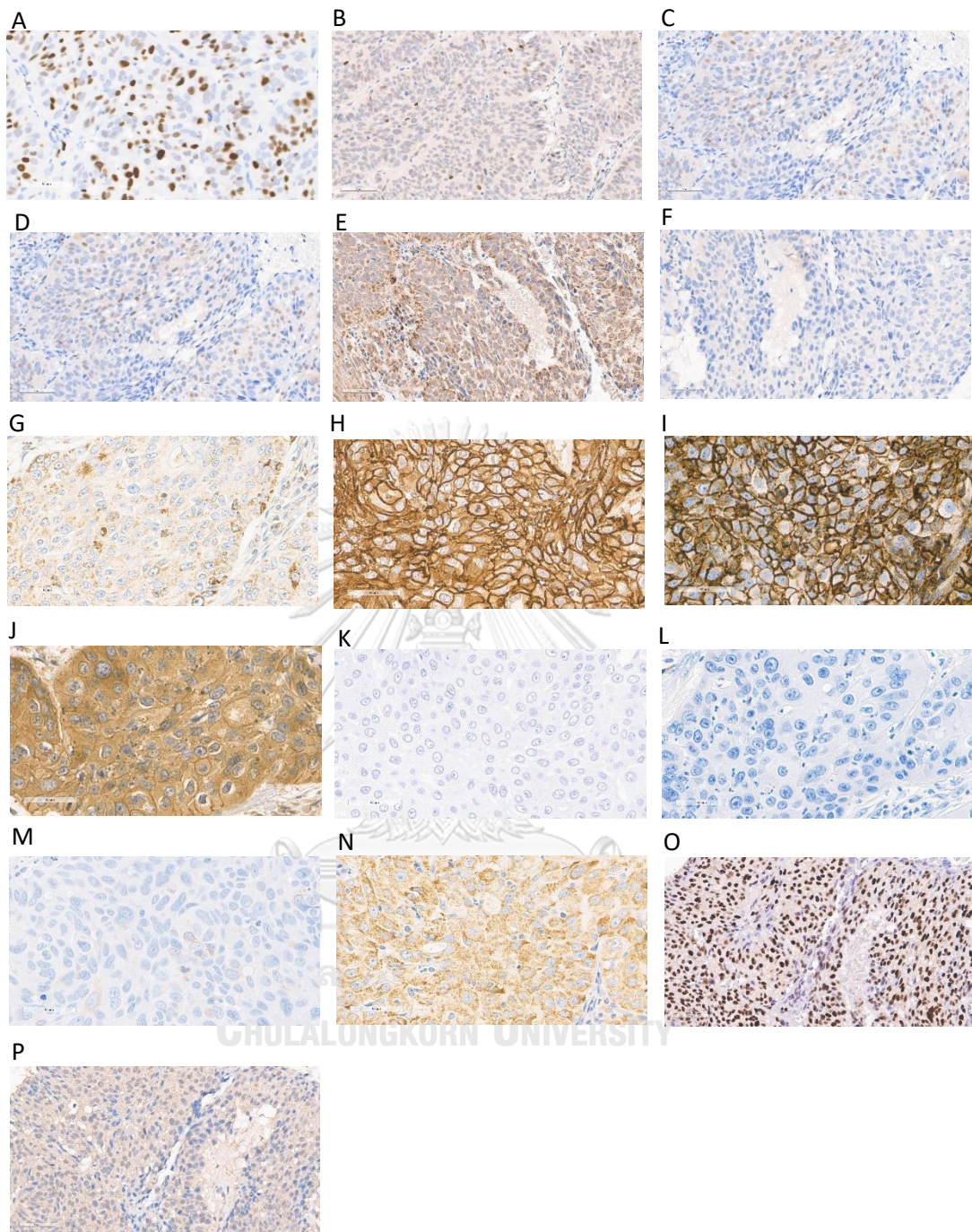
เมื่อพิจารณาปัจจัยทางคลินิก พบมีผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งช่องสายเสียงในระยะเริ่มต้น (ระยะที่ 1 และระยะที่ 2) ทั้งหมด 7 ราย พบการกลับมาเป็นซ้ำจำนวน 4 ราย และผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งช่องสายเสียงในระยะลุกลามเริ่มต้น (ระยะที่ 3 และระยะที่ 4) ทั้งหมด 34 ราย พบการกลับมาเป็นซ้ำจำนวน 11 ราย เมื่อพิจารณาถึงวิธีการรักษา พบว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงส่วนใหญ่รักษาด้วยวิธีการผ่าตัดกล่องเสียงร่วมกับใช้รังสีรักษา (Post operation Radiotherapy) จำนวน 25 ราย ในจำนวนนี้พบผู้ป่วยกลับมาเป็นซ้ำทั้งหมด 9 ราย เมื่อพิจารณาการลุกลามของมะเร็งไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลือง พบว่า มีจำนวนผู้ป่วยที่มีการลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลือง จำนวน 14 ราย โดยในจำนวนนี้พบผู้ป่วยจำนวน 6 รายที่เป็นมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำ นอกจากนี้ผู้จัดทำได้เก็บข้อมูลเกี่ยวกับการลุกลามไปยังบริเวณ Anterior commissure พบจำนวนผู้ป่วยที่มีการลุกลามของมะเร็งไปยังบริเวณ Anterior commissure จำนวน 25 ราย และมีเพียง 8 ราย ที่พบว่าเป็นมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำ



ภาพประกอบ 16 ตัวอย่างการติดสีของแอนติบอดีเมื่อย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีในผู้ป่วยโรคมะเร็งกล่องเสียงกลุ่มที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ

A= Ki67, B= P53, C= RPA32, D=cyclinD1, E=Bclxl, F=PI3K, G=BAX, H= bata-catenin, I=CD44, J= HIF1alpha, K= p16, L= VEGF, M= Bcl2, N= Bak, O= pRB780, P= c-Met, กำลังขยาย 40x





ภาพประกอบ 17 ตัวอย่างการติดสีของแอนติบอดีเมื่อย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีในผู้ป่วยโรคมะเร็งกล่องเสียงกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำ

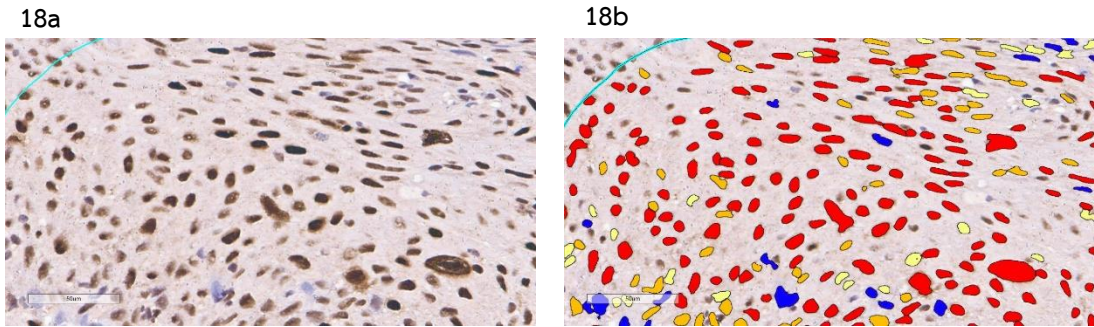
A= Ki67, B= P53, C= RPA32, D=cyclinD1, E=Bclxl, F=PI3K, G=BAX, H= bata-catenin, I=CD44, J= HIF1alpha, K= p16, L= VEGF, M= Bcl2, N= Bak, กำลังขยาย 40x

#### 4.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน 16 ชนิด โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง

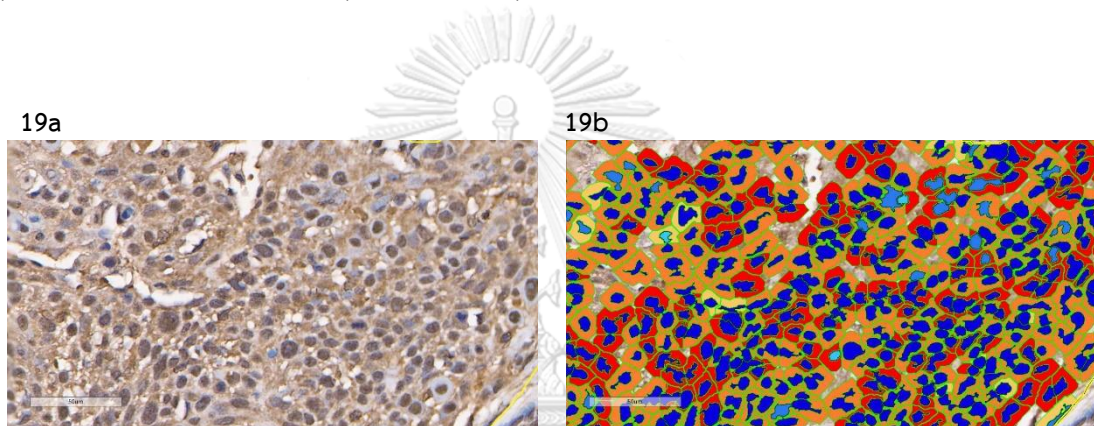
เมื่อนำพาราฟินบล็อกชิ้นเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง จำนวน 41 บล็อกมาย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีทั้ง 16 ชนิด (ภาพประกอบ 16 และ 17) แล้วนำมาดูลักษณะของเซลล์มะเร็งเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าการติดสีที่บริเวณนิวเคลียสทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ Ki67 pRb780 RPA32 CyclinD1 และ P53 พบมีการติดสีที่บริเวณไซโตพลาสซึม 7 ชนิด ได้แก่ BAX BAK Bclxl c-Met PI3K p16 และ VEGF พบมีการติดสีบริเวณเซลล์เมมเบรน 3 ชนิด ได้แก่ B-catenin HIF1alpha และ CD44 และไม่ติดสีเลยบริเวณเซลล์มะเร็ง ได้แก่ Bcl2

เมื่อนำภาพสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยแอนติบอดีทั้งหมด 16 ชนิด เข้าสู่โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย ชื่อ Aperio Imagescope V.10.2.2.2352 (ภาพประกอบ 18-20) และนำค่าความเข้มของการติดสีและปริมาณของเซลล์มะเร็งที่ติดสี ที่ประเมินได้จากโปรแกรมมาคำนวณค่า H-score พบว่าค่า H-score ที่ได้มีค่าตั้งแต่ 0 จนถึง 270.398 คะแนน และเมื่อนำค่ามัธยฐาน H-score ของแต่ละแอนติบอดีมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ (recurrent glottic cancer) และกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ (non-recurrent glottic cancer) ที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน พบว่า กลุ่มที่มีค่ามัธยฐาน H-score ไม่แตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่ย้อมด้วยแอนติบอดี Ki67 RPA32 CyclinD1 P53 Bcl2 BAX BAK Bclxl PI3K B-catenin CD44 p16 VEGF และ HIF1alpha ส่วนกลุ่มที่มีค่ามัธยฐาน H-score ที่มีความแตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่ย้อมด้วยแอนติบอดี pRb780 และ c-Met ดังแสดงในตารางที่ 2

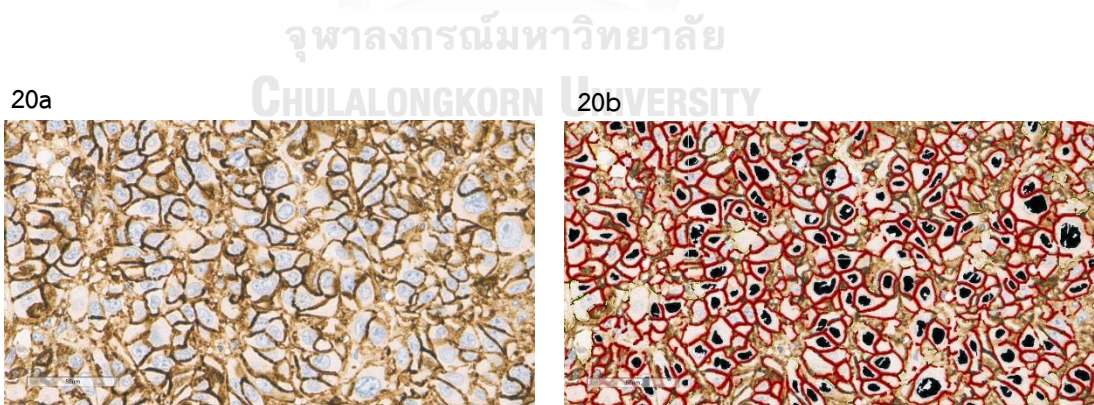




ภาพประกอบ 18 เปรียบเทียบการติดสีของนิวเคลียสที่ย้อมด้วยแอนติบอดี pRb780, กำลังขยาย 40x: 18a = ภาพการติดสีของแอนติบอดี pRb780 เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 18b = ภาพการติดสีของแอนติบอดี pRb780 ที่ประเมินจากโปรแกรม Aperio Imagescope V.10.2.2.2352



ภาพประกอบ 19 เปรียบเทียบการติดสีของไซโตพลาสซึมที่ย้อมด้วยแอนติบอดี c-Met, กำลังขยาย 40x: 19a = ภาพการติดสีของแอนติบอดี c-Met เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 19b = ภาพการติดสีของแอนติบอดี c-Met ที่ประเมินจากโปรแกรม Aperio Imagescope V.10.2.2.2352



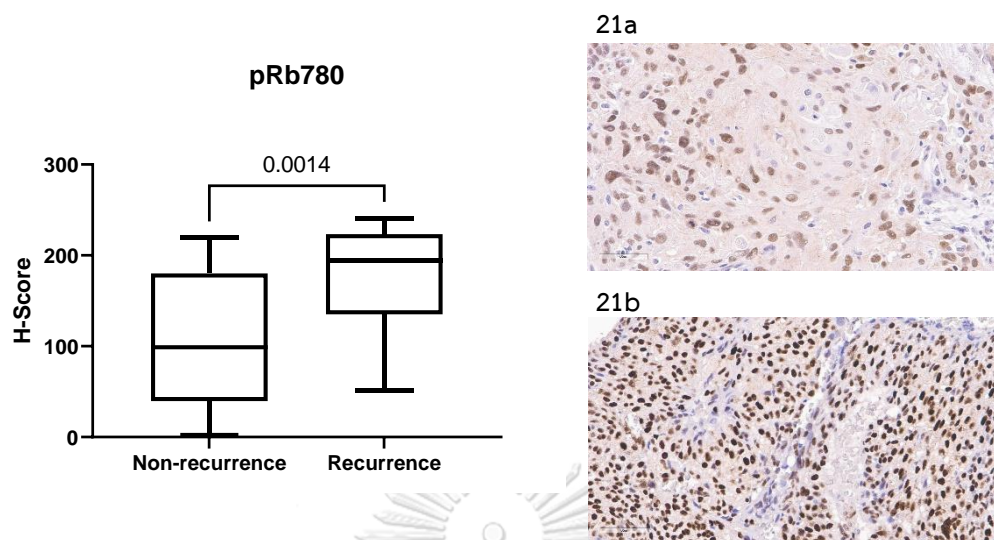
ภาพประกอบ 20 เปรียบเทียบการติดสีของเซลล์เมมเบรนที่ย้อมด้วยแอนติบอดี CD44, กำลังขยาย 40x: 20a = ภาพการติดสีของแอนติบอดี CD44 เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 20b = ภาพการติดสีของแอนติบอดี CD44 ที่ประเมินจากโปรแกรม Aperio Imagescope V.10.2.2.2352

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่ามัธยฐาน H-score ระหว่างกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำและกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำที่ย้อมด้วยแอนติบอดี 16 ชนิด

ชนิดแอนติบอดี	กลุ่มที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ จำนวน 26 ราย	กลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำ จำนวน 15 ราย	<i>p-value</i>
BclXL	133.0	163.1	NS
c-Met	178.2	103.6	0.0012*
CyclinD1	56.65	35.83	NS
Ki67	26.10	35.83	NS
P53	24.49	33.28	NS
PI3K	13.98	5.122	NS
pRb780	98.80	194.9	0.0014*
RPA32	140.1	147.6	NS
p16	0.99	1.83	NS
Bcl2	0.60	0.15	NS
CD44	234.49	219.73	NS
VEGF	4.72	2.25	NS
Bax	202.17	185.65	NS
Bak	84.83	52.16	NS
HIF1alpha	261.22	246.37	NS
Bata-catenin	183.16	193.78	NS

\**p-value* < 0.05, NS = No significant

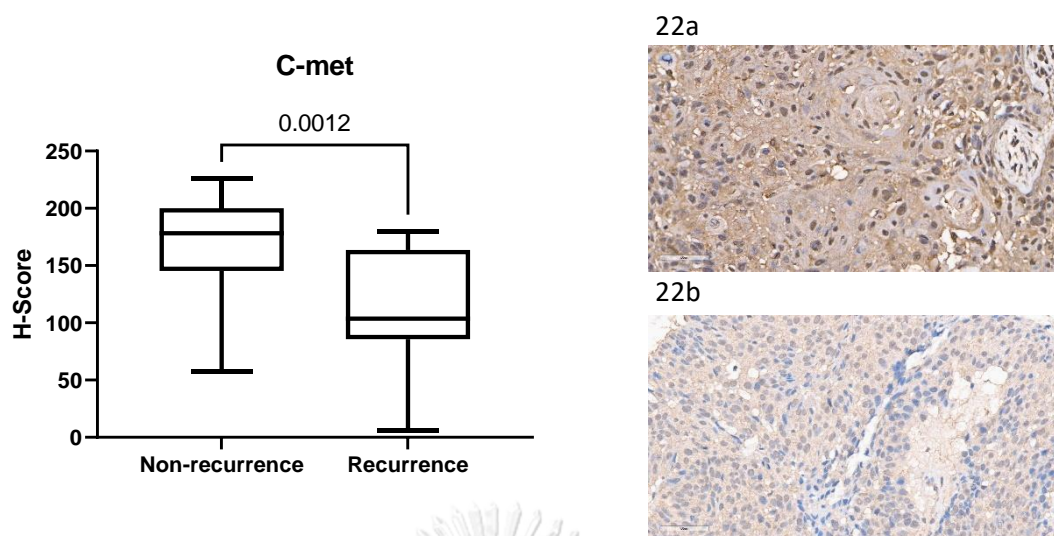
เมื่อพิจารณาลักษณะการติดสีของแอนติบอดี pRb780 เมื่อย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่าการติดสีบริเวณนิวเคลียสของเซลล์มะเร็งในของทุกตัวอย่างในทั้งสองกลุ่ม และเมื่อนำค่าความเข้มของการติดสีและปริมาณของเซลล์มะเร็งที่มีการติดสีที่คำนวณได้จากโปรแกรม Aperio imagescope มาคำนวณค่า H-score พบว่าค่า H-score ที่ได้อยู่ระหว่าง 2.37 ถึง 241.22 โดยค่ามัธยฐาน H-score ในกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 194.90 คะแนน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 98.80 คะแนน ผลคือกลุ่มตัวอย่างทั้งสองมีค่ามัธยฐาน H-score ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.0014$ , Mann-whitney U test) (ภาพประกอบ 21)



ภาพประกอบ 21 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน H-score ของแอนติบอดี pRb780; 21a = การติดสีของแอนติบอดี pRb780 ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำและ 21b = การติดสีของแอนติบอดี pRb780 ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ

เมื่อพิจารณาลักษณะการติดสีของแอนติบอดี c-Met เมื่อย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่าการติดสีบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์มะเร็งของทุกตัวอย่างในทั้งสองกลุ่ม และเมื่อนำค่าความเข้มของการติดสีและปริมาณของเซลล์มะเร็งที่มีการติดสีที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Aperio image scope มาคำนวณหาค่า H-score พบว่าค่า H-score ที่ได้อยู่ระหว่าง 6.07 ถึง 225.67 โดยค่ามัธยฐาน H-score ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำที่ย้อมติดสีของแอนติบอดี c-Met เท่ากับ 103.60 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 178.20 ผลคือกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่มมีค่ามัธยฐาน H-score ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.0012$ , Mann-whitney U test) (ภาพประกอบ 22)



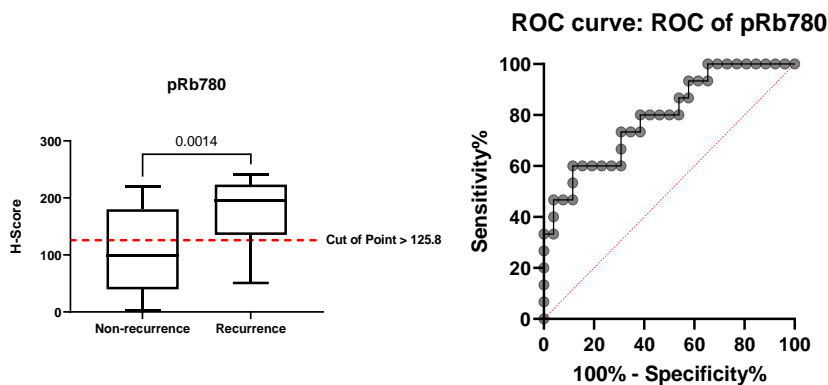


ภาพประกอบ 22 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน H-score ของแอนติบอดี c-Met; 22a = การติดสีของแอนติบอดี c-Met ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำและ 22b = การติดสีของแอนติบอดี c-Met ในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ

#### 4.3 การทดสอบเพื่อการวินิจฉัยโรค (Diagnostic testing) โดยวิธีวิเคราะห์เส้นโค้ง Receiver Operating Characteristics (ROC)

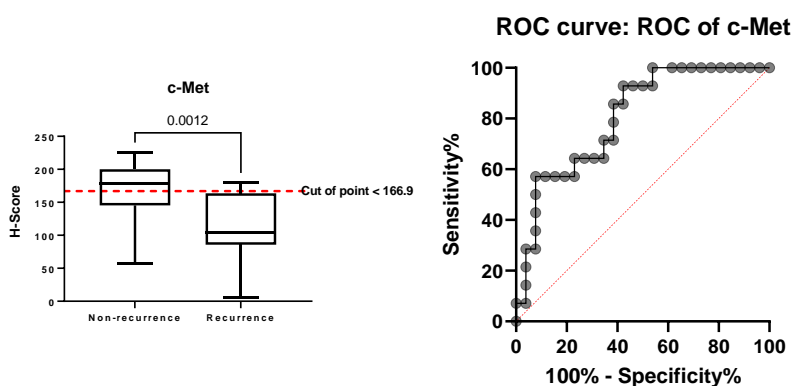
การประเมินคุณสมบัติการนำแอนติบอดี pRb780 มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการพยากรณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง โดยการคำนวณพื้นที่ใต้โค้ง ROC (Receiver Operating Characteristic) และคำนวณค่า 95% CI พบว่าค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้ง ROC (Area under the curve: AUC) มีค่า AUC เท่ากับ 0.79 (95% CI = 0.65-0.94) (ภาพประกอบที่ 23) ซึ่งมีความอยู่ในระดับดี เมื่อพิจารณาระดับค่า H-score ที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกกลุ่มผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ พบว่าระดับค่า H-score ที่ 125.8 คะแนน จะมีค่า Specificity = 61.54% และ Sensitivity = 80.00% เพราะฉะนั้นเมื่อเลือกใช้ค่าตัดจำเพาะ (Cut off point) ที่ 125.8 จะสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน pRb780 สูง (H-score > 125.8) และกลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ต่ำ (H-score ≤ 125.8)





ภาพประกอบ 23 พื้นที่ใต้โค้ง ROC เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดี pRb780

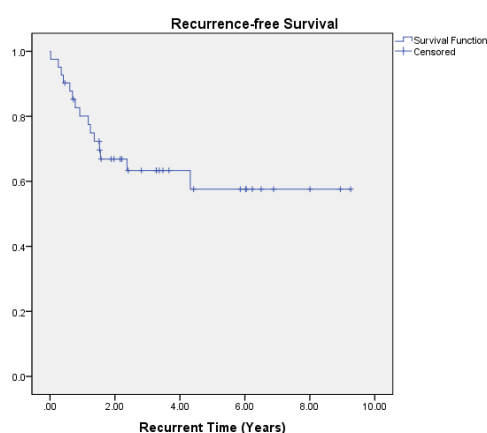
การประเมินคุณสมบัติของการนำแอนติบอดี c-Met มาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการพยากรณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง โดยการคำนวณพื้นที่ใต้โค้ง ROC (Receiver Operating Characteristic) และคำนวณค่า 95% CI พบว่าพื้นที่ใต้เส้นโค้ง ROC (Area under the curve: AUC) มีค่า AUC เท่ากับ 0.80 (95% CI = 0.67-0.94) (ภาพประกอบที่ 24) ซึ่งมีค่าอยู่ในระดับดี เมื่อพิจารณาระดับค่า H-score ที่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการจำแนกกลุ่มผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ พบว่าระดับค่า H-score ที่ 166.9 ค่ะแนน จะมีค่า Specificity = 61.00% และ Sensitivity = 85.71% เพราะฉะนั้นเมื่อเลือกใช้ค่าตัดจำเพาะ (Cut-off point) ที่ 166.9 จะสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน c-Met สูง (H-score > 166.9) และกลุ่มที่มีการแสดงออกของโปรตีน C-met ต่ำ (H-score ≤ 166.9)



ภาพประกอบ 24 พื้นที่ใต้โค้ง ROC เมื่อย้อมด้วยแอนติบอดี c-Met

#### 4.4 การวิเคราะห์อุบัติการณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงโดย Kaplan-Meier

จากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงทั้งหมด 41 ตัวอย่าง พบว่ามีผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำในช่วงเวลาของการศึกษาจำนวน 15 ราย โดยพิจารณาจากระยะเวลาของการศึกษาตั้งแต่ปีที่ 1 จนถึงปีที่ 10 พบโอกาสปลอดการกลับมาเป็นซ้ำ (Recurrent Free Survival) ของโรคมะเร็งช่องสายเสียง มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 2 ปีแรก โดยอัตราการปลอดจากการกลับมาเป็นซ้ำในช่วง 2 ปีแรก เท่ากับ 63% ดังแสดงในภาพประกอบ 25



ภาพประกอบ 25 กราฟเส้นโค้ง แสดงอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งช่องสายเสียง (Kaplan-Meier)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยส่วนบุคคล ปัจจัยทางคลินิก และปัจจัยทางโมเลกุล กับอุบัติการณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง ที่มีระยะเวลาในการติดตามแต่ละรายที่แตกต่างกันโดยนับเวลาตั้งแต่ภายหลังจากการรักษาจนกระทั่งพบการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง พบว่าเมื่อพิจารณาปัจจัยส่วนบุคคลของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง โดยพิจารณาตามอายุ พบว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 8.99 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-1 ปี และผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 60 ปี มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 13.53 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.420$ ) เมื่อพิจารณาประวัติการสูบบุหรี่ พบว่าผู้ป่วยที่มีประวัติว่าไม่เคยสูบบุหรี่เลย มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 10.88 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง

100 คน-ปี นอกจากนี้พบว่า ผู้ป่วยที่มีประวัติเคยสูบบุหรี่ มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 8.40 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี และผู้ป่วยที่ปัจจุบันยังสูบบุหรี่พบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 19.07 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.638$ ) เมื่อพิจารณาประวัติการดื่มแอลกอฮอล์ พบว่าผู้ป่วยที่มีประวัติไม่เคยดื่มแอลกอฮอล์เลย มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 8.71 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี นอกจากนี้พบว่า ผู้ป่วยที่มีประวัติเคยดื่มแอลกอฮอล์ มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 11.46 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี และผู้ป่วยที่ปัจจุบันยังดื่มอยู่พบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 15.79 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.942$ ) เมื่อพิจารณาตามระยะการดำเนินของโรค พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงในระยะเริ่มต้น (ระยะ ที่ 1 และ 2) มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 12.72 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี และผู้ป่วยที่อยู่ในระยะลุกลาม (ระยะที่ 3 และ 4) จะมีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 12.14 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.620$ ) เมื่อพิจารณาตามประวัติการรักษา พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่ได้รับการรักษาด้วยรังสีรักษาเพียงอย่างเดียว มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 10.86 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยรังสีรักษาพร้อมกับเคมีบำบัดพบมีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 14.32 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ในผู้ป่วยที่รักษาด้วยการผ่าตัดนำกล่องเสียงออกทั้งหมด พบมีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 10.73 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี และผู้ป่วยที่รักษาด้วยการผ่าตัดกล่องเสียงร่วมกับรังสีรักษาพบ มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 12.65 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.997$ ) ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4

ตารางที่ 3 ผลของปัจจัยส่วนบุคคล ทางคลินิก และปัจจัยทางโมเลกุล ต่อระยะเวลาการเป็นมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำสำหรับตัวแปรแจงนับ

ปัจจัย ที่มีผลต่อการกลับมาเป็นซ้ำ	จำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง (จำนวน 41 ราย)	จำนวนผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ (n=15)	ระยะเวลาเฉลี่ยของการ กลับมาเป็นซ้ำ (ปี)	Person-Years of Observation	Incident rate/ 100 person years	p-value
<b>อายุ (42-85 ปี)</b>						
น้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี	12	3	4.90 (3.35-6.44)	33.36	8.99	0.420
มากกว่า 60 ปี	29	12	5.60 (4.03-7.16)	88.68	13.53	
<b>เพศ</b>						N/A
ชาย	41	15	5.95 (4.63-7.26)	122.05	12.20	
หญิง	0	0	0	0	0	
<b>ประวัติการสูบบุหรี่:</b>						0.638
ไม่สูบ	7	2	3.91 (1.51-6.31)	18.38	10.88	
เคยสูบ	10	4	3.85 (2.32-5.38)	59.53	8.40	
ปัจจุบันยังสูบบุหรี่อยู่	17	5	5.79 (4.20-7.38)	20.97	19.07	
<b>ประวัติการดื่มแอลกอฮอล์ :</b>						0.942
ไม่ดื่ม	7	2	5.18 (3.19-7.18)	22.96	8.71	
เคยดื่ม	6	2	3.20 (1.79-4.60)	61.09	11.46	
ปัจจุบันยังดื่มอยู่	20	7	5.29 (3.75-6.84)	12.67	15.79	
<b>ระยะของโรคมะเร็งช่องสายเสียง :</b>						0.620
ระยะเริ่มต้น	7	4	5.17 (2.66-7.68)	31.45	12.72	
ระยะลุกลาม	34	11	6.37 (4.98-7.77)	90.60	12.14	
<b>การรักษา :</b>						0.997
รังสีรักษา	7	3	5.42 (2.45-8.40)	27.63	10.86	
รังสีรักษา ร่วมกับเคมีบำบัด	6	2	2.85 (1.95-3.74)	13.97	14.32	
ผ่าตัดกล่องเสียงออกทั้งหมด	3	1	4.02 (0.82-7.23)	9.32	10.73	
ผ่าตัดกล่องเสียงร่วมกับใช้รังสีรักษา	25	9	5.93 (4.21-7.64)	71.13	12.65	

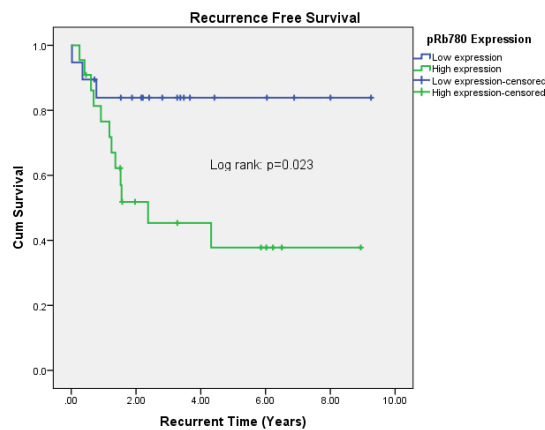
ตารางที่ 4 ผลของปัจจัยส่วนบุคคล ทางคลินิก และปัจจัยทางโมเลกุล ต่อระยะเวลาการเป็นมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำสำหรับตัวแปรแรงขับ (ต่อ)

ปัจจัยที่มีผลต่อการกลับมาเป็นซ้ำ	จำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง (จำนวน 41 ราย)	จำนวนผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ (n=15)	ระยะเวลาเฉลี่ยของการกลับมาเป็นซ้ำ (ปี)	Person-Years of Observation	Incident rate/ 100 person years	p-value
<b>ลักษณะของเซลล์มะเร็ง :</b> Well differentiated Moderate differentiated Poorly differentiated	25 16 0	6 9 0	6.95 (5.37-8.52) 4.32 (2.32-6.32) 0	86.64 35.40 0	6.92 25.42 0	0.022*
<b>การลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลือง :</b> ไม่ลุกลาม ลุกลาม	27 14	9 6	6.02 (4.48-7.57) 5.53 (3.34-7.72)	82.03 40.01	10.97 15.00	0.689
<b>การลุกลามไปยัง Anterior commissure :</b> ไม่ลุกลาม ลุกลาม	16 25	7 8	5.24 (3.21-7.27) 6.04 (4.21-7.87)	51.02 71.02	1.37 1.13	0.473
<b>การแสดงออกของโปรตีน pRb780 :</b> ต่ำ (H-score ≤ 125.8) สูง (H-score > 125.8)	19 22	3 12	7.83 (6.34-9.31) 4.34 (2.65-6.01)	63.26 58.79	4.74 20.41	0.023*
<b>การแสดงออกของโปรตีน c-Met :</b> ต่ำ (H-score ≤ 166.9) สูง (H-score > 166.9)	22 18	12 2	4.54 (2.81-6.27) 7.98 (6.73-9.23)	62.86 58.78	19.09 3.40	0.011*
<b>การแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met:</b> pRb780 ต่ำ และ c-Met สูง pRb780 ต่ำ และ c-Met ต่ำ pRb780 สูง และ c-Met สูง pRb780 สูง และ c-Met ต่ำ	11 8 7 14	1 2 1 10	6.26 (5.10-7.43) 7.08 (4.47-9.69) 7.75 (5.59-99.91) 2.40 (1.31-3.52)	29.67 33.59 29.10 29.27	3.37 5.95 3.43 34.16	0.008*

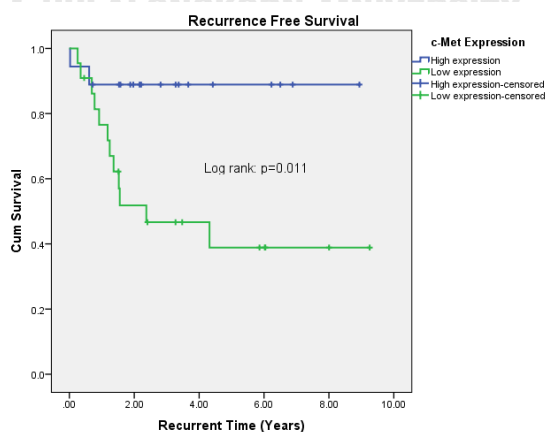
เมื่อพิจารณาปัจจัยทางคลินิก พบว่าในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่มีลักษณะของเซลล์มะเร็งแบบ Well differentiated มีอัตราการเกิดโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำเท่ากับ 6.92 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี โดยระยะเวลาเฉลี่ยการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 6.95 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะของเซลล์มะเร็งแบบ Moderate differentiate พบอัตราการเกิดโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำเท่ากับ 25.42 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ระยะเวลาเฉลี่ยของการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 4.32 ปี ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.022$ ) เมื่อพิจารณาการลุกลามของมะเร็งไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลือง พบว่าในผู้ป่วยที่ไม่มีการลุกลาม มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้ว เท่ากับ 10.97 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี และผู้ป่วยที่มีการลุกลามไปยังต่อมน้ำเหลือง พบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้วเท่ากับ 15.00 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.689$ ) เมื่อพิจารณาการลุกลามของมะเร็งไปยังบริเวณ anterior commissure พบว่าในผู้ป่วยที่ไม่มีการลุกลาม มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้วเท่ากับ 1.37 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี และผู้ป่วยที่มีการลุกลามไปยัง anterior commissure พบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำภายหลังจากการรักษาแล้วเท่ากับ 1.13 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.473$ )

เมื่อพิจารณาปัจจัยทางโมเลกุล พบว่าในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่มีผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 สูง (H-score > 125.8) จะมีอัตราการโรคเกิดมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำเท่ากับ 20.41 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี โดยระยะเวลาเฉลี่ยการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 4.34 ปี และผู้ป่วยที่มีผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ต่ำ (H-score  $\leq$  125.8) จะมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำเท่ากับ 4.74 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี โดยระยะเวลาเฉลี่ยการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 4.34 ปี ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.023$ ) และเมื่อพิจารณาผลการแสดงออกของโปรตีน c-Met พบว่าในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่มีผลการแสดงออกของโปรตีน c-Met ต่ำ (H-score  $\leq$  166.9) จะมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำเท่ากับ 19.09 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี โดยระยะเวลาเฉลี่ยการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 4.54 ปี และผู้ป่วยที่มีผลการแสดงออกของ

โปรตีน c-Met สูง (H-score > 166.9) จะมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำเท่ากับ 3.40 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี โดยระยะเวลาเฉลี่ยการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 7.98 ปี ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.011$ ) และเมื่อพิจารณาการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met พบว่าในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่มีผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 สูงและ c-Met ต่ำ จะมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำเท่ากับ 34.16 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี และผู้ป่วยที่มีผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ต่ำ และ c-Met สูง จะมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำเท่ากับ 3.37 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน-ปี ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.003$ )



ภาพประกอบ 26 กราฟเปรียบเทียบอัตราการปลอดการกลับมาเป็นซ้ำของผู้ป่วยมะเร็งช่องสายเสียง จำแนกตามผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 (Kaplan-Meier Curve)



ภาพประกอบ 27 กราฟเปรียบเทียบอัตราการปลอดการกลับมาเป็นซ้ำของผู้ป่วยมะเร็งช่องสายเสียง จำแนกตามผลการแสดงออกของโปรตีน c-Met (Kaplan-Meier Curve)

#### 4.5 การวิเคราะห์ปัจจัยที่สัมพันธ์กับอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงโดยสถิติ

##### Cox's Proportional Hazards Model

เลือกตัวแปรจากการวิเคราะห์อุบัติการณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงโดย Kaplan-Meier ที่ค่า  $p < 0.05$  ได้แก่ ลักษณะของเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met

จากการวิเคราะห์ค่าอัตราส่วนการกลับมาเป็นซ้ำอย่างหยาบ (Crude hazard ratio) โดยใช้ Cox's Proportional Hazards Model แบบการวิเคราะห์ตัวแปรเดียว ใน 2 ตัวแปร ได้แก่ ลักษณะของเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met พบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะของเซลล์มะเร็งแบบ Moderate differentiated จะมีความเสี่ยงต่อการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงเป็น 3.16 เท่าของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่มีลักษณะเซลล์มะเร็งแบบ Well differentiated (HR=3.16, 95%CI=1.12-8.92) และในผู้ป่วยที่มีผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 สูง และ c-Met ต่ำ จะมีความเสี่ยงต่อการกลับมาเป็นโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำเป็น 9.53 เท่าของผู้ป่วยที่มีผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ต่ำ และ c-Met สูง (HR=9.53, 95%CI=1.21-74.82) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ค่าอัตราส่วนการกลับมาเป็นซ้ำเมื่อปรับผลกระทบแล้ว (Adjusted hazard ratio) โดยใช้ Cox's Proportional Hazards Model แบบการวิเคราะห์ตัวแปรเชิงพหุ

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง ซึ่งมีระยะเวลาเฉลี่ยในการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 7 ปี โดยจากการวิเคราะห์ตัวแปรเชิงพหุ พบปัจจัยที่มีผลต่อระยะเวลาการกลับมาเป็นซ้ำของผู้ป่วย เมื่อควบคุมผลกระทบจากปัจจัยอื่น ได้แก่ ลักษณะของเซลล์มะเร็ง และการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met พบว่า ระยะเวลาการกลับมาเป็นซ้ำของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง มีความสัมพันธ์กับลักษณะของเซลล์มะเร็งที่พบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.015$ ) โดยผู้ป่วยที่มีลักษณะของเซลล์มะเร็งแบบ Moderate differentiated จะมีความเสี่ยงต่อการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงเป็น 4.21 เท่าของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่มีลักษณะเซลล์มะเร็งแบบ Well differentiated (HR=4.21, 95%CI=1.33-13.34) และผู้ป่วยที่มีผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 สูง และ c-Met ต่ำ จะมีความเสี่ยงต่อการกลับมาเป็นโรคมะเร็งช่อง

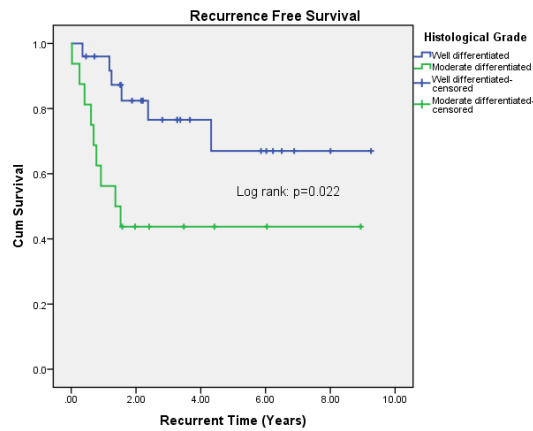


สายเสียงซ้ำเป็น 8.73 เท่าของผู้ป่วยที่มีผลการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ต่ำ และ c-Met สูง (HR=8.73, 95%CI=1.095-69.752) ดังแสดงในตารางที่ 5

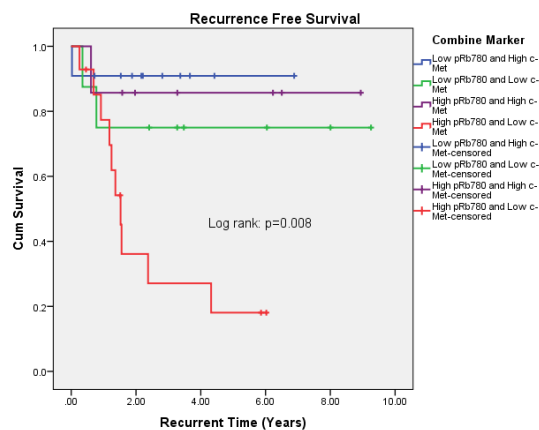
ตารางที่ 5 ผลของปัจจัยที่สัมพันธ์กับอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงโดยสถิติ Cox's Proportional Hazards Model

ปัจจัย ที่มีผลต่อการกลับมาเป็นซ้ำ	Crude HR (95%CI)	p-value	Adjusted HR (95%CI)	p-value
<b>ลักษณะของเซลล์มะเร็ง:</b>				
Well differentiated	1.00		1.00	
Moderate differentiated	3.16 (1.12-8.92)	0.030*	4.21 (1.33-13.34)	0.015*
Poorly differentiated	NA		NA	
<b>การแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met:</b>				
pRb780 ต่ำ และ c-Met สูง	1.00		1.00	
pRb780 ต่ำ และ c-Met ต่ำ	2.54 (0.23-28.11)	0.447	1.41 (0.123-16.260)	0.781
pRb780 สูง และ c-Met สูง	1.38 (0.09-22.10)	0.820	0.80 (0.048-13.153)	0.875
pRb780 สูง และ c-Met ต่ำ	9.53 (1.21-74.82)	0.032*	8.73 (1.094-69.638)	0.041*

\*p-value < 0.05



ภาพประกอบ 28 กราฟเปรียบเทียบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงจำแนกตามลักษณะของเซลล์มะเร็ง (Kaplan-Meier Curve)



ภาพประกอบ 29 กราฟเปรียบเทียบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงจำแนกตามการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met (Kaplan-Meier Curve)

## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผล

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมด 16 ชนิด ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ และไม่กลับมาเป็นซ้ำ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาแอนติบอดีที่ดีที่สุดสำหรับการพยากรณ์โอกาสกลับมาเป็นซ้ำ โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ร่วมกับ ข้อมูลทางคลินิก และข้อมูลทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งช่องสายเสียงตั้งแต่เดือน มกราคม 2553 ถึง ธันวาคม 2562 จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยจำนวน 41 ราย ที่เข้าเกณฑ์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ โดยเครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูลประกอบด้วย แบบบันทึกข้อมูลพื้นฐานทั่วไป ข้อมูลทางคลินิก ข้อมูลทางพยาธิวิทยา ข้อมูลการรักษา ข้อมูลการกลับมาเป็นซ้ำ รวมถึงชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องสายเสียงก่อนการรักษาที่ฝังในพาราฟินบล็อก ผลจากการศึกษาพบผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำ จำนวน 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 36.6 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด โดยอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งช่องสายเสียงซ้ำ เท่ากับ 65 ปี นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยมะเร็งระยะลุกลาม (ระยะที่ 3-4) โดยวิธีการรักษาที่นิยมใช้กับผู้ป่วยคือการผ่าตัดกล่องเสียงร่วมกับการใช้รังสีรักษา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะของโรคมะเร็ง และอาการของผู้ป่วยในแต่ละราย นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำส่วนใหญ่มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังบริเวณ anterior commissure ในขณะที่การลุกลามไปยังบริเวณต่อมน้ำเหลืองพบได้น้อยในผู้ป่วยกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำ เมื่อพิจารณาจากข้อมูลทางพยาธิวิทยา พบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำมีลักษณะเซลล์มะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุด คือ Moderate differentiated คิดเป็นร้อยละ 60 ของผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำทั้งหมด และเมื่อวิเคราะห์อุบัติการณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง โดยจำแนกตามปัจจัยต่าง ๆ โดยมีระยะเวลาในการติดตามผู้ป่วยแต่ละรายที่แตกต่างกัน โดยนับเวลาตั้งแต่ภายหลังจากการรักษาจนกระทั่งพบการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง พบว่าในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่มีลักษณะของเซลล์มะเร็งแบบ Well differentiated มีอัตราการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 6.92 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คนใน 1 ปี โดยมีระยะเวลาเฉลี่ยของการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 7 ปี ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะของเซลล์มะเร็งแบบ Moderate differentiated พบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 25.42 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คนใน 1 ปี โดยมีระยะเวลาเฉลี่ยของการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 4 ปี ซึ่งมีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.022$ ) โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Ramasamy Padma และคณะ(81) ที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะของเซลล์มะเร็ง (histopathological grade) กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องปาก พบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะของเซลล์มะเร็งแบบ Moderate differentiated มีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำได้มากกว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะเซลล์มะเร็งแบบ Well differentiated จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ได้กล่าวมาในข้างต้นสรุปได้ว่า ปัจจัยส่วนบุคคลนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง ในขณะที่ปัจจัยทางคลินิก ได้แก่ ลักษณะของเซลล์มะเร็ง มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง

ในส่วนของคำถามหลักของงานวิจัยที่ว่า การแสดงออกในระดับโปรตีนของเนื้อเยื่อมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ และมะเร็งช่องสายเสียงที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำมีความแตกต่างกันหรือไม่ทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาโดยใช้วิธีการเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน H-score ที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม Aperio Imagescope V.10.2.2.2352 software package (Aperio Technologies, USA) เนื่องจากมีความแม่นยำในการนำมาใช้ประเมินการแสดงออกของแอนติบอดีต่าง ๆ (82-84) เมื่อเทียบกับการประเมินโดยผู้ประเมินหลายคน ซึ่งผลการเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน H-score ของแอนติบอดีทั้งหมด 16 ชนิด พบว่ากลุ่มที่มีค่ามัธยฐาน H-score ไม่แตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่ย้อมด้วยแอนติบอดี Ki67 RPA32 CyclinD1 P53 Bxl2 BAX BAK Bclxl PI3K B-catenin CD44 p16 VEGF และ HIF1alpha ส่วนกลุ่มที่มีค่ามัธยฐาน H-score ที่มีความแตกต่างกันได้แก่ กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่ย้อมด้วยแอนติบอดี pRb780 และ c-Met โดยค่ามัธยฐาน H-score ของโปรตีน pRb780 ในกลุ่มตัวอย่างที่กลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 194.9 คะแนน และกลุ่มที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 98.80 คะแนน ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.0014$ ) ในขณะที่ค่ามัธยฐาน H-score ของโปรตีน c-Met ในกลุ่มตัวอย่างที่กลับมาเป็นซ้ำ เท่ากับ 103.6 คะแนน และกลุ่มที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำ เท่ากับ 178.2 คะแนน ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p= 0.0012$ )

เมื่อวิเคราะห์อุบัติการณ์การกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง โดยพิจารณาการแสดงออกของระดับโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่มีผลการแสดงออกของระดับโปรตีน pRb780 สูง (H-score>125.8) และ c-Met ต่ำ (H-score≤166.9)

จะพบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 34.16 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คน ใน 1 ปี ในทางกลับกันผู้ป่วยที่มีผลการแสดงออกของระดับโปรตีน pRb780 ต่ำ ( $H\text{-score} \leq 125.8$ ) และ c-Met สูง ( $H\text{-score} > 166.9$ ) จะพบอัตราการกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 3.37 ครั้ง ต่อจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง 100 คนใน 1 ปี ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p=0.003$ )

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่าง ๆ กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง โดยเลือกปัจจัยจากการวิเคราะห์อัตราการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงที่มีค่า  $p\text{-value} < 0.05$  มาวิเคราะห์ด้วย Crude hazard ratio พบมีปัจจัยที่ส่งผลต่อการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ ลักษณะของเซลล์มะเร็ง และ การแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย adjusted hazard ratio พบว่าลักษณะของเซลล์มะเร็ง และ การแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือเมื่อผู้ป่วยที่มีลักษณะเซลล์มะเร็งแบบ Moderate differentiated และมีการแสดงออกของโปรตีน pRb780 สูง ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีน c-Met ต่ำ จะมีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำได้ถึง 8.73 เท่า เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน pRb780 ต่ำ ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีน c-Met สูง ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ KAMAL MORSHED และคณะ(85) ที่ได้ทำการศึกษาค่าความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีน pRb ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกล่องเสียง กับ ลักษณะทางคลินิก และอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย จำนวน 130 ราย พบว่า การแสดงออกของโปรตีน pRb มีความสัมพันธ์กับระยะของมะเร็งที่สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ pRb สูง ( $\geq 50\%$ ) จะมีอัตราการรอดชีวิตที่แย่กว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกต่ำ ( $< 50\%$ ) อย่างไรก็ตามในปี 2019, Li-Ang Lee และคณะ(31) ได้ศึกษาค่าความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน pRb Bcl2 p16 และ p53 ในผู้ป่วยมะเร็งช่องสายเสียงในระยะเริ่มต้นกับระยะเวลาการปลอดจากมะเร็ง (Disease free survival; DFS) จำนวน 37 ราย โดยการศึกษานี้ได้ใช้วิธีคำนวณร้อยละของ positive index (%PI) และค่ามัธยฐาน H-score ของการแสดงออกของโปรตีน จากการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ Bcl2 และ pRb ที่ประเมินโดยใช้วิธีคำนวณหาร้อยละ positive index (%PI) มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการปลอดจากมะเร็ง (Disease free survival; DFS)

เมื่อพิจารณาถึงกลไกการทำงานของโปรตีน pRb780 พบว่าโปรตีน Retinoblastoma (Rb) ซึ่งเป็น tumor suppressor protein ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านมะเร็ง โดยกลไกที่ทราบคือทำหน้าที่จับกับ Transcription factor ชื่อว่า E2F เพื่อไม่ให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว แต่ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน phospho-retinoblastoma (pRb) ซึ่งเป็นการเติมหมู่ phosphate ให้กับ Rb ทำให้ไม่สามารถจับกับโปรตีน E2F ได้ จึงส่งผลให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว เพราะฉะนั้นเมื่อมีการพบ phospho-retinoblastoma (pRb) มาก นั้นหมายความว่าเซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้นด้วย ซึ่งโดยทั่วไปจะสามารถพบการทำงานที่ผิดปกติของ pRb ได้ในมะเร็งศีรษะและลำคอ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ pRb มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด recurrence และการเสียชีวิต ในผู้ป่วย oropharyngeal cancer(86) อีกด้วย

เมื่อพิจารณาผลของการแสดงออกของโปรตีน c-Met ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ MEI JIANG และคณะ(87) ที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน c-Met กับการอยู่รอดของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงจำนวน 71 ราย พบจำนวนผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ ทั้งหมด 39 ราย โดยในการศึกษานี้ได้ใช้ค่ามัธยฐาน H-score ของการแสดงออกของโปรตีน c-Met ที่ 160 คะแนน เป็นจุดตัดที่เหมาะสม (Cut-off point) ในการจำแนกการแสดงออกของโปรตีน c-Met ออกเป็นสูงและต่ำ เมื่อทำการวิเคราะห์การอยู่รอด (Survival analysis) พบว่า ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน c-Met สูง จะมีอัตราการรอดชีพ (Overall survival; OS) อยู่ที่ 2 ปี และเมื่อพิจารณาระยะปลอดจากมะเร็ง (Disease free survival; DFS) พบว่า ผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน c-Met ต่ำ จะมีระยะเวลาการปลอดจากมะเร็ง (Disease free survival; DFS) นานกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของโปรตีน c-Met สูง

เมื่อพิจารณาถึงกลไกการทำงานของโปรตีน c-Met พบว่า c-Met pathway มีบทบาทควบคุมการทำงานของเซลล์หลายอย่าง เช่น cell survival, cell proliferation และ Angiogenesis เป็นต้น และในหลายๆ งานวิจัยพบว่า การแสดงออกที่มากเกินไป (Over expression) ของโปรตีน c-Met มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับ clinical prognosis ของมะเร็งในหลายๆ ชนิด ซึ่งผลของการทดลองในครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้อ้างมาในข้างต้น โดยสามารถอธิบายเหตุผลที่พบการแสดงออกของโปรตีน c-Met ที่ลดลงในผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ ดังนี้การทำงานของโปรตีนมีลักษณะเป็นเครือข่ายมีทั้งการทำงานแบบกระตุ้นและแบบยับยั้งด้วยกลไก

หลายกลไก ซึ่งอาจจะมีโปรตีน หรือ miRNA อื่นๆ มายับยั้งการทำงานของโปรตีน c-Met ได้ ซึ่ง กลไกนี้เองทำให้โปรตีน c-Met มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของมะเร็ง จากการศึกษาของ Keiichi Koshizuka และคณะ(88) ได้ระบุไว้ว่า miR-1 และ miR-206 ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ c-Met ให้ลดลง อย่างไรก็ตามในการศึกษาของ Na Li และคณะ (89) ระบุไว้ว่า miR-34a อาจมีบทบาทในการควบคุมระดับการแสดงออกของโปรตีน c-Met ให้ลดลง แต่ไม่ใช่ผู้ป่วยทุกราย

จะเห็นได้ว่าการศึกษาหลายการศึกษาที่ได้กล่าวมาข้างต้น พบว่าการแสดงออกของโปรตีน เป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับนำมาพยากรณ์การกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งช่องสายเสียงได้ โดยการศึกษาที่ผ่านมาสามารถพบการแสดงออกของโปรตีนที่มากเกินไป หรือน้อยเกินไป ในมะเร็งชนิดเดียวกันได้ ทั้งนี้คาดว่าขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น Clone ของแอนติบอดีที่นำมาใช้ การเลือกจุดตัดที่เหมาะสม (cut off point) แม้กระทั่งปัจจัยที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีน ได้แก่ miRNA เป็นต้น

เมื่อพิจารณาถึงความน่าจะเป็นสำหรับการนำปัจจัยการแสดงออกของโปรตีนกับลักษณะของเซลล์มะเร็งที่พบมาใช้ทำนายการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง จะเห็นได้ว่าเมื่อนำผลของการแสดงออกของโปรตีน pRb780 มาใช้ทำนายการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง เพียงปัจจัยเดียว จะได้ค่า Sensitivity = 80.00% และ ค่า Specificity = 61.54% เมื่อนำผลของการแสดงออกของโปรตีน c-Met มาใช้ทำนายการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง เพียงอย่างเดียว จะได้ค่า Sensitivity = 85.71% และ ค่า Specificity = 61%, และเมื่อนำลักษณะของเซลล์มะเร็งมาใช้ทำนายการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียง จะได้ค่า Sensitivity = 60.00% และ ค่า Specificity = 60.98% อย่างไรก็ตาม เมื่อนำปัจจัยทั้ง 3 ได้แก่ ลักษณะของเซลล์มะเร็งที่พบ การแสดงออกของโปรตีน pRb780 และ c-Met จะทำให้ค่า Specificity เพิ่มขึ้นเป็น 94.15%

## 5.2 สรุปผลการวิจัย

- 1) pRb780 และ c-Met เป็นแอนติบอดีที่ดีที่สุดจาก 16 แอนติบอดี ซึ่งอาจสามารถนำมาเป็นปัจจัยในพยากรณ์โอกาสกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงได้ โดยพบการแสดงออกของ

โปรตีน pRb780 สูง และ c-Met ต่ำ ในกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงที่กลับมาเป็นซ้ำ ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่กลับมาเป็นซ้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปัจจัยทางคลินิก ได้แก่ ลักษณะของเซลล์มะเร็ง และปัจจัยทางโมเลกุล ได้แก่ การแสดงออกของโปรตีน pRb780 ร่วมกับ c-Met มีความสัมพันธ์กับการกลับมาเป็นซ้ำของมะเร็งช่องสายเสียงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 5.3 ข้อดีของการทำวิจัย

- 1) การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในระดับโปรตีน โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่าย และมีค่าใช้จ่ายน้อย เหมาะสำหรับตัวอย่างที่เก็บไว้นาน อย่างเช่น ชิ้นเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟินบล็อก ก็ยังสามารถนำมาใช้ทดสอบได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการการจัดเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐาน และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับการทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในอนาคตต่อไป
- 2) ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาคุณภาพการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงได้

### 5.4 ข้อจำกัดของการทำวิจัย

- 1) เนื่องจากเป็นการเก็บข้อมูลย้อนหลังทำให้ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย ข้อมูลทางคลินิก ข้อมูลทางพยาธิวิทยาบางส่วนที่ทบทวนจากเวชระเบียนเก่า อาจจะไม่ครบถ้วนสมบูรณ์ และมีข้อมูลบางส่วนที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาจากต่างโรงพยาบาลขาดหายไป
- 2) ขนาดประชากรที่นำมาศึกษาอาจจะต่ำกว่าเกณฑ์ที่กำหนดเล็กน้อย อย่างไรก็ตามในการเก็บข้อมูลวิจัยครั้งนี้มีข้อจำกัดในการเลือกตัวอย่าง ซึ่งเป็นผู้ป่วยเฉพาะโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เท่านั้น จึงอาจไม่สามารถที่จะเป็นตัวแทนผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงทั้งหมดได้

### 5.5 ข้อเสนอแนะ

ศึกษาในกลุ่มประชากรที่จำนวนมากขึ้น เพื่อเพิ่มความถูกต้องและน่าเชื่อถือของข้อมูล และสามารถนำผลการศึกษาไปใช้ประโยชน์ เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งช่องสายเสียงได้ดียิ่งขึ้น



บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

1. Nocini R, Molteni G, Mattiuzzi C, Lippi G. Updates on larynx cancer epidemiology. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2020;32(1):18.
2. Zbären P, de Bree R, Takes RP, Rinaldo A, Ferlito A. Which is the most reliable diagnostic modality for detecting locally residual or recurrent laryngeal squamous cell carcinoma after (chemo) radiotherapy? : Springer; 2013.
3. Michaels L. *Pathology of the larynx*: Springer Science & Business Media; 2012.
4. La Vecchia C, Zhang ZF, Altieri AJEJoCP. Alcohol and laryngeal cancer: an update. 2008:116-24.
5. Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case–control study. 2002;13(10):957-64.
6. Vassileiou A, Vlastarakos P, Kandiloros D, Delicha E, Ferekidis E, Tzagaroulakis A, et al. Laryngeal cancer: smoking is not the only risk factor. 2012;8(4):273.
7. Jakobsson P, Eneroth C, Killander D, Moberger G, Mårtensson BJArt, physics, biology. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. 1973;12(1):1-8.
8. Tangjaturonrasme N, Vatanasapt P, Bychkov A. Epidemiology of head and neck cancer in Thailand. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2018;14(1):16-22.
9. Thompson LD. Laryngeal dysplasia, squamous cell carcinoma, and variants. *Surgical pathology clinics*. 2017;10(1):15-33.
10. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and neck cancers—major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(2):122-37.
11. Cavazos LC, Soto-Galindo GA, Luis J, González T. Laryngeal Cancer Update: A. 2017.
12. Chotipanich AJC. Total Laryngectomy: A Review of Surgical Techniques. 2021;13(9).

13. Akimoto T, Nonaka T, Kitamoto Y, Ishikawa H, Ninomiya H, Chikamatsu K, et al. Radiation therapy for T2N0 laryngeal cancer: A retrospective analysis for the impact of concurrent chemotherapy on local control. 2006;64(4):995-1001.
14. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. 2003;349(22):2091-8.
15. Kundu S, Nestor MJTB. Targeted therapy in head and neck cancer. 2012;33(3):707-21.
16. Moe K, Wolf GT, Fisher SG, Hong WKJAOH, Surgery N. Regional metastases in patients with advanced laryngeal cancer. 1996;122(6):644-8.
17. Pan Y, Hong Y, Liang Z, Zhuang WJEAoO-R-L. Survival analysis of distant metastasis of laryngeal carcinoma: analysis based on SEER database. 2019;276(1):193-201.
18. Motamed M, Laccourreye O, Bradley PJ. Salvage conservation laryngeal surgery after irradiation failure for early laryngeal cancer. The Laryngoscope. 2006;116(3):451-5.
19. Busoni M, Deganello A, Gallo OJAOI. Pharyngocutaneous fistula following total laryngectomy: analysis of risk factors, prognosis and treatment modalities. 2015;35(6):400.
20. Mortuaire G, Francois J, Wiel E, Chevalier DJTL. Local recurrence after CO2 laser cordectomy for early glottic carcinoma. 2006;116(1):101-5.
21. Condon LT, Ashman JN, Ell SR, Stafford ND, Greenman J, Cawkwell L. Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance. International journal of cancer. 2002;100(4):472-5.
22. Eilber FR, Morton DL, Ketcham AS. Immunologic abnormalities in head and neck cancer. The American Journal of Surgery. 1974;128(4):534-8.
23. Barzan L, Talamini R. Analysis of prognostic factors for recurrence after neck dissection. Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery. 1996;122(12):1299-302.
24. de Carvalho MB. Quantitative analysis of the extent of extracapsular invasion and its prognostic significance: a prospective study of 170 cases of carcinoma

- of the larynx and hypopharynx. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*. 1998;20(1):16-21.
25. Cuny F, Meunier A, Heutte N, Rame J-P, De Raucourt D, Babin E, et al. Laryngeal preservation in ENT oncology. Retrospective series of 246 patients managed in the Caen University Hospital and Francois Baclesse Cancer Care Center between 1998 and 2008. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*. 2015;132(3):129-34.
  26. Al-Mamgani A, van Rooij PH, Mehilal R, Verduijn GM, Tans L, Kwa SL. Radiotherapy for T1a glottic cancer: the influence of smoking cessation and fractionation schedule of radiotherapy. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2014;271(1):125-32.
  27. Lyhne NM, Johansen J, Kristensen CA, Andersen E, Primdahl H, Andersen LJ, et al. Pattern of failure in 5001 patients treated for glottic squamous cell carcinoma with curative intent—a population based study from the DAHANCA group. *Radiotherapy and Oncology*. 2016;118(2):257-66.
  28. Hwang C-F, Cho C-L, Huang C-C, Wang J-S, Shih Y-L, Su C-Y, et al. Loss of cyclin D1 and p16 expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. *Annals of oncology*. 2002;13(8):1246-51.
  29. Weinstein IB. Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis*. 2000;21(5):857-64.
  30. Morshed K, KOROBOWICZ E, Skomra D, SZYMAŃSKI M, POLZ-DACEWICZ M, GOŁĄBEK W, et al. Immunohistochemical study of retinoblastoma protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma according to low and high overexpression. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2008;52:675-81.
  31. Lee LA, Fang TJ, Li HY, Huang CG, Chen TC, Liao CT, et al. Low expression of pRB predicts disease relapse in early glottic cancer treated with transoral laser microsurgery. 2019;129(6):E220-E6.

32. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, Mazo A, Lleonart M, Castellvi J, et al. p16Ink4a overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. 2011;30(18):2087-97.
33. Hwang C-F, Cho C-L, Huang C-C, Wang J-S, Shih Y-L, Su C-Y, et al. Loss of cyclin D1 and p16 expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. 2002;13(8):1246-51.
34. Yuan JP, Wang LW, Qu AP, Chen JM, Xiang QM, Chen C, et al. Quantum dots-based quantitative and in situ multiple imaging on ki67 and cytokeratin to improve ki67 assessment in breast cancer. PloS one. 2015;10(4):e0122734.
35. Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, Rasmi RR. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. Clinica Chimica Acta. 2019;491:39-45.
36. Yuan JP, Wang LW, Qu AP, Chen JM, Xiang QM, Chen C, et al. Quantum dots-based quantitative and in situ multiple imaging on ki67 and cytokeratin to improve ki67 assessment in breast cancer. 2015;10(4):e0122734.
37. Sittel C, Eckel HE, Damm M, von Pritzbuer E, Martin Kvasnicka H. Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. The Laryngoscope. 2000;110(6):1012-7.
38. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. Experimental and therapeutic medicine. 2010;1(5):747-54.
39. ประยงค์ ป, ร นธวปก, รักรัษ สพบ. อะพอพโทซิส: วิธี และการตรวจวัด= Apoptosis: Pathway and Assay. Journal of Health Research. 2007;21(3):227-38.
40. Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, Bittremieux M, Parys JB, De Smedt H, et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research. 2014;1843(10):2240-52.
41. Loreto C, Rapisarda V, Carnazza ML, Musumeci G, D'Agata V, Valentino M, et al. Bitumen products alter bax, bcl-2 and cytokeratin expression: An in vivo

- study of chronically exposed road pavers. *Journal of cutaneous pathology*. 2007;34(9):699-704.
42. Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, Weinberg AM, Al-Wasiyah MK, Alqahtani MH, et al. Biomarkers of chondrocyte apoptosis and autophagy in osteoarthritis. 2015;16(9):20560-75.
  43. Wyllie A. Apoptosis (the 1992 Frank Rose memorial lecture). *British Journal of Cancer*. 1993;67(2):205-8.
  44. Reed JC. Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Current opinion in oncology*. 1999;11(1):68.
  45. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual review of immunology*. 1998;16.
  46. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. 1995.
  47. Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current opinion in cell biology*. 2005;17(6):617-25.
  48. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281(5381):1322-6.
  49. Bradford CR, Kumar B, Bellile E, Lee J, Taylor J, D'Silva N, et al. Biomarkers in advanced larynx cancer. *The Laryngoscope*. 2014;124(1):179-87.
  50. Qu C, Zhao Y, Feng G, Chen C, Tao Y, Zhou S, et al. RPA 3 is a potential marker of prognosis and radioresistance for nasopharyngeal carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2017;21(11):2872-83.
  51. Ozaki T, Nakagawara AJC. Role of p53 in cell death and human cancers. 2011;3(1):994-1013.
  52. Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma and their impact on disease progression and treatment response. 2016;117(12):2682-92.
  53. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. 2002;4(2):1-7.
  54. Wu G, Wang F, Li K, Li S, Zhao C, Fan C, et al. Significance of TP53 mutation in bladder cancer disease progression and drug selection. 2019;7:e8261.

55. Cole AJ, Dwight T, Gill AJ, Dickson K-A, Zhu Y, Clarkson A, et al. Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. 2016;6(1):1-12.
56. Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi S-R, Tran Q-C, et al. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. 1998;58(6):1090-4.
57. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, et al. p53 expression: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. 1996;88(8):519-29.
58. Senbanjo LT, Chellaiah MAJ. *Cell Biology*. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. 2017;5:18.
59. Chang G, Zhang H, Wang J, Zhang Y, Xu H, Wang C, et al. CD44 targets Wnt/ $\beta$ -catenin pathway to mediate the proliferation of K562 cells. 2013;13(1):1-13.
60. de Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, Lacko M, Peutz-Kootstra CJ, de Jong JM, et al. CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. 2010;16(21):5329-38.
61. Jeong B-J, Liang ZL, Huang SM, Lim JS, Kim JM, Lee HJ, et al. CD44 is associated with tumor recurrence and is an independent poor prognostic factor for patients with localized clear cell renal cell carcinoma after nephrectomy. 2012;3(5):811-7.
62. Yong C-S, Ou Yang C-M, Chou Y-H, Liao C-S, Lee C-W, Lee C-C. CD44/CD24 expression in recurrent gastric cancer: a retrospective analysis. 2012;12(1):1-7.
63. Zhai Y, Wu R, Schwartz DR, Darrah D, Reed H, Kolligs FT, et al. Role of  $\beta$ -catenin/T-cell factor-regulated genes in ovarian endometrioid adenocarcinomas. 2002;160(4):1229-38.
64. Shang S, Hua F, Hu Z-W. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. 2017;8(20):33972.
65. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. 2003;3(10):721-32.

66. Gruber G, Greiner RH, Hlushchuk R, Aebbersold DM, Altermatt HJ, Berclaz G, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? 2004;6(3):1-8.
67. Wang X, Du Z, Xu T, Wang X-J, Li W, Gao J, et al. HIF-1 $\alpha$  is a rational target for future ovarian cancer therapies. 2021:5495.
68. Gong L, Zhang W, Zhou J, Lu J, Xiong H, Shi X, et al. Prognostic value of HIFs expression in head and neck cancer: a systematic review. 2013;8(9):e75094.
69. Sierra JR, Tsao M-S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. Therapeutic advances in medical oncology. 2011;3(1\_suppl):S21-S35.
70. Al-Maghrabi J, Emam E, Gomaa W, Saggaf M, Buhmeida A, Al-Qahtani M, et al. c-MET immunostaining in colorectal carcinoma is associated with local disease recurrence. BMC cancer. 2015;15(1):1-6.
71. Liu W, Fu Y, Xu S, Ding F, Zhao G, Zhang K, et al. c-Met expression is associated with time to recurrence in patients with glioblastoma multiforme. Journal of Clinical Neuroscience. 2011;18(1):119-21.
72. Chen J. Multiple signal pathways in obesity-associated cancer. Obesity Reviews. 2011;12(12):1063-70.
73. Yothaisong S, Loilome W. PI3K/Akt Signaling Pathway in Normal and Malignant Cells. Srinagarind Medical Journal. 2012;27(1):66-76.
74. Chen J, Crawford R, Chen C, Xiao Y. The key regulatory roles of the PI3K/Akt signaling pathway in the functionalities of mesenchymal stem cells and applications in tissue regeneration. Tissue Engineering Part B: Reviews. 2013;19(6):516-28.
75. Brandtzaeg P, Jøim. The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. 1998;216(1-2):49-67.
76. Haines DM, West KH, JVI, Immunopathology. Immunohistochemistry: Forging the links between immunology and pathology. 2005;108(1-2):151-6.
77. Lin F, Chen Z, JAoP, Medicine L. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. 2014;138(12):1564-77.



78. Seidal T, Balaton AJ, Battifora HJTajosp. Interpretation and quantification of immunostains. 2001;25(9):1204-7.
79. Taylor C, Levenson RMJH. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. 2006;49(4):411-24.
80. De Matos LL, Trufelli DC, De Matos MGL, da Silva Pinhal MAJBi. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. 2010;5:BMI. S2185.
81. Padma R, Kalaivani A, Sundaresan S, Sathish PJJoo, JOMFP mp. The relationship between histological differentiation and disease recurrence of primary oral squamous cell carcinoma. 2017;21(3):461.
82. Lehr H-A, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G, Gown AMJJoH, Cytochemistry. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. 1997;45(11):1559-65.
83. McClelland RA, Finlay P, Walker KJ, Nicholson D, Robertson JF, Blamey RW, et al. Automated quantitation of immunocytochemically localized estrogen receptors in human breast cancer. 1990;50(12):3545-50.
84. Matos LLd, Stabenow E, Tavares MR, Ferraz AR, Capelozzi VL, Pinhal MADsJC. Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. 2006;61:417-24.
85. Morshed K, KOROBOWICZ E, Skomra D, SZYMAŃSKI M, POLZ-DACEWICZ M, GOŁĄBEK W, et al. Immunohistochemical study of retinoblastoma protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma according to low and high overexpression. 2008;52:675-81.
86. Plath M, Broglie MA, Förbs D, Stoeckli SJ, Jochum WJJoO-H, Surgery N. Prognostic significance of cell cycle-associated proteins p16, pRB, cyclin D1 and p53 in resected oropharyngeal carcinoma. 2018;47(1):1-9.
87. Jiang M, Zhang H, Xiao H, Zhang Z, Que D, Luo J, et al. High expression of c-Met and EGFR is associated with poor survival of patients with glottic laryngeal squamous cell carcinoma. 2018;15(1):931-9.

88. Koshizuka K, Hanazawa T, Fukumoto I, Kikkawa N, Matsushita R, Mataka H, et al. Dual-receptor (EGFR and c-MET) inhibition by tumor-suppressive miR-1 and miR-206 in head and neck squamous cell carcinoma. 2017;62(1):113-21.
89. Li N, Fu H, Tie Y, Hu Z, Kong W, Wu Y, et al. miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. 2009;275(1):44-53.



### ภาคผนวก

ตารางที่ 6 แสดงรายละเอียดของแอนติบอดีที่ใช้สำหรับการย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

No.	Antibody	Clonality	Incubate Time CC1 (min)	Incubate Time antibody (min)	Dilution	Localization
1	Bcl2	Poly	32	32	RTU	Cytoplasm
2	Bclxl	Mono	64	32	1:4000	Cytoplasmic
3	BAK	Mono	64	32	1:500	Cytoplasmic
4	BAX	Mono	64	32	1:500	Cytoplasmic
5	Beta-catenin	Mono	60	32	RTU	Membranous and nuclear
6	CD44		30	60	1:100	cell membrane
7	CyclinD1	Momo	60	20	RTU	Nuclear
8	Ki67	Mono	60	32	RTU	Nuclear
9	p16	Mono	36	32	RTU	Nuclear and/or cytoplasmic.
10	P53	Mono	60	32	RTU	Nuclear
11	HIF1alpha	Poly	30	60	1:500	Nuclear
12	pRb780	Poly	30	60	1:500	Nuclear
13	RPA32	Mono	60	37	1:300	Nuclear
14	c-Met	Mono	64	20	1:50	Cytoplasm
15	VEGF	Poly	30	32	1:500	Endothelial cell
16	PI3K	Mono	64	20	1:100	Cytoplasm

Mono = monoclonal antibody, Poly = Polyclonal antibody, RTU = Ready to use

การทำงานของเครื่องย้อมพิเศษทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ยี่ห้อ benchmark XT ventana ประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Slide preparation

- a. Deparaffinization และ Rehydrate ด้วยน้ำยา EZ Prep
- b. ล้างน้ำยา EZ Prep ออก ด้วยน้ำยา Reaction buffer

ขั้นตอนที่ 2 Heat-induced epitope retrieval, Epitope retrieval, Block endogenous peroxidase and block non-specification

- a. ปรับอุณหภูมิสไลด์เป็น 100 องศาเซลเซียส จากนั้นทำเครื่องจะ incubate slide ในน้ำยา cell conditioner#1 buffer (CC1) ระยะเวลาในการ Incubate (ตารางที่ 5)
- b. ล้างสไลด์ด้วยน้ำยา Reaction buffer ปรับอุณหภูมิให้เป็น 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการ incubate นาน 4 นาที
- c. แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำยา Reaction buffer อีกครั้ง
- d. หยด UV inhibitor เพื่อ Block endogenous peroxidase และ block non-specification และใช้เวลาในการ incubate นาน 4 นาที
- e. จากนั้นล้างออกด้วยน้ำยา reaction buffer

ขั้นตอนที่ 3 Antibody application

- a. เมื่อถึงขั้นตอนนี้ให้หยด Antibody ลงบนแผ่นสไลด์ ประมาณ 100 ไมโครลิตร เวลาในการ Incubate slide ขึ้นอยู่กับชนิดของ antibody (ตารางที่ 5) จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำยา Reaction buffer
- b. ปรับอุณหภูมิให้เป็น 37 องศาเซลเซียส, incubate นาน 4 นาทีแล้ว ล้างสไลด์ด้วยน้ำยา Reaction buffer อีกครั้ง
- c. เครื่องย้อมทำการหยด secondary antibody คือ UV HRP universal multimer จำนวน 1 หยด และ incubate นาน 8 นาที

d. แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำยา Reaction buffer

ขั้นตอนที่ 4 Color development

- a. เครื่องจะหยดน้ำยา DAB (di-amino-benidine) กับ UV DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> และ incubate นาน 8 นาที
- b. ล้างสไลด์ด้วยน้ำยา Reaction buffer
- c. จากนั้นเครื่องจะหยด UV Copper และ incubate นาน 4 นาที
- d. ล้างสไลด์ด้วยน้ำยา Reaction buffer
- e. Counterstain ด้วย Hematoxylin incubate นาน 4 นาที
- f. ล้างสไลด์ด้วยน้ำยา Reaction buffer 2 ครั้ง
- g. Post-Counterstain ด้วย Bluing incubate นาน 4 นาที
- h. ล้างสไลด์ด้วย Reaction buffer

การทำงานของโปรแกรม Aperio Imagescope V.10.2.2.2352 software package (Aperio Technologies,USA) สามารถวิเคราะห์การติดสีได้ 3 แบบ คือ นิวเคลียส ไฮโดรฟลาสซิม และเซลล์เมมเบรน ซึ่งการกำหนดค่าที่ใช้ในการประเมินการติดสี มีดังนี้

ตารางที่ 7 การตั้งค่าการทำงานของโปรแกรม Aperio Imagescope ในการประเมินการติดสีของ นิวเคลียส (Nuclear V9)

Attribute	Value	Description
Lower Threshold	0	Limit for intensity Thresholding ( $0 < \text{value} \leq 225$ )
Upper Threshold	230	Limit for intensity Thresholding ( $0 < \text{value} \leq 225$ )
Min Nuclear Size ( $\mu\text{m}^2$ )	20	Minimum area for detectable nuclei (Micron-square)
Max Nuclear Size ( $\mu\text{m}^2$ )	1000000	Maximum area for detectable nuclei (Micron-square)
Min Roundness	0.1	Nuclei with roundness less than this are not reported ( $0.0 < \text{value} < 1.0$ )
Min Compactness	0	Nuclei with compactness less than this are not reported ( $0.0 < \text{value} < 1.0$ )
Min Elongation	0.1	Nuclei with aspect ratios less than this are not reported ( $0.0 < \text{value} < 1.0$ )
Weak (1+) Threshold	210	Intensity threshold (upper limit) of weak positive nuclei
Moderate (2+) Threshold	188	Intensity threshold (upper limit) of medium positive nuclei
Strong (3+) Threshold	162	Intensity threshold (upper limit) of strong positive nuclei
Positive Stain (Red)	0.245	OD for positive Red: default DAB
Positive Stain (Green)	0.509	OD for positive green: default DAB
Positive Stain (blue)	0.825	OD for positive blue: default DAB

ตารางที่ 8 การตั้งค่าการทำงานของโปรแกรม Aperio Imagescope ในการประเมินการติดสีของไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic V2)

Attribute	Value	Description
Averaging Radius (um)	0.5	Larger radius
Min Nuclear Area (um <sup>2</sup> )	20	used to exclude small nuclei and for declustering neighboring nuclei
Cytoplasmic Distance (um)	6	Cytoplasm will grow from nucleus up to this amount
(1+) Threshold	210	(1+) Threshold for positive stain
(2+) Threshold	180	(2+) Threshold for positive stain
(3+) Threshold	150	(3+) Threshold for positive stain
Positive Stain (Red)	0.268	OD for positive Red: default DAB
Positive Stain (Green)	0.57	OD for positive green: default DAB
Positive Stain (blue)	0.776	OD for positive blue: default DAB
Max Cell Dimension (um)	25	Used to set view overlap for counting purposes

ตารางที่ 9 การตั้งค่าการทำงานของโปรแกรม Aperio Imagescope ในการการประเมินการติดสีของ เซลล์เมมเบรน (Membrane V9)

Attribute	Value	Description
Cell/nucleus requirement	All cell	Include/Exclude cell without the a nucleus
Max cell radius (um)	5	Maximum radius (micron) to limit cell growth (0<value<100)
Min cell size (um <sup>2</sup> )	30	Minimum area for detectable cell (micron Squared)
Max cell size (um <sup>2</sup> )	2000	Maximum area for detectable cell (micron squared)
Min Roundness	0.1	Membrane (cell) objects with roundness less than this are exclude
Min Compactness	0.1	Membrane (cell) objects with compactness less than this are exclude
Min Elongation	0.1	Membrane (cell) objects with aspect ratios less than this are exclude
Background Threshold	240	Membrane intensity threshold for background (0<value<255)
Weak (1+)Threshold	200	Membrane intensity threshold of weak (+1)
Moderate(2+)Threshold	170	Membrane intensity threshold of weak (+2)
Strong (3+) Threshold	105	Membrane intensity threshold of weak (+3)
Completeness Threshold	50	Threshold for classifying membrane as completely stained (0<value<100)



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวศิวะพร ธารสาร
วัน เดือน ปี เกิด	14 มิถุนายน 2529
สถานที่เกิด	จังหวัดตาก
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) วิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
ที่อยู่ปัจจุบัน	300/71 หมู่ 3 ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY