การศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของตัวรับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิวในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กในชิ้นเนื้อเปรียบเทียบกับในพลาสมา

นาย ศรายุทธ รอดไหม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANALYSIS OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR MUTATION IN TISSUE AND PLASMA DNA IN NON-SMALL-CELL LUNG CANCER PATIENTS

Mr. Sarayuth Rodmai

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของตัวรับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิว ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กในชิ้นเนื้อเปรียบเทียบกับในพลาสมา
โดย	นาย ศรายุทธ รอดไหม
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ นรินทร์ วรวุฒิ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิชัย จิตะพันธ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ นรินทร์ วรวุฒิ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ฉันชาย สิทธิพันธุ์)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศรายุทธ รอดไหม : การศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของตัวรับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิว ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กในชิ้นเนื้อเปรียบเทียบกับในพลาสมา (ANALYSIS OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR MUTATION IN TISSUE AND PLASMA DNA IN NON-SMALL-CELL LUNG CANCER PATIENTS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. นพ. ดร. วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.นพ. นรินทร์ วรวุฒิ. 55 หน้า.

ที่มา เนื่องจากปัจจุบันมะเร็งปอดเป็นมีแนวโน้มพบเพิ่มมากขึ้น โดยปัจจุบันเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 2 ของประเทศไทย การรักษามะเร็งปอดระยะแพร่กระจายด้วยยาเคมีบำบัดมีอัตราการตอบสนองเพียง 30% ในปัจจุบันพบว่ามะเร็งปอดสามารถใช้วิธีการรักษาระดับโมเลกุลโดยใช้ยาต้านไทโรซีนไคเนส (Tyrosine Kinase Inhibitor,TKI) และได้ผลดี โดยสามารถยืดอายุชีวิตผู้ป่วยได้อย่างมีนัยสำคัญ ปัจจัยประการหนึ่งที่อาจกำหนดผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา TKI คือ การที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR ในเซลล์มะเร็งปอด การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบการตรวจหาการกลายพันธุ์ของ EGFR ใน DNA จากพลาสมาของผู้ป่วยกับ DNA ที่ได้จากการเนื้อเยื่อมะเร็งปอด

วิธีการศึกษา ผู้ป่วยมะเร็งปอดจำนวน 35 ราย ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาตามมาตรฐานการวินิจฉัย และนำชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยามาตรวจ EGFR mutation โดยวิธีการ Nested Polymerase Chain Reaction เปรียบเทียบกับในพลาสมาของผู้ป่วยคนเดียวกัน

ผลการศึกษา : จากการศึกษานี้พบว่ามี EGFR mutation ชนิด exon 19 deletion ทั้งหมด 13 ราย (เพศชาย 6 ราย, เพศหญิง 7 ราย) คิดเป็น 37.14% โดยในกลุ่มนี้ผู้ป่วยไม่สูบบุหรี่ 6 ราย (46.15%), สูบบุหรี่ 6 ราย (46.15%), ไม่ทราบประวัติการสูบบุหรี่ 1 ราย (7.69%) และตรวจพบ EGFR mutation ในพลาสมาเพียง 1 ราย (7.69%). ความไวในการตรวจของการทดสอบนี้ 7.69%, ความจำเพาะในการตรวจของการทดสอบนี้ 100%

สรุปผลการศึกษา ด้วยเทคนิคการตรวจหา EGFR mutation ในพลาสมาในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจพบ EGFR mutation ได้จริง แต่ยังคงมีข้อจำกัดเรื่องของความไวในการตรวจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต ศรายุทธ รอดไหม
สาขาวิชา อายุรศาสตร์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2549	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4874790130 : MAJOR MEDICINE (ONCOLOGY)
KEYWORD : NON-SMALL-CELL LUNG CANCER, EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR MUTATION

SARAYUTH RODMAI:ANALYSIS OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR MUTATION IN NON-SMALL-CELL LUNG CANCER PATIENTS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. VIROTE SRIURANPONG, M.D., Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. NARIN VORAVUD, M.D. 55 pp.

Background. The incidence of Non-small cell lung cancer has been increasing worldwide. In Thailand, lung cancer is the second most common cancer and only 30% responses to standard chemotherarpy. The diagnosis of non-small-cell lung cancer is complicated. It needs muti-disciplinary of specialties, and is time consuming and costly. Moreover, patients might be at risk for the standard procedure. Currently, it has been known that epidermal growth factor receptor mutation is a predictor of response to targeted therapy. This targeted therapy can statistically improve patient's quality of life, time to progression, and overall survival. In Japan, it was found that EGFR mutation can be detectable both in tissue and in plasma. Therefore, plasma EGFR mutation analysis would be a potential diagnostic test and capable of predicting patient's with non-small-cell lung cancer in responding to targeted therapy.

The aim of this study is to develop novel diagnostic test for non-small cell lung cancer.

Methods. 35 non-small cell lung cancer patients were enrolled. All must have documented tissue pathology diagnosis of non-small cell lung cancer. Plasma was collected from patients before systemic chemotherapy treatment. Tissue and plasma were both extracted for DNA by standard technique and were tested for EGFR mutation by Nested Polymerase Chain Reaction Technique.

Results. 13 patients had tissue EGFR mutation (Male 6, Female 7); that is 37.14% of all patients.13 patients with positive tissue EGFR mutation, categorized into 3 groups: non-smoking 6 (46.15 %), smoking 6 (46.15 %), unknown smoking history 1 (7.69%). Only 1 of 13 patients had positive plasma EGFR mutation (7.69%). Sensitivity of plasma EGFR mutation for detecting tissue EGFR mutation is 7.69%, and specificity of 100%.

Conclusions. Plasma EGFR mutation analysis shows can detect EGFR mutation that exists in tumor tissue of patients with non-small-cell lung cancer, but is limited by the sensitivity of techniques of the test.

Department	Medicine	Student's signature	Sarayuth Rodmai
Field of study	Medicine	Advisor's signature	
Academic year	2006	Co-advisor's signature	

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ผศ. นพ. ดร. วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาช่วยแก้ปัญหา ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำการวิจัยตาตลอด และขอขอบพระคุณ รศ. นพ. นรินทร์ วรวุฒิ, อ. นพ. หฤษฎ์ สุวรรณรัศมี ที่ให้ความกรุณาในการดูและงานวิจัยและการตรวจทานงานวิจัยชิ้นนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ. นพ. ชวิษฐ์ จันทรานุวัฒน์ ภาควิชาพยาธิวิทยากายวิภาค คณะแพทยศาสตร์ ที่ได้ให้ความกรุณาในการตรวจทานผลชิ้นเนื้อ และกรุณาอำนวยความสะดวกในการตัดชิ้นเนื้อเพิ่มเติม

ขอขอบคุณ คุณ ประกาศิต รัตนตันหยง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยมะเร็งวิทยา ที่ได้กรุณาดูแลตัวอย่างชิ้นเนื้อและตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ในการวิจัยนี้รวมถึง การตรวจทางห้องปฏิบัติการต่าง ๆ

ขอบคุณ คุณ ขนิษฐา คีตาชีวะ เจ้าหน้าที่หน่วยพยาธิวิทยากายวิภาค และเจ้าหน้าที่แผนกพยาธิวิทยากายวิภาคทุกคน ในการค้นหาชิ้นเนื้อและตัดชิ้นเนื้อเพิ่มเติมเพื่อทำการวิจัยในครั้งนี้ ขอบคุณคุณวสันต์ ปัญญาแสง ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการใช้สถิติในการคำนวณขนาดตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูลแก่ผู้วิจัยในเรื่องนี้เป็นอย่างดี

และสุดท้าย ขอขอบคุณ แพทย์ประจำบ้านภาควิชาอายุรศาสตร์ชั้นปีที่ 1, 2 และ 3 ในการที่ได้ช่วยกรุณาดูและผู้ป่วยเป็นอย่างดี และส่งผู้ป่วยเข้ามาปรึกษาและเข้ามาร่วมทำการศึกษา ในโครงการวิจัยนี้ และท้ายที่สุด ขอขอบพระคุณผู้ป่วยทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการศึกษานี้เป็นอย่างดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญแผนภาพ..... ญ
บทที่
1 บทนำ..... 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย..... 1
คำถามของการวิจัย..... 2
วัตถุประสงค์การวิจัย..... 2
สมมติฐาน..... 2
กรอบแนวคิดในการวิจัย..... 3
คำสำคัญ..... 4
การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย..... 4
ปัญหาทางจริยธรรม..... 5
ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 5
อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข..... 5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 7
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 7
3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 17
รูปแบบการวิจัย..... 17
ประชากรศึกษาและตัวอย่าง..... 17
กฎเกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา..... 17
กฎเกณฑ์การคัดออกจากการศึกษา..... 17

บทที่ หน้า

การคำนวณขนาดตัวอย่าง..... 18
วิธีดำเนินการวิจัย..... 18
ขั้นตอนการตรวจ DNA จากพลาสมา..... 18
ขั้นตอนการตรวจ DNA จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา..... 20
การรวบรวมข้อมูล..... 22
การวิเคราะห์ข้อมูล..... 22
4 รายงานผลการวิจัย..... 23
คุณลักษณะของประชากรในการศึกษา..... 23
ข้อมูลและการแสดงผลการวิจัย..... 32
5 การอภิปรายผลการวิจัย..... 38
6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 43
สรุปผลการวิจัย..... 44
ข้อเสนอแนะ..... 44
รายการอ้างอิง..... 45
ภาคผนวก..... 50
ภาคผนวก ก. แบบบันทึกข้อมูล..... 51
ภาคผนวก ข. ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย..... 53
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 55

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก..... 7
2. แสดงการแบ่งระยะของโรคมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก..... 8
3. แสดงอัตรการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก ที่ระยะเวลา 5 ปี..... 9
4. แสดงคุณลักษณะทั่วไปของผู้ป่วย 35 ราย..... 24
5. แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งหมด 35 ราย..... 26
6. แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งหมด 35 รายและชนิดของชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา..... 28
7. แสดงผลการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยากับพลาสมา EGFR mutation เปรียบเทียบกับลักษณะทางพยาวิทยาของมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก..... 30
8. แสดงคุณลักษณะผู้ป่วยที่มีการตรวจพบ EGFR mutation..... 33
9. แสดงการคำนวณทางสถิติของผลการตรวจ EGFR mutation จากในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาเปรียบเทียบกับพลาสมา..... 36

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภาพ

ตารางที่ หน้า

1. แผนภาพแสดงโครงสร้างของ Epidermal Growth Factor Receptor (Wildtype)..... 13
2. แผนภาพแสดงโครงสร้างของ Epidermal Growth Factor Receptor (Mutant)..... 13
3. แผนภาพแสดงระยะเวลาก่อนที่มีการดำเนินโรคต่อการรักษาด้วย Tyrosine Kinase Inhibitor เปรียบเทียบระหว่าง EGFR mutation และ wild type..... 14
4. แผนภาพแสดงระยะเวลาการมีอายุเฉลี่ยต่อการรักษาด้วย Tyrosine Kinase Inhibitor เปรียบเทียบระหว่าง EGFR mutation และ wild type..... 14
5. แผนภาพแสดงการหาลำดับของ EGFR mutation..... 15
6. แผนภาพแสดงตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR 15
7. แผนภาพแสดง Primer ของ exon 19 ของ EGFR mutation..... 21
8. แผนภาพแสดง PCR product of exon 19 เปรียบเทียบกับระหว่างชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยากับในพลาสมา..... 35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

มะเร็งปอดถือเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ของประเทศไทยและเป็นปัญหาสาธารณะสุขที่สำคัญของประเทศ โดยในประเทศสหรัฐอเมริกา ปี 2004 มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดถึง 173,700 และประมาณการว่าผู้ป่วย 164,440 คนเสียชีวิตจากโรคมะเร็งปอด[1] การพยากรณ์โรคของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดมักไม่ดีและอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี โดยรวมเพียง14% [1] ซึ่งอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งปอดเพิ่มมากขึ้นทุกปี

การรักษาโรคมะเร็งปอดโดยส่วนใหญ่มักให้การรักษาแบบผสมผสาน (Multimodality Treatment.) อาทิเช่น การผ่าตัดร่วมกับการฉายแสงและการให้ยาเคมีบำบัด ซึ่งผลการรักษาได้ผลไม่ค่อยดีมากนัก โดยรวมการรักษาด้วยวิธีการดังกล่าวจะสามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของผู้ป่วยได้ 10-15%, ซึ่งบ่อยครั้งการดำเนินโรคจะเพิ่มขึ้นแม้ผู้ป่วยได้รับการรักษาโดยการใช้ยาเคมีบำบัด นอกจากนี้การให้ยาเคมีบำบัดมีปัญหาเรื่องผลข้างเคียงมากทั้งจากตัวยา และโรคร่วมที่ผู้ป่วยมี จึงทำให้ไม่สามารถใช้ในผู้ป่วยทุกรายได้ร่วมกับผลการรักษาไม่ได้ผลดีมากดังกล่าว

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการรักษาให้จำเพาะกับชนิดโรค (Cell type) มากขึ้น โดยเป็นการรักษาระดับโมเลกุลโดยใช้ยาต้านไทโรซีนไคเนส (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) ในปัจจุบันมาตรฐานในการรักษาโดยวิธีการดังกล่าวใช้หลังจากที่ผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษาโดยการให้ยาเคมีบำบัด อย่างไรก็ตามมีการศึกษาผลของยาต่อการดำเนินโรค และอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยโดยใช้การรักษาดังกล่าวเป็นการรักษาชนิดแรก(First-Line Therapy) และในข้อบ่งชี้อื่น ๆ ที่แตกต่างไปจากมาตรฐานข้างต้น จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีผลทำนายการตอบสนองต่อยา TKI ในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดได้แก่ พยาธิสภาพชนิด adenocarcinoma ในผู้ป่วยที่ไม่เคยสูบบุหรี่ และการตรวจพบการกลายพันธุ์ของ EGFR เนื้อเยื่อมะเร็ง ซึ่งการตรวจ EGFR mutation ต้องอาศัยการตรวจชิ้นเนื้อเป็นหลักและโดยทั่วไปใช้เวลาในการตรวจเป็นเวลานานและหลายครั้งการใช้ tissue diagnosis จำเป็นต้องอาศัยแพทย์หลายสาขาร่วมมือกันในการนำชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมาตรวจและบ่อยครั้งไม่สามารถหาชิ้นเนื้อที่มีปริมาณและคุณภาพที่เหมาะสมสำหรับการตรวจเพิ่มเติมทั้งหมด

ดังนี้จึงได้มีความพยายามในการพัฒนาวิธีการตรวจอื่น ๆ ที่สามารถทดแทนการตรวจที่มีอยู่เดิมเพื่อย่นระยะเวลาในการตรวจในขณะเดียวกันยังคงรักษาความถูกต้องในการตรวจ จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบความแม่นยำในการตรวจ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อเปรียบเทียบกับในพลาสมา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูแลผู้ป่วยและช่วยปรับปรุงคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปอดและเพิ่มผลการรักษาให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นต่อไปในอนาคต

คำถามของการวิจัย (Research Questions)

คำถามหลัก (Primary Research Questions)

การตรวจวิเคราะห์ Epidermal Growth Factor Receptor Mutation ใน plasma สามารถทดแทนการตรวจ Epidermal Growth Factor Receptor Mutation ใน tissue ได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เปรียบเทียบความแม่นยำในการตรวจ Plasma Epidermal Growth Facotor Receptor Mutation กับ Tissue Epidermal Growth Factor Receptor Mutation.
2. เปรียบเทียบความสามารถในการใช้ Plasma Epidermal Growth Factor Receptor Mutation ทดแทนการตรวจ Tissue Epidermal Growth Factor Receptor Mutation

สมมติฐาน (Hypothesis)

Ho : ความแม่นยำในการตรวจ Epidermal Growth Factor Receptor Mutation ในผู้ป่วย Non-Small Cell Lung Cancer ระหว่างการตรวจใน Plasma และใน Tissue แตกต่างกัน

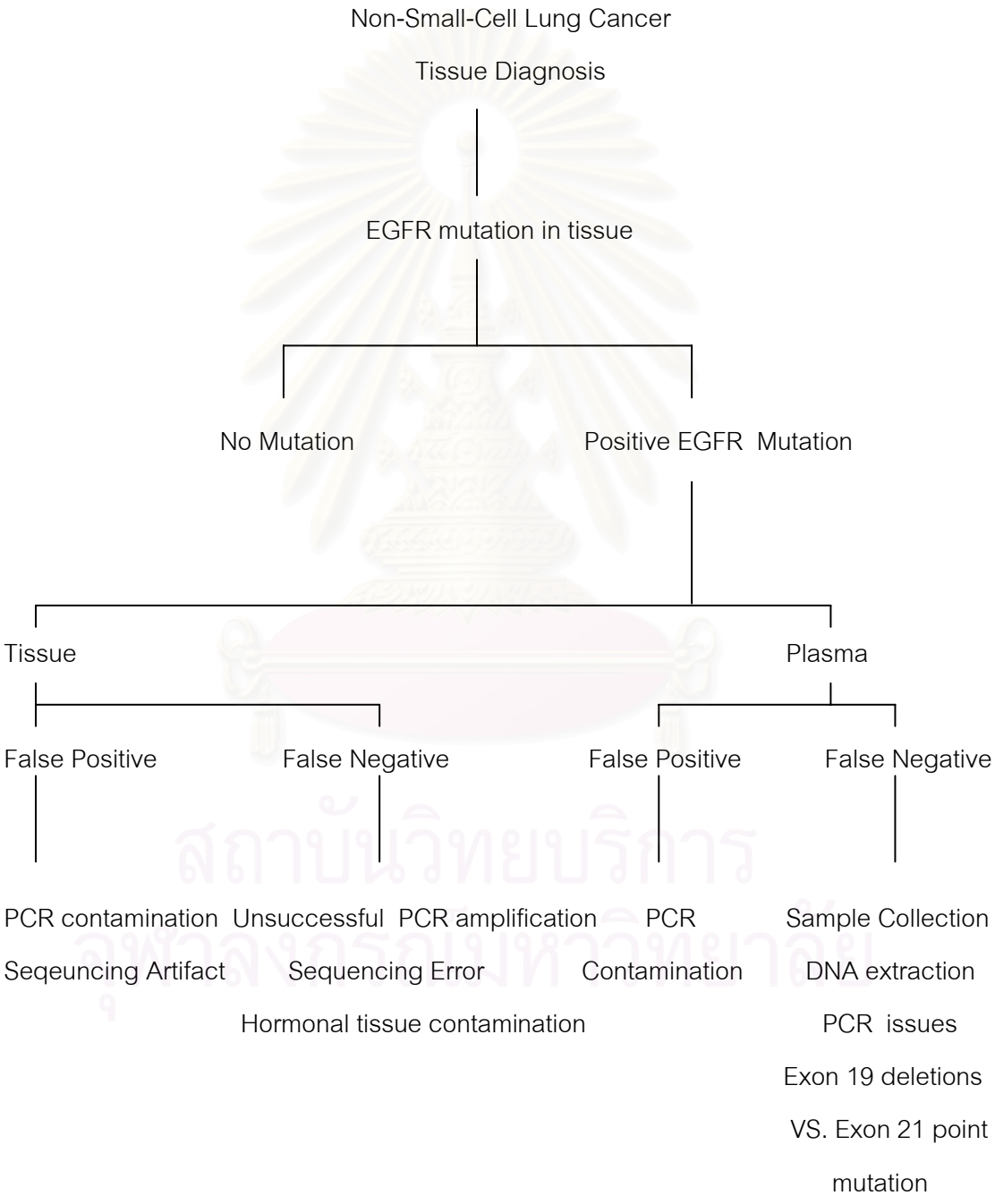
Ha : ความแม่นยำในการตรวจ Epidermal Growth Factor Receptor Mutation ในผู้ป่วย Non-Small Cell Lung Cancer ระหว่างการตรวจใน Plasma และใน Tissue ไม่แตกต่างกัน

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework) :

การวิจัยนี้มีแนวคิดเพื่อศึกษาหาวิธีใหม่ในการตรวจ Epidermal Growth Factor Mutation ในผู้ป่วยมะเร็งชนิด Non-Small-Cell Lung Cancer เพื่อลดระยะเวลาและขั้นตอนของการตรวจทาง

ห้องปฏิบัติการ และศึกษาถึงความแตกต่างในการตอบสนองต่อยา Epidermal Growth Factor Mutation ในผู้ป่วย Non-Small-Cell Lung Cancer.

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework) :



ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption) ไม่มี

คำสำคัญ (Keywords)

Non-Small Cell Lung Cancer,

Epidermal Growth Factor Mutation (EGFR mutation)

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะนำไปใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

การศึกษาเปรียบเทียบความแม่นยำของการตรวจ Tissue EGFR mutation เปรียบเทียบกับใน Plasma โดยระยะของโรค แบ่งตาม TNM staging.

การประเมินการตอบสนองต่อการรักษา (Assessment of Response) ตาม RECIST

Criteria.(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) 2000.

Complete Response หมายถึง การตรวจไม่พบหลักฐานทางคลินิกของโรค Non-Small-Cell Lung Cancer.

Partial Response หมายถึง การลดลงของผลรวมของเส้นผ่านศูนย์กลางที่ยาวที่สุดของ tumor ≥ 30%.

Progressive Disease หมายถึง มีการของผลรวมของเส้นผ่านศูนย์กลางที่ยาวที่สุดของ tumorเพิ่มขึ้น > 20%.

Stable Disease หมายถึง ไม่เข้า criteria ของทั้ง Partial Response และ Progressive disease.

Performance Status ของผู้ป่วยใช้หลักเกณฑ์ตาม Eastern Cooperative Oncology Group. (ECOG score)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical consideration)

ไม่มี ผู้ป่วยที่เข้ารับการศึกษาเป็นผู้ป่วยที่สงสัยและได้รับการวินิจฉัยยืนยันว่าเป็นโรคมะเร็งปอด นอกจากนี้การตรวจเลือดก็ได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย

เนื่องจากการศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยในมนุษย์ ผู้ทำการวิจัยได้ทำการขอรับการพิจารณาทำการศึกษาวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งจะได้มีการเสนอแก่คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนและได้รับการอนุมัติ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

การวิจัยนี้มีข้อจำกัดในเทคนิคการตรวจหา EGFR mutation ในทั้งชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาและในพลาสมา

เนื่องจากว่ายังไม่มีการศึกษาในลักษณะนี้มาก่อนและเทคนิคในการตรวจค่อนข้างยุ่งยาก จำเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมรวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญในการทำการปฏิบัติการ

ผลประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected Benefit And Application)

หลังจากการศึกษาวิจัยสิ้นสุดลง จะทำให้สามารถลดระยะเวลาและความยุ่งยากในการตรวจ Epidermal Growth Factor Mutation ในผู้ป่วย Non-Small Cell Lung Cancer ได้

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles)

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบความน่าเชื่อถือของการตรวจ Plasma EGFR เปรียบเทียบกับการตรวจ Tissue EGFR ซึ่งเป็นการตรวจวินิจฉัยแบบมาตรฐาน ความไวและความจำเพาะของการตรวจยังไม่มีการศึกษามาก่อน ดังนั้นการคำนวณหาประชากรที่จะใช้ศึกษาจึงเป็นการอนุมานจากผู้เชี่ยวชาญซึ่งอาจทำให้ประชากรศึกษานั้นน้อยหรือ

มากเกินไป นอกจากนี้เทคนิคที่ใช้ในการตรวจต้องอาศัยเครื่องมือ และผู้ปฏิบัติงานที่มีความเชี่ยวชาญในการทำและการแปลผล

การแก้ไข โดยวิธีทำการทดลองในห้องปฏิบัติการที่เชี่ยวชาญ มีอุปกรณ์ที่มีความพร้อม, ทันสมัยและมีเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of the Related Literature)

มะเร็งปอดถือเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นที่ 2 ของโลก และเป็นมะเร็งซึ่งเป็นสาเหตุการตายอันดับแรก[2] โดยทั่วไปมะเร็งปอดสามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือมะเร็งปอดที่เป็นเซลล์ขนาดเล็กและมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก (Small-Cell and Non-Small-Cell Lung Cancer) ซึ่งการแบ่งดังกล่าวแบ่งตามชนิดของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบ, ธรรมชาติของโรค, การดำเนินโรค และวิธีที่ใช้ในการรักษา

สำหรับมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก Non-Small-Cell Lung Cancer สามาถแบ่งย่อยได้เป็น 4 ชนิดตาม WHO Histologic Classification of Lung Cancer 1999. [3]

Table 1: WHO Histolgic Classification of Lung Cancer 1999. (Non-Small Cell type.)

Non-Small Cell Lung Cancer	Histologic subtype
Squamous Cell Carcinoma	Variants: Papillary, Clear cell, Small cell, Basaloid.
Adenocarcinoma	Acinar, Papillary, Bronchoalveolar carcinoma, Solid adenosquamous with mucin formation, Adenocarcinoma with mixed subtypes and its variants.
Large Cell Carcinoma	Variants: Large cell neuroendocrine carcinoma, Combined largecell neuroendocrine carcinoma, Basaloid carcinoma, Lymphoepithelioma-like carcinoma, Clear cell carcinoma, Large cell carcinoma with rhabdoid phenotype.
Adenosquamous carcinoma	Adenosquamous carcinoma.

สำหรับมะเร็งปอดที่มิใช่เซลล์มะเร็งขนาดเล็ก(Non-Small Cell Lung Cancer)นั้นสามารถแบ่งระยะของโรคได้เป็น 4 ระยะตาม TNM Classification. [4] (ดังตารางที่ 2)

Table2 : TNM Classification

Stage.	TNM subsets.
Stage 0	Tis: Carcinoma in Situ
Stage IA	T1N0M0
Stage IIA	T2N0M0
Stage IIB	T2N1M0 T3N0M0
Stage IIIA	T3N1M0 T1N2M0,T2N2M0,T3N2M0
Stage IIIB	T4N0M0,T4N1M0,T4N2M0 T4N3M0
StageIV	Any T AnyN M1

โดยทั่วไปการตอบสนองต่อการรักษาด้วยการให้ยาเคมีบำบัดเพียง 10-15% ซึ่งผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Non-Small-Cell Lung Cancer มักมีชีวิตจากตัวโรคเอง ซึ่งอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีของผู้ป่วยขึ้นกับระยะที่ผู้ป่วยเป็นดังแสดงในตารางที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table3 : Expected 5-Year Survival (With Treatment)[5]

Stage.	TNM subsets.	Average 5-Year Survival.
Stage 0	Tis: Carcinoma in Situ	82%
Stage IA	T1N0M0	68%
Stage IIA	T2N0M0	52%
Stage IIB	T2N1M0 T3N0M0	40%
Stage IIIA	T3N1M0 T1N2M0,T2N2M0,T3N2M0	9-15%
Stage IIIB	T4N0M0,T4N1M0,T4N2M0 T4N3M0	≤ 5%
StageIV	Any T AnyN M1	Not Applicable

ปัจจุบันการรักษามะเร็งปอด มีความก้าวหน้าและมุ่งเน้นไปที่การรักษาระดับโมเลกุลและจากข้อมูลในปัจจุบันพบว่า Epidermal Growth Factor Receptor (homologue of viral oncogene (V-erb) [6,7,8]) expression (EGFR expression) สูงถึง 90% ในมะเร็งปอด

จากรายงานในต่างประเทศ อาทิประเทศญี่ปุ่นพบว่าการตรวจ EGFR mutation ในโรคมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก สามารถตรวจพบได้สูงถึง 56% ในประเทศไต้หวันพบสูงถึง 56.5%[9] สำหรับอุบัติการณ์ในประเทศไทยพบได้สูงถึง 57%[40] ในมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก โดยเฉพาะชนิดที่เป็น Adenocarcinoma

โดย EGFR มีความยาว 118 kb อยู่บน chromosome 7p EGFR มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 170 kd [10] ตำแหน่งที่มีการตรวจพบการกลายพันธุ์อยู่ที่บริเวณ exon 18 ถึง exon 22 โดยตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์มากที่สุดอยู่ที่ exon 19 และ 21[11,12,13] ตามลำดับ โดยชนิดของการกลายพันธุ์มีการประมาณไว้มากถึง 30 รูปแบบใน exon 18-22 [12-16] โดย EGFR mutation หลัก ๆ ที่พบได้คือ

-15 base pair in-frame deletion in exon 19 (E746_A750 deletion)

-Amino acid substitution (point mutation) in exon 21 (L858R)

โดย mutation ส่วนมากเป็น 15 base pair in-frame deletion [17] ซึ่ง mutation 2 แบบนี้สามารถพบได้สูงถึง 90% และอุบัติการณ์การพบ mutation แบบนี้ใกล้เคียงกันทั่วโลก รูปแบบ mutation อื่น ๆ อาทิ Missense mutation or insertion in exon 18-21 พบได้ประมาณ 15% [17]

ซึ่งอุบัติการณ์การตรวจ EGFR mutation ใน Non-Small-Cell Lung Cancer แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยมีรายงานการตรวจพบ EGFR mutation ใน Adenocarcinoma ตรวจพบได้ 38%, Squamous cell carcinoma ตรวจพบได้ 3%, Adenosquamous carcinoma 67%, Large cell carcinoma 0%. [11]

โดยจากการศึกษาในหลอดทดลอง (In vitro study) พบว่า EGFR mutation จะไปเพิ่ม tyrosine kinase activity โดยกระบวนการ autophosphorylation และ/หรือ ร่วมกับ transphosphorylation ซึ่งมีผลต่อกระบวนการการแบ่งตัว, การยับยั้งการตาย, การมีชีวิตอยู่ และการแพร่กระจายของเซลล์ [18] โดยสามารถตรวจ marker ของการเกิดกระบวนการ autophosphorylation ของ EGFR ได้จากการวัด phosphorylation of tyrosine 1068 residue [12,19] นอกจากนี้ยังพบว่าการที่มี mutation ที่ตำแหน่ง L858R ใน exon 19 หรือ deletion L747-753 ทำให้เกิด full length EGFR coding sequences

ซึ่งการตรวจพบ EGFR mutation สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย Targeted Therapy (ZD 1839) ซึ่งเป็น submicromolar inhibitor EGFR tyrosine kinase (Tyrosine Kinase Inhibitor ;TKI) โดยจะทำหน้าที่ในการยับยั้งกระบวนการ autophosphorylation of EGFR tyrosine kinase โดยมีการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า ระดับยา Tyrosine Kinase Inhibitor เพียง 0.16 μM ก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเซลล์มะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กได้อย่างสมบูรณ์ [8]

ในปัจจุบันมีแนวทางการรักษาใหม่ที่เป็นการรักษาจำเพาะที่ระดับเซลล์ (Targeted Therapy) โดยได้มีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการรักษาแบบจำเพาะที่ระดับเซลล์ได้ผลดีแม้ในผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมาก่อน ซึ่งการรักษาเฉพาะที่ระดับเซลล์ (Targeted Therapy) นั้นจะตอบสนองดีกับผู้ป่วยซึ่งมี Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutation (ดังแผนภาพที่ 1 และ 2) มีการศึกษาบ่งถึงประสิทธิภาพของ Targeted Therapy ที่

สามารถเพิ่มคุณภาพชีวิต [5,18] และยืดอายุผู้ป่วยได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [20] ตำแหน่งของการตรวจพบการกลายพันธุ์อยู่ที่บริเวณ exon 18-22 [11,12,13]

นอกจากนี้ในการศึกษาต่อ ๆ มา พบว่า EGFR mutation สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการให้การรักษาโดยการใช้ Targeted Therapy [12,16,22] มีการศึกษาในต่างประเทศ (สหรัฐอเมริกา, ญี่ปุ่น,เกาหลี) มีการตรวจพบ EGFR mutation ถึง 77% ของผู้ป่วยซึ่งตอบสนองและสามารถควบคุมโรคได้โดยการใช้ Targeted Therapy (TKI) ในทางตรงกันข้าม ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่สามารถควบคุมโรคได้ด้วยยา Targeted Therapy (TKI) ตรวจพบ EGFR mutation เพียง 8% [9,12,15,21,22,23] มีการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มี EGFR mutation กับกลุ่มซึ่งไม่มี EGFR mutation พบว่าการตอบสนองต่อการรักษาด้วย Targeted Therapy (Tyrosine Kinase Inhibitor; TKI) สูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มซึ่งไม่มี EGFR mutation โดยทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [21,24]

สำหรับการวินิจฉัย EGFR Mutation Analysis ดังกล่าวจำเป็นต้องใช้การตรวจโดยการทำ Polymerase Chain Reaction การหา EGFR Mutation Analysis ไม่สามารถตรวจได้โดยการย้อม immunohistochemical study เนื่องจากการตรวจดังกล่าวสามารถตรวจได้แต่ EGFR expression แต่ไม่สามารถตรวจหา EGFR mutation ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าการย้อม immunohistochemical study นั้น ไม่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองด้วยการรักษาโดยการให้ยา Targeted Therapy (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI)

โดยในปัจจุบันมียา Gefitinib (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI) ซึ่งได้มีการศึกษายืนยันและได้รับการพิสูจน์จากองค์การอาหารและยาในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 2003 โดยขณะนั้นพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา Gefitinib (Tyrosine Kinase Inhibitor,TKI) มีอายุเฉลี่ยสูงถึง 18 เดือน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าทำให้คุณภาพของชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้นในกลุ่มที่ได้รับ Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) [25] ซึ่งอุบัติการณ์ของการเกิด EGFR mutation พบมากในชาวเอเชีย โดยมีรายงานจากทั้งญี่ปุ่น [12,13,16,22,25] และไต้หวัน [9] ซึ่งอุบัติการณ์การตรวจพบ EGFR mutation 25%-50% [26] และ 88-99% [9,27-30] ตามลำดับ ตรงกันข้ามกับในประเทศทางยุโรปและสหรัฐอเมริกา ซึ่งตรวจพบอุบัติการณ์ของ EGFR mutation เพียง 10% [12,13,22]

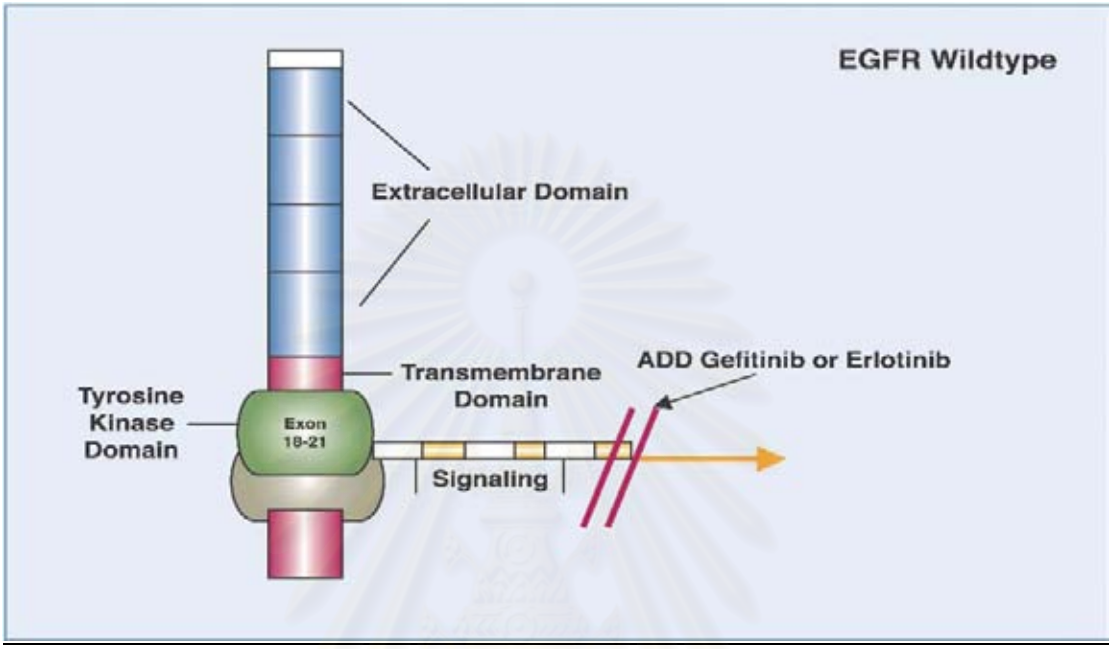
โดย EGFR mutation จะสัมพันธ์กับผู้ป่วยในกลุ่มที่เป็น เพศหญิง, ชาวเอเชีย, ไม่สูบบุหรี่ และเป็น Non-Small Cell Lung Cancer ชนิด adenocarcinoma [11,12,22,31,32] และจากข้อมูล Multivariate Analysis พบว่า Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutation เป็น independent prognostic factor ที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย Targeted Therapy (TKI) [24]

นอกจากนี้มี Multicenter phase II trials 2 การศึกษาที่แสดงให้เห็นประโยชน์ทางคลินิกจากยา Gefitinib ในผู้ป่วย Non-Small-Cell Lung Cancer ที่ไม่สามารถรักษาด้วยยาเคมีบำบัดได้ [31, 32] และจากการศึกษา (IDEAL study)พบว่าอัตราการตอบสนองของ Non-Small Cell Lung Cancer ต่อ Gefitinib สูงถึง 46% [33] โดยไม่พบมีความสัมพันธ์ระหว่าง EGFR expression กับการตอบสนองต่อการรักษาหรือการควบคุมโรค ด้วย Targeted Therapy (TKI) แต่อย่างใด แต่พบว่าการตอบสนองต่อการรักษา, การมีชีวิตปลอดโรคกำเริบ (Progression-free survival) และอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย สัมพันธ์กับ EGFR mutation.[17] (ดังแสดงในแผนภาพที่ 3 และ 4)

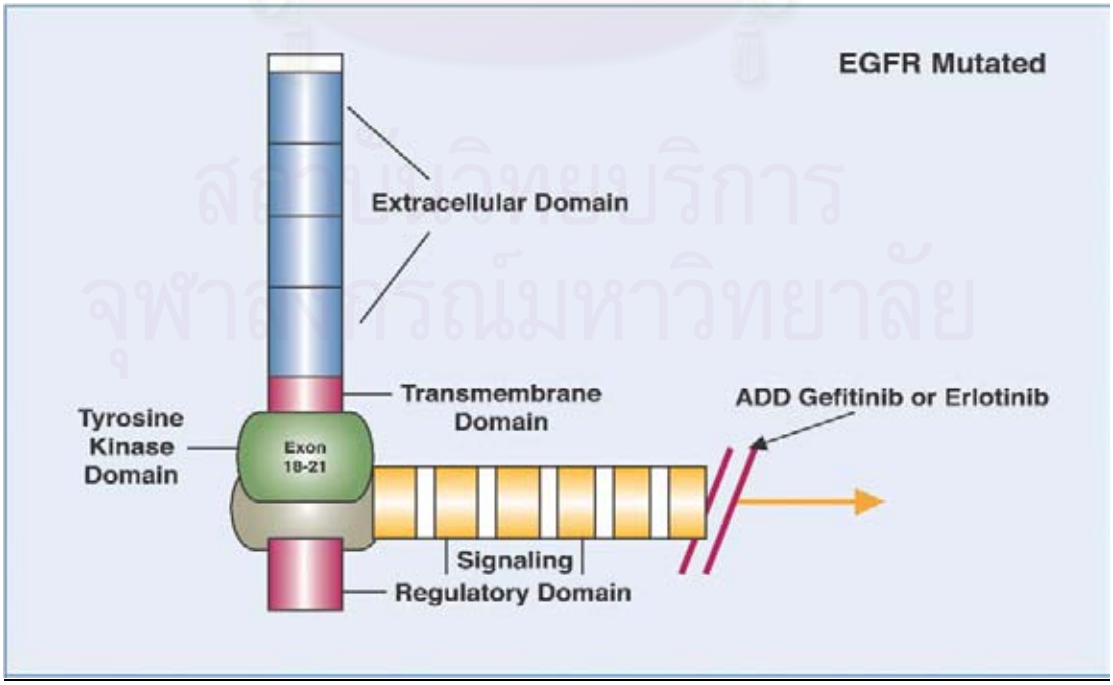
มีการศึกษาในระยะที่ 2 (Phase II study) พบว่าการตอบสนองของ EGFR mutation ต่อยา Tyrosine Kinase Inhibitor มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ โดยอัตราการตอบสนองต่อยา TKI ในประเทศในแถบยุโรปประมาณ 10% [34,35,36] และสูงขึ้นในประเทศแถบเอเชีย โดยมีรายงานการตอบสนองถึง 30% ในประเทศญี่ปุ่น [15]

จากการศึกษาในประเทศไต้หวัน พบว่าในกรณีที่ผู้ป่วยไม่เคยได้รับยาเคมีบำบัดมาก่อนมีการตอบสนองต่อยา Targeted Therapy (TKI) สูงถึง 56% [37] และยังมีการศึกษาพบว่า EGFR Copy Number มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจากการรักษาด้วยการใช้ยา Targeted Therapy (TKI) [38] เนื่องจากการตรวจหา EGFR ในปัจจุบัน จำเป็นต้องใช้ชิ้นเนื้อในการตรวจ ซึ่งใช้เวลาในการตรวจนานและต้องได้ ชิ้นเนื้อที่มีปริมาณและคุณภาพที่ดีพอในการตรวจ โดยการตรวจ Mutation Analysis by DNA sequencing (ดังแสดงใน แผนภาพที่ 5 และ 6)

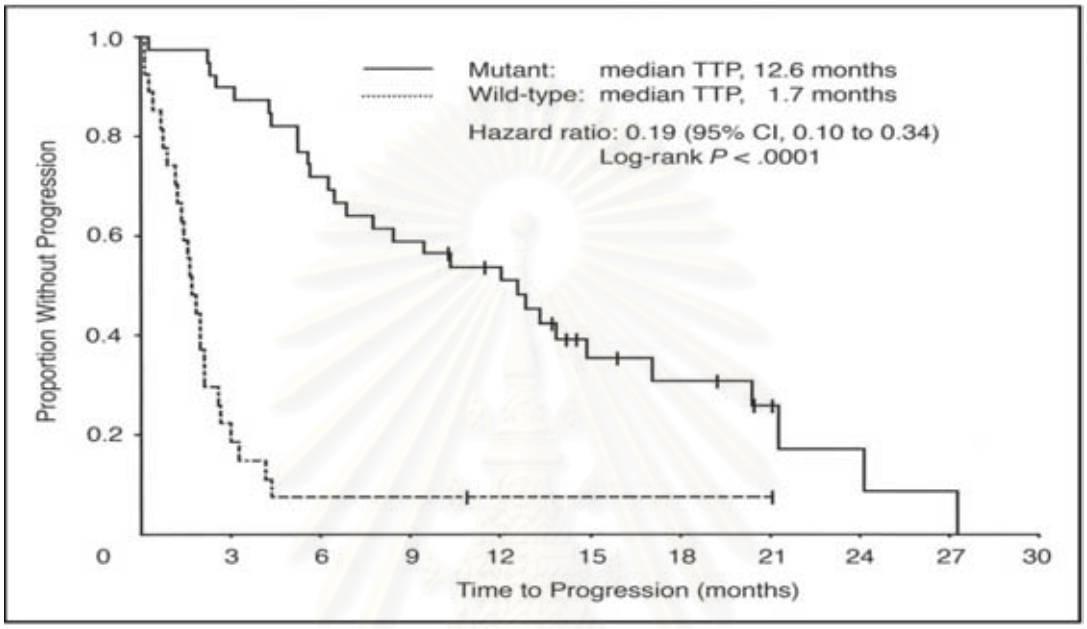
<u>แผนภาพที่1</u> แสดงโครงสร้างของ Epidermal Growth Factor Receptor (Wild type), Cancer Res 65 2005:7525-29.



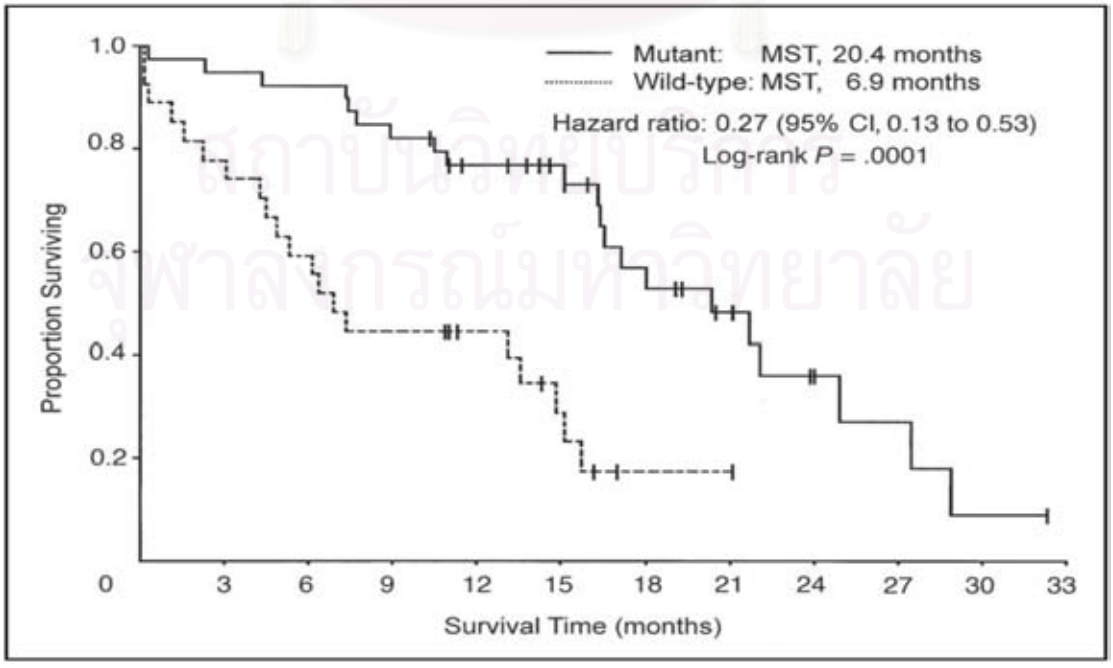
<u>แผนภาพที่2</u> แสดงโครงสร้างของ Epidermal Growth Factor Receptor (Mutated), Cancer Res 65 2005:7525-29.



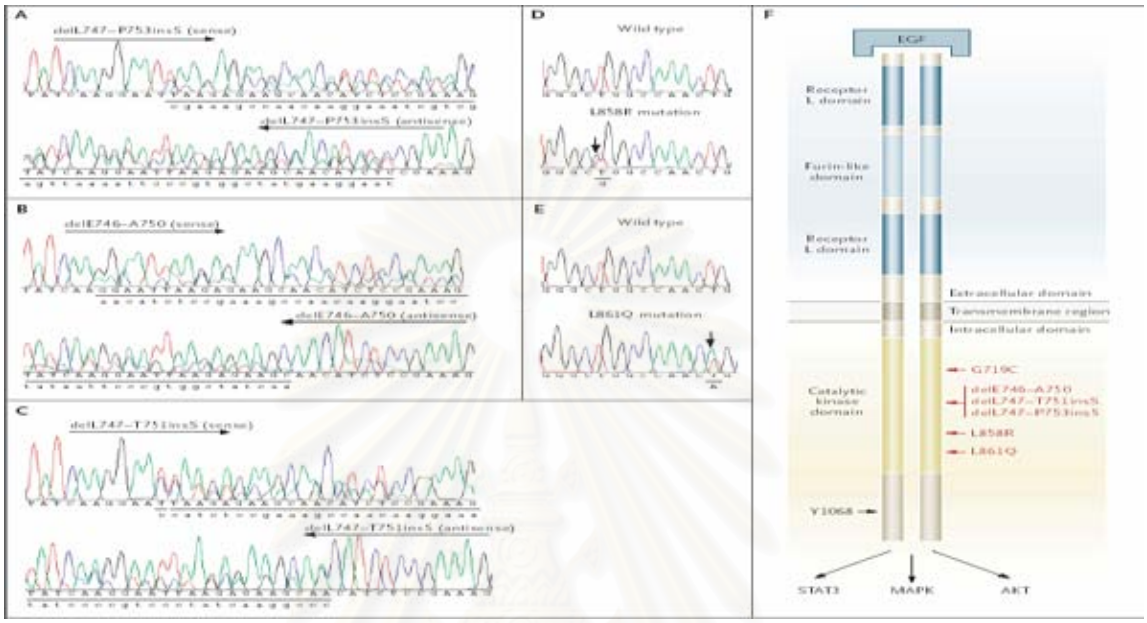
<u>แผนภาพที่ 3</u> แสดงระยะเวลาก่อนที่จะมีการดำเนินโรค (Time to progression) ต่อการรักษาด้วยยา Targeted Therapy (TKI) ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีและไม่มี EGFR mutation. (J Clin Oncol 2005;23:6829-37)



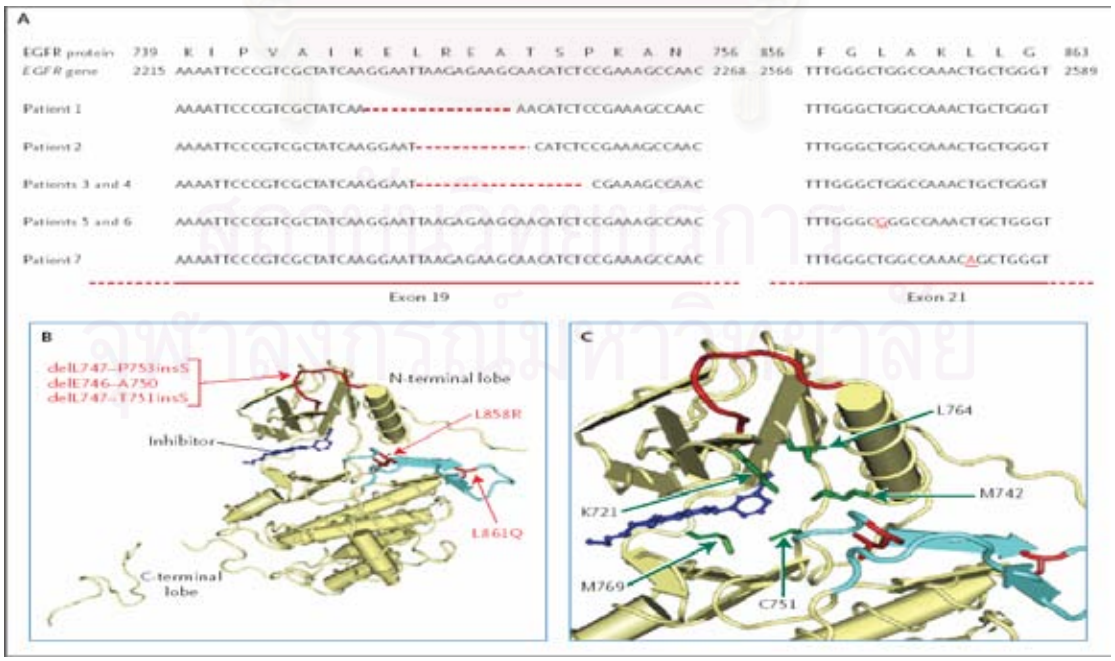
<u>แผนภาพที่ 4</u> แสดงระยะเวลาการมีอายุเฉลี่ย (Median Survival) ต่อการรักษาด้วยยา Targeted Therapy (TKI) ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีและไม่มี EGFR mutation. (J Clin Oncol 2005;23:6829-37)



แผนภาพที่ 5: แสดง EGFR mutation in Gefitinib responsive tumor.(N Engl J Med 2004;350:2129-39.) [12]



แผนภาพที่ 6: แสดง Clustering of Mutations in the *EGFR*Gene at Critical Sites within the ATP-Binding Pocket. (N Engl J Med 2004;350:2129-39.) [12]



และในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2546 องค์การอาหารและยาในประเทศสหรัฐอเมริกาได้ยอมรับให้การรักษาด้วย Tyrosine Kinase Inhibitor [12] เป็นการรักษามาตรฐานในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กที่ไม่ตอบสนองต่อการให้ยาเคมีบำบัดที่เป็นยามาตรฐาน

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาอุบัติการณ์ของ EGFR mutation โดย วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์ [40] และคณะ ที่คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยพบอุบัติการณ์การมี EGFR mutation จากการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาชนิด Adenocarcinoma ของผู้ป่วยมะเร็งปอดไทยสูงถึง 57.4% ประกอบด้วย exon 19 deletion 48.3%, exon 21 point mutation 9.3%, และพบ double mutation ของทั้ง 2 exon 1.9 % และจากประสบการณ์ (Observation) การดูแลผู้ป่วยพบว่าผู้ป่วยเหล่านี้ตอบสนองดีต่อการให้การรักษาด้วย Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI)

เนื่องจากการตรวจและวินิจฉัย EGFR mutation ของโรคมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กจำเป็นต้องได้ชิ้นเนื้อในการวินิจฉัยและตรวจหา EGFR mutation การศึกษานี้จึงเป็นความพยายามในการที่จะหาวิธีการใหม่ในการตรวจหา EGFR mutation ในโรคมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กเพื่อให้การวินิจฉัย EGFR mutation มีความสะดวก, รวดเร็ว, ประหยัดค่าใช้จ่าย, ไม่เป็นอันตรายแก่ผู้ป่วย โดยยังคงมีความแม่นยำในการตรวจเทียบได้กับการตรวจโดยใช้ชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาอันเป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยในปัจจุบัน

ดังนั้นการหาวิธีการตรวจ EGFR mutation แบบใหม่ที่ง่ายและได้ผลเร็วขึ้นจะสามารถปรับปรุงคุณภาพการรักษารวมถึงคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและการเลือกผู้ป่วยที่เหมาะสมในการรักษาและอาจนำไปสู่การเพิ่มของอัตราการอยู่รอดของผู้ป่วยได้ในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research Method)

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา , Diagnostic Test

ประชากรศึกษาและตัวอย่าง (Popultaion and Sample)

ประชากรเป้าหมาย (Targeted population)

ผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งปอดที่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาและ/หรือการย้อมพิเศษเพิ่มเติมเพื่อยืนยันการวินิจฉัย (Immunohistochemical Staining and/or special stain)

ประชากรตัวอย่าง

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดทั้งผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอก รพ.จุฬาลงกรณ์

Inclusion Criteria

1. เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรค Non-Small-Cell Lung Cancer
2. อายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไป
3. ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อตรวจดูลักษณะของเซลล์ การตรวจพิเศษ/การย้อมพิเศษต่าง ๆ ยืนยันการวินิจฉัย

Exclusion Criteria

ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการตรวจยืนยันโดยการตรวจดูลักษณะเซลล์ การตรวจพิเศษการย้อมพิเศษต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample Size determination)

การคำนวณขนาดตัวอย่างของข้อมูลเชิงพรรณนาเป็นการศึกษาเปรียบเทียบในกลุ่ม:
เนื่องจากการศึกษานี้เพื่อต้องการหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของ plasma และ tissue EGFR mutation analysis จึงอาจคำนวณโดยการกำหนดความไว (Sensitivity) ในการศึกษาแทนอัตราการเกิดเหตุการณ์ โดยกำหนดความไว (Sensitivity) ที่ 85%
จำนวนประชากรที่ใช้ในการศึกษาต่อกลุ่ม = $z^2\alpha/2\ (pq/d^2)$
P= ความไวในการศึกษา Q=1- p D=acceptance error =0.15
α = 0.1, $\alpha/2$ = 0.05, $z\alpha/2$ = 1.96
N= $(1.96)^2\ (0.85)(0.15)/(0.15)^2$ = 21.76คน

วิธีการ

1. ผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นมะเร็งปอดจะได้รับการตรวจวินิจฉัยยืนยันการเป็นมะเร็งปอดจากการตรวจทางพยาธิวิทยาโดยได้มีการย้อมพิเศษเพิ่มเติมเพื่อยืนยันการตรวจว่าเป็นมะเร็งปอด จะได้รับการเจาะเลือด 20 cc เพื่อนำไปทำการปั่นและการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการดังในรายละเอียดในกรอบแนวความคิดในการวิจัย โดยได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย
2. .ผู้ป่วยจะได้รับการซักประวัติเพื่อบันทึกข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย และปัจจัยเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปอดต่าง ๆ ร่วมกับการตรวจร่างกายและการตรวจทางห้องปฏิบัติการพื้นฐานตามขั้นตอนการรักษามาตรฐาน
3. การตรวจพบว่ามี tissue EGFR mutation positive สามารถดูได้จากผลการตรวจ Immunohistochemical staining จากการตรวจทางพยาธิวิทยากายวิภาคร่วมกับการตรวจ tissue EGFR mutation analysis.

ขั้นตอนการตรวจ tissue and plasma DNA

การเตรียม DNA จาก plasma

1. นำเลือดตัวอย่างที่ได้มาทำการปั่น (Centrifugation) ที่ 1600 g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
2. ใช้ pipette sterile ในการนำ plasma ที่ปั่นได้มาแยกเก็บในหลอดขนาด 1.5 ml.

3. ปั่น plasma ที่ได้ที่ 15700 g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (การปั่นที่ 15700 g เท่ากับการปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาทีโดยใช้ Eppendorf Centrifugation 5415D)
4. นำ plasma ที่ปั่นได้เก็บในหลอดทดลองก้นกลมขนาด 5 ml. และเก็บที่อุณหภูมิ -80°C

การสกัด DNA จาก plasma โดยใช้เลือดหรือสารน้ำจากร่างกาย (Body Fluid) โดยการใช้ QIAamp DNA Blood Mini Kit

1. นำเอา plasma 400 µL ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml.
2. ใส่ QIAGEN Protease ลงในหลอดทดลองแต่ละอัน และผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex ประมาณ 10 วินาที
3. ใส่ Buffer AL ปริมาณ 400 µL และผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex ประมาณ 1 นาที
4. Incubate ที่ 56°C เป็นเวลา 10 นาที (โดยใช้ Dri-Bath Incubation)
5. ใส่ absolute ethanol เย็นปริมาตร 400 µL และผสมเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่น (centrifuge) ในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 ml ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ DNA ตกตะกอน
6. นำส่วนประกอบดังกล่าวมาใส่ใน QIAmp spin column โดยใส่ในหลอดทดลองขนาด 2 ml. และปั่นที่ 15700 g เป็นเวลา 1นาทีที่อุณหภูมิห้อง
7. ใส่ 500 µL Buffer AW1และนำไปปั่นที่ 15,700 g เป็นเวลา 1 นาที
8. จากนั้นใส่ 500 µL Buffer AW2 และนำไปปั่นที่ 15,700 g เป็นเวลา 3 นาทีเพื่อทำความสะอาด DNA
9. จากนั้นนำไปปั่น (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที
10. เติม sterile water 50 µL จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไป ปั่น (centrifuge) ที่ 15,700 g (13,000 รอบ/ นาที)
11. Sample ที่ได้จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อทำการตรวจทำ PCR
12. ซึ่งการตรวจ Plasma DNA จะใช้ Plasma ปริมาณ 10 cc นำมาทำวิธีการดังกล่าว

การเตรียม DNA จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

1. นำชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่ได้รับการทำ Microdissection มาทำการแยกเซลล์ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml.
2. จากนั้นเติม lysis buffer II (950:50) 10% Sodium Dodecyl Sulphate 200-400 µL เพื่อเป็นการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane) จากนั้นใส่ Proteinase K 5-10 µL และนำไปใส่ไว้ในเครื่องที่ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C ทิ้งไว้ข้ามคืน
3. เติม phenol chloroform ปริมาตร 2 เท่าของชิ้นเนื้อ จากนั้นนำไปปั่นที่ 6,000 รอบต่อนาที ปั่นเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนที่ใสใสในหลอดทดลองอีกอันหนึ่ง
4. เติม 3 M Sodium Acetate ปริมาตร 1/10 ของปริมาตรทั้งหมด ร่วมกับ 100% Ethyl Alcohol 500 µL เพื่อเป็นการตกตะก่อน DNA จากนั้นใส่ glycogen 1 µL และนำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ -20 C ทิ้งไว้ข้ามคืน
5. นำส่วนผสมทั้งหมดไปปั่น (centrifuge) ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนบนทิ้ง
6. ใส่ 70% Ethyl alcohol 500 µL และนำไปปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใส่ทิ้ง
7. เติม Tris EDTA 50 µL จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 C เป็นเวลา 10 นาที จะได้ DNA ของชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาที่พร้อมทำการตรวจ Polymerase Chain Reaction ต่อไป

โดยการทำการตรวจหา EGFR mutation ของ Exon 19 ในการศึกษานี้ใช้วิธีการ Nested Polymerase Chain Reaction ซึ่งวัตถุประสงค์ของการใช้ Polymerase Chain Reaction เพื่อเป็นการเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจหา EGFR mutation

เนื่องจากในขณะที่เริ่มโครงการการศึกษานี้ยังไม่มีการตรวจ serum/plasma DNA for EGFR mutation analysis มาก่อน การศึกษานี้จึงได้ใช้ protocol การตรวจ plasma DNA จากการศึกษาการตรวจ serum EBV DNA โดย ศ.นพ.ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูรและคณะ ซึ่งสามารถตรวจพบ plasma DNA mutation of EBV ได้ [41] สำหรับการเตรียม DNA จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาก็ใช้วิธีการเดียวกับการเตรียม DNA จาก plasma แต่ต้องมีการสกัด tissue DNA จาก paraffin tissue โดยใช้วิธี phenol-chloroform extraction ที่เป็นมาตรฐาน

แผนภาพที่7: แสดง Primer of EGFR mutation ของ exon 19

Exon 19

AGATCCTCTTTGCATGAAATCTGATTTCAGTTAGGCCTAGACGCAGCATCATTAAATTCTG
GATGAAATGATCCACACGGACTTTATAACAGGCTTTACAAGCTTGAGATTCTTTTATCTAA
ATAATCAGTGTGATTCGTGGAGCCCAACAGCTGCAGGGCTGCGGGGGCGTCACAGCC
CCCAGCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTCCACAGCCCCAGTGTCCCTCACCTTCGGGG
TGCATCGCTGGTAACATCCACCCAGATCACTGGGCAGCATGTGGCACCATCTCACAATT
GCCAGTTAA

CGTCTTCCTTCTCTCTCTGTCATAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAAT
TCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC
CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTGTGGGGGTCCATGGCTCTGAACCTCAGGCCCAC
CTTTTCTCATGTC

TGGCAGCTGCTCTGCTCTAGACCCTGCTCATCTCCACATCCTAAATGTTCACTTTCTATG
TCTTT
CCCTTTCTAGCTCTAGTGGGTATAACTCCCTCCCCTTAGAGACAGCACTGGCCTCTCCC
ATGCTGGTATC

Exon 19 Forward primer GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC
Exon 19 Reverse primer CATAGAAAGT GAACATTTAGGATGTG
Expected size= 372 bp
Nestexon 19 Forward primer CCTTAGGTGCGGCTCCACAGC
Nestexon 19 Reverse primer CATTTAGGATGTGGAGATGAGC
Expected size= 349 bp

การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น Non-Small-Cell Lung Cancer ทุกรายจะได้รับการซักประวัติ, ตรวจร่างกาย, การตรวจทางห้องปฏิบัติการ CBC, Blood Chemistry, Staging (ด้วยการทำ Chest X-Ray, CT chest include upper abdomen and adrenal gland), และหรือการตรวจ Bone Scan, Tissue Pathology

ผู้ป่วยจะได้รับการตรวจเลือดเพื่อหา Plasma EGFR mutation ซึ่งจะใช้ Clotted Blood 10 cc. 2 หลอด และ EDTA blood 10 cc. 2 หลอดส่งตรวจที่ตึกว่องวานิชชั้น 4 แผนก Medical Oncology ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

ใช้ two by two table ในการคำนวณค่าความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) และความถูกต้อง (Accuracy) ระหว่าง tissue and plasma EGFR mutation analysis

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

รายงานผลการวิจัย

คุณลักษณะของประชากรในการศึกษา

การเก็บข้อมูลผู้ป่วยได้เริ่มตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน พศ.2548 ถึงเดือน ธันวาคม พศ.2549 ได้ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กในรพ.จุฬาลงกรณ์โดยไม่ขึ้นกับระยะที่เป็น จากการศึกษานี้มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดและได้เข้ารับการศึกษาทั้งหมด 35 ราย ซึ่งมากกว่าการคำนวณขนาดประชากร โดยสามารถแบ่งชนิดของมะเร็งตามลักษณะทางพยาธิวิทยาได้ดังนี้

Adenocarcinoma	24 ราย	Squamous cell	5 ราย
Poorly differentiated	1 ราย	อื่น ๆ	5 ราย

โดยสามารถเก็บข้อมูลผู้ป่วยได้ครบถ้วนทุกราย
ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการตรวจยืนยันการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กจากภาควิชาพยาธิวิทยากายวิภาค คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์ และได้รับการตรวจ EGFR mutation analysis ทั้งในชิ้นเนื้อและในพลาสมาทุกราย
โดยในการทำการศึกษาครั้งนี้ผู้ป่วยทุกรายได้ลงชื่อยินยอมให้ทำการศึกษาโดยสมัครใจ และไม่มีผู้ป่วยรายใดที่ได้รับผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4 คุณลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยในการศึกษา

	จำนวน (คน)	เปอร์เซ็นต์ (%)
จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด	35	
อายุ (ปี)		
อายุเฉลี่ย	60	
พิสัย	32-83	
เพศ		
ชาย	22	62.86%
หญิง	13	37.14%
Performance Status		
1	17	48.57%
2	10	28.57%
3	7	20%
Unknown	1	2.86%
Weight loss		
ไม่มีน้ำหนักลด	3	8.57%
$\leq$ 10% ของน้ำหนักตัว	15	42.86%
$>$ 10% ของน้ำหนักตัว	15	42.86%
ไม่ทราบข้อมูล	2	5.71%
Stage		
Ib	1	2.86%
IIIa	2	5.71%
IIIb	7	20%
IV	25	71.43%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4 (ต่อ) คุณลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยในการศึกษา

	จำนวน (คน)	เปอร์เซ็นต์ (%)
ลักษณะทางพยาธิวิทยากายวิภาค		
Adenocarcinoma	24	68.57%
Squamous-cell carcinoma	5	14.29%
Poorly differentiated	1	2.86%
Other	5	14.28%
การสูบบุหรี่		
No-Smoking	13	37.14%
Smoking	21	60%
Unknown	1	2.86%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งหมด 35 ราย

No	AGE	SEX	STAGE	ECOG	SMOKE	ORGAN INVOLVEMENT	WEIGHT LOSS
1	75	M	IIIb	1	100	0	0
2	44	M	IV	3	20	BRAIN	5
3	52	M	IV	1	30	BONE,LUNG	2
4	43	F	IV	1	0	BONE,?BRAIN	12
5	56	F	IV	2	0	PERICARDIUM	5
6	68	M	IV	3	40	BONE	12
7	77	M	IIIa	2	60	0	12
8	76	M	IIIa	2	0	0	10
9	72	M	IV	1	25	BONE,LIVER	3
10	38	F	IV	1	0	LUNG,PERICARDIUM	0
11	50	M	IV	1	4	BONE,SUBCUTANEOUS	10
12	47	M	IIIb	1	80	0	10
13	70	F	IV	1	0	LUNG	5
14	48	M	IV	2	105	BONE,BRAIN	10
15	32	M	IV	3	1	LUNG	10
16	63	M	IV	1	10	BRAIN,BONE	3
17	61	M	IV	1	15	BONE,LUNG	4
18	38	F	IV	1	0	LIVER	5
19	64	F	IV	3	10	BRAIN	10
20	68	F	IV	2	0	LUNG,LIVER	6
21	78	F	IV	2	0	LUNG	10
22	56	F	IV	N/A	N/A	BRAIN,BONE	N/A
23	76	M	IIIb	1	35	0	1
24	83	M	IV	2	100	BRAIN	1

ตารางที่ 5 (ต่อ) ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งหมด 35 ราย

No	AGE	SEX	STAGE	ECOG	SMOKE	ORGAN INVOLVEMENT	WEIGHT LOSS
25	49	M	IV	1	40	LUNG,LIVER	N/A
26	75	M	IIIb	2	80	0	6
27	76	F	IIIb	3	0	0	5
28	63	F	IV	3	0	BRAIN	2
29	43	M	IV	1	10	BRAIN	0
30	57	M	IV	2	20	LUNG	4
31	67	M	IIIb	1	10	0	9
32	62	F	IV	2	0	ADRENAL	5
33	74	M	Ib	1	80	0	8
34	37	F	IIIb	3	0	0	1
35	65	M	IV	1	0	LUNG	12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งหมด 35 รายและชนิดของชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

No	AGE	SEX	STAGE	ECOG	SMOKE	CELL TYPE
1	75	M	IIIb	1	100	Squamous cell
2	44	M	IV	3	20	Adenocarcinoma
3	52	M	IV	1	30	Adenocarcinoma
4	43	F	IV	1	0	Non-Small-Cell carcinoma
5	56	F	IV	2	0	Adenocarcinoma
6	68	M	IV	3	40	Adenocarcinoma
7	77	M	IIIa	2	60	Squamous cell
8	76	M	IIIa	2	0	Adenocarcinoma
9	72	M	IV	1	25	Squamous cell
10	38	F	IV	1	0	Adenocarcinoma
11	50	M	IV	1	4	Adenocarcinoma
12	47	M	IIIb	1	80	Squamous cell,favor
13	70	F	IV	1	0	Adenocarcinoma
14	48	M	IV	2	105	Adenocarcinoma
15	32	M	IV	3	1	Adenocarcinoma
16	63	M	IV	1	10	Adenocarcinoma
17	61	M	IV	1	15	Non-Small-Cell carcinoma
18	38	F	IV	1	0	Adenocarcinoma
19	64	F	IV	3	10	Adenocarcinoma
20	68	F	IV	2	0	Non-Small-Cell carcinoma
21	78	F	IV	2	0	Adenocarcinoma, BAC
22	56	F	IV	N/A	N/A	Adenocarcinoma
23	76	M	IIIb	1	35	Poorly differentiated
24	83	M	IV	2	100	Adenocarcinoma
25	49	M	IV	1	40	Adenocarcinoma
26	75	M	IIIb	2	80	Adenocarcinoma

ตารางที่ 6 (ต่อ) ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้งหมด 35 รายและชนิดของชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

No	AGE	SEX	STAGE	ECOG	SMOKE	CELL TYPE
27	76	F	IIIb	3	0	Non-Small Cell carcinoma
28	63	F	IV	3	0	Non-Small Cell carcinoma
29	43	M	IV	1	10	Adenocarcinoma
30	57	M	IV	2	20	Adenocarcinoma
31	67	M	IIIb	1	10	Poorly differntiated
32	62	F	IV	2	0	Adenocarcinoma
33	74	M	Ib	1	80	Squamous cell
34	37	F	IIIb	3	0	Adenocarcinoma
35	65	M	IV	1	0	Adenocarcinoma

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลการตรวจ Tissue กับ Plasma EGFR mutation analysis เปรียบเทียบกับลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก

No.	Cell Type	Tissue EGFR mutation	Plasma EGFR mutation
1	Squamous cell	Negative	Negative
2	Adenocarcinoma	Negative	Negative
3	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative
4	Non-Small-Cell carcinoma	**Deletion**	**Deletion**
5	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative
6	Adenocarcinoma	Negative	Negative
7	Squamous	Negative	Negative
8	Adenocarcinoma	Negative	Negative
9	Squamous cell	Negative	Negative
10	Adenocarcinoma	Negative	Negative
11	Adenocarcinoma	Negative	Negative
12	Squamous cell,favor	Negative	Negative
13	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative
14	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative
15	Adenocarcinoma	Negative	Negative
16	Adenocarcinoma	Negative	Negative
17	Non-Small Cell carcinoma	Negative	Negative
18	Adenocarcinoma	Negative	Negative
19	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative
20	Non-Small Cell carcinoma	Negative	Negative
21	Adenocarcinoma, BAC	**Deletion**	Negative
22	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative
23	Poorly differentiated	Negative	Negative
24	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative

ตารางที่ 7 (ต่อ) ผลการตรวจ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อเปรียบเทียบกับในพลาสมา

No.	Cell Type	Tissue EGFR mutation	Plasma EGFR mutation
25	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative
26	Adenocarcinoma	Negative	Negative
27	Non Small Cell Lung Cancer	Negative	Negative
28	Non-Small Cell carcinoma	Negative	Negative
29	Adenocarcinoma	Negative	Negative
30	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative
31	Adenocarcinoma,favor	Negative	Negative
32	Adenocarcinoma	Negative	Negative
33	Squamous cell	Negative	Negative
34	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative
35	Adenocarcinoma	**Deletion**	Negative

การศึกษานี้เปรียบเทียบความแม่นยำในการตรวจหา EGFR mutation ระหว่างใน tissue เปรียบเทียบกับใน plasma โดยใช้วิธีการ Nested Polymerase Chain Reaction สำหรับหลักการในการตรวจ Nested Polymerase Chain Reaction คือ การทำ Polymearse Chain Reaction เฉพาะ mutation ที่สนใจ โดยใช้ primer 2 คู่ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่ง mutation ที่สนใจศึกษา เพื่อทำให้ความไว และความจำเพาะในการตรวจหา mutation ที่สนใจเพิ่มขึ้น

เนื่องจากข้อจำกัดบางประการ ในการศึกษานี้สนใจการตรวจหา EGFR mutation ของ exon 19 เพียงexon เดียว เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าในประเทศไทยพบว่ามีอุบัติการณ์สูงกว่า mutation ใน exon อื่น ๆ [40]

จากการศึกษาครั้งนี้มีผู้ป่วยเข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 35 ราย เพศชาย 22 คน, เพศหญิง 13 คน อายุเฉลี่ย 60ปี (พิสัย 32-83 ปี) โดยมีผู้ป่วยในระยะที่ 1 (Stage Ib) 1 คน (2.86%) , ระยะที่ 2 (Stage II) 0 คน (0%) , ระยะที่ 3 (Stage III) รวม 9 คน (25.72.%) แบ่งเป็นระยะที่ 3a (Stage IIIa) 2 คน (5.71%), ระยะที่ 3b (Stage IIIb) 7 คน (20%) , ระยะที่ 4 (Stage IV) 25 คน (71.43%)

การจำแนกมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กในการศึกษานี้แบ่งเป็นมะเร็งปอดชนิด adenocarcinoma 24 คน (68.57%), squamous cell 5 คน (14.29%), large cell 1 คน (2.86%), poorly differentiated 1 คน (2.86%), อื่น ๆ 4 คน (11.43%) ผู้ป่วยที่สูบบุหรี่ 21 คน (60%) (เฉลี่ย 25 pack/year, พิสัย 1-105 pack .year), ไม่สูบบุหรี่ 13 คน (37.14%), ไม่ทราบประวัติการสูบบุหรี่ 1 คน (2.86%)

จากผลการศึกษาพบว่ามี Tissue EGFR mutation 13 คน จาก 45 คน (37.14%), โดยแบ่งเป็นเพศชาย 6 คน (46.15%), เพศหญิง 7 คน (53.85%) โดยในกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบ EGFR mutation ใน tissue พบว่า เป็น adenocarcinoma 12 ราย (92.31%), เป็น large cell 1 ราย (7.69%) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ตรวจพบ EGFR mutation เป็นกลุ่มที่ไม่สูบบุหรี่ 6 ราย (46.15%), สูบบุหรี่ 6 ราย (46.15%), ไม่ทราบข้อมูลการสูบบุหรี่ 1 ราย (7.69%)

จากการศึกษานี้พบว่ามีผู้ป่วยเพียง 1 รายที่ตรวจพบ Plasma EGFR mutation โดยเป็นผู้ป่วยเพศหญิง, ไม่มีประวัติการสูบบุหรี่, ได้รับการวินิจฉัยเป็น large cell carcinoma โดยผู้ป่วยรายนี้เป็นผู้ป่วยในระยะที่ 4 ของโรค

ความไว (Sensitivity) ในการตรวจพลาสมา EGFR mutation เทียบกับการตรวจ EGFR mutation จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา เท่ากับ 7.69%.

ความจำเพาะ (Specificity) ในการตรวจพลาสมา EGFR mutation เทียบกับการตรวจ EGFR mutation จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา เท่ากับ 100%

สำหรับโอกาสในการตรวจไม่พบ EGFR mutation ใน plasma โดยที่ผู้ป่วยเป็นมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ที่เป็นขนาดเล็ก (Negative Predictive Value) เท่ากับ 64.79% แต่ในทางกลับกันใน

กรณีที่ผู้ป่วยเป็นมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กจะตรวจพบ EGFR mutation ในพลาสมา (Positive Predictive Value) เท่ากับ100%

ตารางที่ 8

ตารางที่ 8.1 คุณลักษณะผู้ป่วยที่มีตรวจพบ EGFR mutation

No	Sex	Age	Pathologic subtype	Smoking (pack .year)	Tissue EGFR	Plasma EGFR
1	M	52	Adenocarcinoma	30	Deletion	Negative
2	F	43	Non-Small-Cell	0	Deletion	Deletion
3	F	56	Adenocarcinoma	0	Deletion	Negative
4	F	70	Adenocarcinoma	0	Deletion	Negative
5	M	48	Adenocarcinoma	105	Deletion	Negative
6	F	64	Adenocarcinoma	10	Deletion	Negative
7	F	78	Adenocarcinoma	0	Deletion	Negative
8	F	56	Adenocarcinoma	N/A	Deletion	Negative
9	M	83	Adenocarcinoma	100	Deletion	Negative
10	M	49	Adenocarcinoma	40	Deletion	Negative
11	M	57	Adenocarcinoma	20	Deletion	Negative
12	F	37	Adenocarcinoma	0	Deletion	Negative
13	M	65	Adenocarcinoma	0	Deletion	Negative

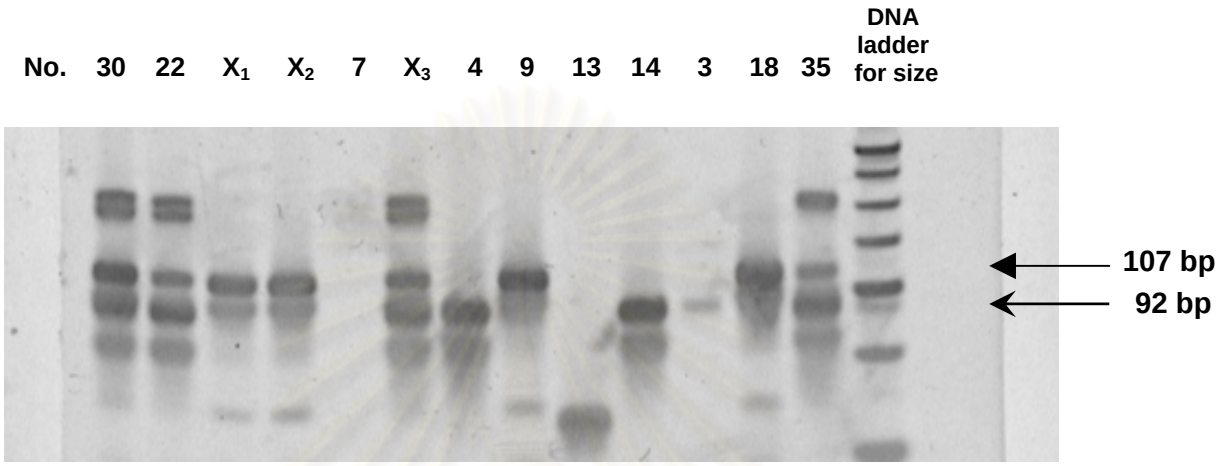
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8.2 คุณลักษณะผู้ป่วยที่มีตรวจพบ EGFR mutation

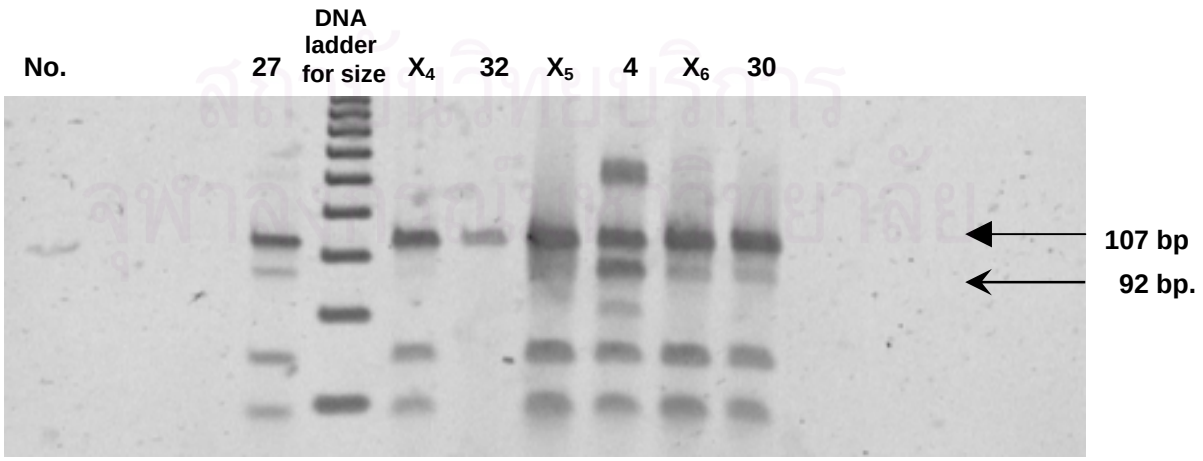
No	Sex	Age	Pathologic subtype	Stage	Tissue EGFR	Plasma EGFR
1	M	52	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
2	F	43	Non-Small-Cell	IV	Deletion	Deletion
3	F	56	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
4	F	70	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
5	M	48	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
6	F	64	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
7	F	78	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
8	F	56	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
9	M	83	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
10	M	49	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
11	M	57	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative
12	F	37	Adenocarcinoma	IIIb	Deletion	Negative
13	M	65	Adenocarcinoma	IV	Deletion	Negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>แผนภาพที่8</u>: แสดง PCR product ของ EGFR mutation ของ exon 19 จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา



<u>แผนภาพที่9</u>: แสดงPCR product ของ EGFR mutation ของ exon 19 จากพลาสมา



แผนภาพที่ 8 และ 9 แสดงผล Polymerse Chain Reaction ของ EGFR mutation analysis ของ exon ที่ 19 ของเซลล์มะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก : แผนภาพที่ 8 เป็นการแสดงผลที่ได้จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาโดยในช่อง (Lane) หมายเลข 30, 22, 4, 14, และ 35 เป็นการแสดงผลของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาวิจัยดังแสดงในตารางที่ 5 ในหน้าที่ 27 และ 28 ตามลำดับ โดย X_1,X_2,X_3 เป็นการแสดงผลของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาแต่ไม่มีข้อมูลในการตรวจ EGFR mutation ในพลาสามาเปรียบเทียบ (ข้อมูลไม่ได้แสดง) : แผนภาพที่ 9 เป็นการแสดงผลที่ได้จากพลาสมาโดยในช่อง (Lane) หมายเลข 27, 32, 4, 30, เป็นการแสดงผลของผู้เข้าร่วมการศึกษาวิจัยดังแสดงในตารางที่ 5 ในหน้าที่ 27 และ 28 ตามลำดับ โดย X_4,X_5,X_6 เป็นการแสดงผลของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาแต่ไม่มีข้อมูลการตรวจ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาเปรียบเทียบ (ข้อมูลไม่ได้แสดง) โดย wild type มีขนาด 107 base pair (ลูกศร ➡), และ EGFR mutation ของ exon 19 มีขนาด 92 base pair (ลูกศร ➡) , ในช่อง (Lane) หมายเลข 4 แสดงการตรวจพบ EGFR mutation ทั้งในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาและในพลาสมา, ดังแสดงในแผนภาพที่ 8 และ 9 ตามลำดับ)

<u>ตารางที่ 10</u> ตารางแสดงการคำนวณทางสถิติของผลการตรวจ EGFR mutation จากใน tissue เปรียบเทียบกับ plasma EGFR mutation

	Tissue EGFR mutation positive	Tissue EGFR mutation negative
Plasma EGFR mutation positive	1	0
Plasma EGFR mutation negative	12	22

ความไวของการทดสอบ (sensitivity)

Sensitivity = a/(a+c)

= 1/(1+12)

= 7.69%

ความจำเพาะของการทดสอบ (specificity)

Specificity = d/(b+d)

=22/22

= 100%

โอกาสในการตรวจ plasma EGFR พบในกรณีที่ tissue EGFR เป็นบวก (Positive Predictive Value; PPV)

PPV = a/(a+b)

= 1/(1+0)

= 100 %

โอกาสที่ตรวจไม่พบ plasma EGFR mutation ในกรณีที่ tissue EGFR เป็นลบ (Negative Predictive Value; NPV)

NPV = d(c+d)

= 22/(12+22)

= 64.70%

ความถูกต้องในการตรวจสอบ (Accuracy)

Accuracy = (a+d)/ (a+b+c+d)

= 23/35

= 65.71%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

การอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบการทดสอบการตรวจ EGFR mutation ระหว่างในชิ้นเนื้อและในพลาสมา โดยกระทำในผู้ป่วยรายเดียวกัน ในช่วงระยะเวลาก่อนที่ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาโดยการให้ยาเคมีบำบัด

จากการศึกษานี้ได้นำผู้ป่วยทั้งหมด 35 รายที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก ทำการตรวจหา EGFR mutation เปรียบเทียบระหว่างในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาและในพลาสมา ผลจากการศึกษานี้พบว่ามีผู้ป่วย 13 ราย (37.14%) ที่ตรวจพบ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา และในผู้ป่วยที่ตรวจพบ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยามีเพียง 1 ราย(7.69%) ที่สามารถตรวจพบพลาสมา EGFR mutation ได้โดยกระบวนการ Nested Polymerase Chain Reaction

โดยการตรวจนี้ใช้น้ำกลั่นเป็น Negative Control ของระบบเพื่อตรวจหาภาวะที่เหมาะสมของระบบในการทำปฏิกิริยาเพื่อป้องกันการปนเปื้อนในระบบ (Contamination), สำหรับ Negative Control ของการศึกษานี้ใช้ชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาซึ่งตรวจแล้วไม่พบว่ามีการกลายพันธุ์ (wild type) เป็นตัวควบคุม, สำหรับ Positive Control ของการศึกษานี้ใช้ชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาซึ่งได้รับการตรวจและทราบแล้วว่ามีการกลายพันธุ์เป็นตัวควบคุม

จากการศึกษานี้พบว่าความไวในการตรวจ EGFR mutation จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาเปรียบเทียบกับในพลาสมา เท่ากับ 7.69% ซึ่งต่ำมากจากการศึกษานี้ถ้าเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าของ Hideharu Kimura และคณะ พบว่าความไวในการตรวจสูงถึง 72.7% [13]

โดยผู้ป่วยทั้ง 35 คนในการศึกษานี้ส่วนใหญ่อยู่ในระยะที่ 3 และ 4 ของโรค (รวม 97.14%) ตรวจพบ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อทั้งหมดเพียง 37.14% ซึ่งต่ำกว่าอุบัติการณ์ที่เคยมีการศึกษามาก่อนทั้งในประเทศในทวีปเอเชียและในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์การตรวจพบEGFR mutation ในการศึกษานี้ไม่ได้แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p =0.61) [40]

เหตุจากการคัดเลือกประชากร

1. การคัดเลือกผู้ป่วย เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการตรวจพบ EGFR mutation ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กสัมพันธ์กับการไม่สูบบุหรี่และเป็นเพศหญิง [7,8,26,34,35] แต่ในการศึกษานี้มีอัตราส่วนผู้ที่เข้าร่วมการศึกษาเป็นเพศชาย : เพศหญิง เท่ากับ (1.69:1) ซึ่งมีผู้ชายเป็นสัดส่วนมากกว่าในการศึกษา

นอกจากนี้การศึกษานี้มีผู้ป่วยที่สูบบุหรี่ถึง 60% ของประชากรที่นำมาศึกษา จึงอาจทำให้อุบัติการณ์การตรวจพบ EGFR mutation น้อยกว่าในการศึกษาก่อนหน้านี้ [5,8,9,12,26,28-33,39] แต่เมื่อมาพิจารณาเฉพาะผู้ป่วยที่ไม่สูบบุหรี่พบว่าอุบัติการณ์การเกิด EGFR mutation สูงถึง 46.15 % (6/13 คน) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [5,8,9,12,26,28-33,39] และเมื่อมาพิจารณาชนิดของชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (histologic subtype) พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น Adenocarcinoma พบว่ามี EGFR mutation ของ exon 19 สูงถึง 50% (12/24 คน) ซึ่งอุบัติการณ์ใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [5,8,9,12,26,28-33,39] และเป็นการยืนยันอุบัติการณ์การตรวจพบ EGFR mutation ในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กอยู่ที่ประมาณ 50 % [40]

สำหรับสาเหตุอื่น ๆ ที่ทำให้การตรวจพบอุบัติการณ์ EGFR mutation ในการศึกษานี้ได้น้อยกว่าอุบัติการณ์การตรวจพบ EGFR mutation จากการศึกษาอื่น ๆ อาจมีเหตุอันเนื่องมาจาก

เหตุจากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

1. คุณภาพของ DNA เนื่องจากการศึกษานี้ใช้ ชิ้นเนื้อซึ่งเป็นชิ้นเนื้อจากภาควิชาพยาธิวิทยาซึ่งเป็นชิ้นเนื้อซึ่งผ่านกระบวนการมาแล้ว อาจมีผลกระทบต่อคุณภาพของ DNA ที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย

2. ปริมาณของ DNA เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้ตรวจสัดส่วนของมะเร็งเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อปกติก่อนการทำการสกัด DNA อาจมีผลทำให้ได้ปริมาณ DNA ที่มีการกลายพันธุ์น้อยกว่าปกติ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ทำการทำ Polymerase Chain Reaction ด้วยวิธี Nested Polymerase Chain Reaction Technique ซึ่งสามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจหา

EGFR mutation ได้ ดังนั้นสมมติฐานนี้อาจมีผลต่ออุบัติการณ์การตรวจ EGFR mutation ได้น้อยกว่าในการศึกษาอื่น ๆ ไม่มากนัก

เหตุจากพลาสมา

1. ระยะเวลาในการเก็บเลือดจนถึงกระบวนการการสกัดพลาสมา DNA เนื่องจากการศึกษานี้ไม่สามารถควบคุมระยะเวลาบางช่วงในการศึกษา อาทิ ระยะเวลาที่เลือดมาสู่ห้องปฏิบัติการ, ระยะเวลาในการนำตัวอย่างมาทำการทดสอบ แต่อย่างไรก็ตามมีข้อมูลว่า DNA ในพลาสมา/ซีรัม สามารถอยู่ได้นานถึง 1-2 เดือนโดยไม่ถูกทำลาย และจากผลการศึกษานี้มีการตรวจพบ wild type EGFR ในพลาสมาในกรณีที่ตรวจไม่พบ Mutant Band ในพลาสมา เป็นการบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของ DNA ในสิ่งส่งตรวจนั้น ๆ ดังนั้นระยะเวลาในการเก็บเลือดจนถึงกระบวนการการสกัดพลาสมา DNA อาจไม่ใช่ปัญหาในกรณีนี้

2. ปริมาณเลือดที่นำมาตรวจ ไม่พอเพียง ซึ่งจากการศึกษาของ Kimura และคณะ [13] พบว่าได้มีการใช้ซีรัมเพียง 25 µL และใช้ DNA template เพียง 1 µL ในการตรวจหาซีรัม EGFR mutation ดังนั้นปริมาณเลือดอาจไม่ใช่ปัญหาในกรณีนี้

3. มีปริมาณ mutation น้อยเกินไปในสิ่งส่งตรวจ ทำให้ EGFR mutation ถูกบังโดย wild type (Overwhlem by wild type) ทำให้ไม่สามารถตรวจพบ EGFR mutation ได้ ซึ่งปัญหานี้ผู้วิจัยได้ทำการแก้ไขโดยการใช้ Nested Polymerase Chain Reaction ซึ่งกระบวนการ Nested Polymerase Chain Reaction สามารถเพิ่มความไวในการตรวจหา EGFR mutation ได้ แต่อย่างไรก็ตามความไวและความจำเพาะก็ไม่สูงเท่ากับการตรวจด้วยวิธี Mutant Enriched Polymerase Chain Reaction เนื่องจากวิธีการดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ใช้ enzyme ที่มีความจำเพาะต่อ wild type ตัด wild type ออกไป ทำให้เหลือเฉพาะตำแหน่ง mutation ที่สนใจ จากเทคนิคนี้สามารถเพิ่มความไวในการตรวจหา EGFR mutation ได้สูงถึง 1 mutation ใน 2000 wild type [39] จากการศึกษาของ Kimura และคณะวิธีการตรวจหา EGFR mutation ในซีรัมนั้นใช้ DNA template เพียง 1 µL เท่านั้น [13] ดังนั้นปริมาณ mutation ที่น้อยเกินไปอาจไม่ใช่สาเหตุในการที่ทำให้ตรวจ EGFR mutation ได้น้อยกว่าในการศึกษาอื่น ๆ ก่อนหน้านี้ [5,8,9,12,26,28-33,39]

เหตุจากเทคนิคในการตรวจ

1. เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Hideharu Kimura และคณะ [13] สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของ EGFR ของ exon 19 ได้สูงถึง 72.7% ซึ่งแตกต่างจากการศึกษานี้ซึ่งสามารถตรวจพบพบการกลายพันธุ์ของ EGFR ของ exon 19 ได้เพียง 7.69% ทั้งนี้อาจเป็นผลจากเทคนิคในการตรวจซึ่งมีความไวแตกต่างกัน โดยในการศึกษาของ Hiderharu Kimura และคณะ [13] ใช้ Scorpion primer ซึ่งเป็น fluorescence primer ซึ่งมีความสามารถหา mutation แม้เพียง 1 base pair ได้ร่วมกับเทคนิค Amplified Refractory Mutation System (ARMS) ซึ่งเป็นเทคนิคในการแยก allele ที่มีความแตกต่างกันหรือไม่เข้ากันได้และได้ ซึ่งการทำเทคนิคนี้สามารถใช้ร่วมกับ Scorpion primer เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจหา mutation อย่างละเอียดได้ แต่ในการศึกษานี้ได้ใช้เพียง Nested Polymerase Chain Reaction Technique ซึ่งมีความไวและความจำเพาะที่ต่ำกว่ามาก ซึ่งสาเหตุนี้อาจเป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดที่ทำให้ความไว (sensitivity) ของการศึกษาครั้งนี้ด้อยกว่าในการศึกษาก่อนหน้านี้ [13]

แต่อย่างไรก็ตาม ข้อด้อยของการศึกษานี้เปรียบเทียบกับการศึกษาของ Kimura และคณะ [13] คือ ในการศึกษาของ Kimura นั้นได้ทำการตรวจความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA ที่สกัดได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometry ซึ่งไม่ได้ใช้ในการศึกษานี้ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Kimura และคณะได้ใช้ Scorpion primer ซึ่งเป็น fluorescence primer ซึ่งมีความสามารถหา mutation แม้เพียง 1 base pair ได้

นอกจากนี้การศึกษาดังกล่าวมีเพียงการศึกษาเดียวที่ตรวจหา EGFR mutation ในซีรัมในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กและประชากรที่เข้าร่วมการศึกษาของ Kimura และคณะ [13] มีจำนวนน้อยและจำนวนประชากรซึ่งนำมาตรวจหา EGFR ในซีรัมเปรียบเทียบกับ EGFR จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยามีจำนวนไม่พอเพียง และยังไม่มีการศึกษาอื่น ๆ ยืนยันผลการตรวจ EGFR mutation ในซีรัม/พลาสมาอีก

ดังนั้น การศึกษาของ Kimura และคณะ [13] เพียงการศึกษาเดียวยังไม่สามารถสรุปได้ถึงการตรวจพบ EGFR mutation ในซีรัมได้ คงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงการตรวจได้จริงของ EGFR mutation ในซีรัม/พลาสมาต่อไป

สำหรับความจำเพาะในการตรวจ EGFR เปรียบเทียบระหว่างในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาและการตรวจในพลาสมาในการศึกษานี้สูง 100% หมายความว่า การตรวจพบพลาสมา EGFR mutation สามารถบ่งถึงการตรวจพบ EGFR mutation ได้ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอด แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากจากการศึกษานี้พบว่ามีผู้ป่วยเพียง 1 รายที่สามารถตรวจพบ EGFR mutation จากพลาสมาได้จึงยังไม่สามารถสรุปผลได้ ควรได้มีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เนื่องจากการศึกษานี้มีผู้ป่วยเพียง 1 รายที่สามารถตรวจ EGFR mutationในพลาสมาได้ โดยผู้ป่วยเป็นเพศหญิง, ไม่สูบบุหรี่, ได้รับการวินิจฉัยเป็น Non-Small-Cell carcinoma, อยู่ในระยะที่ 4 ของโรคซึ่งการตรวจพบนี้ตรงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [13] เนื่องจากการศึกษาส่วนใหญ่จะตรวจพบ EGFR mutation ในมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กแบบ Adenocarcinoma ซึ่งได้มีการศึกษายืนยันถึงชนิดของเซลล์ในผู้ป่วยรายนี้โดยแผนกพยาธิวิทยากายวิภาค ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์พบว่า ชิ้นเนื้อดังกล่าวเป็น Non-Small-Cell carcinoma แต่ไม่สามารถระบุรายละเอียดชนิดของเซลล์ได้

สำหรับผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษานั้นไม่มี เนื่องจากการศึกษานี้ได้ทำการตรวจ EGFR mutation จากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยซึ่งผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับการตรวจชิ้นเนื้อเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคตามมาตรฐาน นอกจากนี้การตรวจพลาสมา EGFR mutation เป็นการตรวจจากเลือดซึ่งใช้ปริมาณเลือดเพียงเล็กน้อย โดยจำนวนครั้งในการเจาะเลือดจะไม่เพิ่มขึ้นเนื่องจากผู้ป่วยจำเป็นต้องได้รับการตรวจเลือดก่อนเข้ารับการรักษาอันเป็นมาตรฐานในการดูแลผู้ป่วย

โดยสรุป จากผลการศึกษาของการศึกษานี้พบกว่าการตรวจพลาสมา EGFR mutation อาจนำมาใช้ทดแทนการตรวจ EGFR mutation จากชิ้นเนื้อได้ ด้วยวิธีการตรวจที่เหมาะสม ควรได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงความไวในการตรวจหา EGFR mutation ในพลาสมาซึ่งจะได้มีการดำเนินการศึกษาต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

เนื่องจากการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาวิธีการใหม่ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็ก (Non-Small-Cell Lung Cancer) ซึ่งในปัจจุบันการวินิจฉัยจำเป็นต้องได้ชิ้นเนื้อซึ่งจำเป็นต้องใช้แพทย์หลายสาขา ใช้เวลาและกระบวนการต่างๆ ในการวินิจฉัย

การศึกษานี้ได้พยายามหาวิธีการใหม่ ๆ ในการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กให้ได้ง่ายสะดวก รวดเร็ว และมีผลกระทบกับผู้ป่วยน้อยที่สุด

จากการศึกษาจึงได้เปรียบเทียบการตรวจ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อเปรียบเทียบกับในพลาสมา เพื่อเป็นการศึกษาหาวิธีใหม่ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งปอดที่ไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กเพื่อทดแทนการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาอันเป็นมาตฐานในการวินิจฉัยในปัจจุบัน

เนื่องจากการตรวจพบว่ามี EGFR mutation ในชิ้นเนื้อ โดยตรวจไม่พบว่ามี EGFR mutation ในพลาสมา มีความไว (Sensitivity) 7.69%, ความจำเพาะ (Specificity) 100% จากการศึกษานี้พบว่าความไวในการตรวจหา EGFR mutation ในพลาสมาไม่มีความไวเพียงพอในการที่จะนำมาใช้ทดแทนวิธีการตรวจ EGFR mutation จากชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

เนื่องจากโอกาสที่ตรวจไม่พบพลาสมา EGFR mutation ในกรณีที่ EGFR ในชิ้นเนื้อเป็นลบ (Negative Predictive Value) สูงถึง 100 % ดังนั้นในกรณีที่ตรวจ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อไม่พบก็ไม่มีความจำเป็นจะต้องตรวจเลือด (พลาสมา) ในผู้ป่วยเพิ่มเติมเพื่อหา EGFR mutation ในทางตรงกันข้ามในกรณีที่โอกาสในการตรวจชิ้นเนื้อพบ EGFR mutation ให้ผลบวกร่วมกับการตรวจพบ plasma EGFR เป็นบวก (Positive Predictive Value) เท่ากับ 100% ดังนั้นโอกาสในการตรวจพบ EGFR mutationในพลาสมา สามารถทำนายการมี EGFR mutation ของมะเร็งปอดได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบผู้ป่วยเพียง 1 รายที่ตรวจพบ EGFR mutation ในพลาสมา ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

โดยสรุป การตรวจหาพลาสมา EGFR mutation อาจนำมาใช้ทดแทนการตรวจ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อได้ด้วยวิธีการตรวจที่เหมาะสม และควรได้มีวิธีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจต่อไปในการศึกษาต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรก ๆ ในการตรวจหา EGFR mutation ในพลาสมาเปรียบเทียบกับในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ดังนั้นเทคนิคการตรวจ, ความชำนาญในกาตรวจและการแปลผลอาจมีผลต่อผลการทดสอบ

ควรได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจ EGFR mutation ในชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาต่อไปในอนาคต อาทิ การใช้ Scorpion and ARMS technique ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจต่อไปสำหรับการศึกษาที่จะตามมาในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] Spira A, Ettinger D. Multidisciplinary Management of Lung Cancer. N Engl J Med 2004;350:379-92.

[2] Batura-Gabryel H, Foremska-Iciek J. Lung cancer in the elderly--increasing epidemiological problem of 21st century. Rocz Akad Med Bialymst 2005;50 Suppl 1:152-5.

[3] Sekido Y,Fong K, Minna J et al.Cancer of the Lung.In Vincent T.Devita,Jr.,Samuel Hellman, Steven A.Rosenberg, editors. Cancer Principle and Practice of Oncology 7th Lippincott Williams and Wilkins 2005: 753-810.

[4] Ettinger D, Argiris A, Bepler G,et al. Non-Small Cell Lung Cancer Practice Guidelines in Oncology – v.2.2005 Guidelines Index.

[5] Shanquetti A, Kaplan C, Govindan R, et al. Lung Cancer.In Ramaswamy Govindan editor.The Washington Manual of Oncology Lippincott Williams and Wilkins 2002:238-51.

[6] Woodburn,J.R. The epidermal growth factor receptor and its inhibitor in cancer therapy.Pharmacol.Ther 1999;82:241-50.

[7] Ciardiello, F., and Tortora, G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res 2001;7:2958-2970.

[8] Alan E. Wakeling, Simon P.Guy, Jim R. Woodburn, et al. ZD 1839(Iressa): An Orally Active Inhibitor of Epidermal Growth Facotr Signaling with Potential for Cancer Therapy. Cancer Res 2002;62:5749-54.

[9] Huang S, Liu H,Li L. High Frequency of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations with Complex Patterns in Non–Small Cell Lung Cancers Related to Gefitinib Responsiveness in Taiwan. Clinical Cancer Research 2004;10: 8195–203.

[10] Arteagea CL: Overview of epidermal growth factor receptor biology and it s role as a therapeutic target in human neoplasia.Semin Oncol 2002;29:3-9.

[11] Young Hwa Soung, Jong Woo Lee, Su Young Kim, et al.Mutation analysis of EGFR and K-RAS genes in lung adenocarcinomas Virchow Arch 2005;446: 483-488.

[12] TJ Lynch, D W Bell, R Sordella, S Gurubhagavatula, R A Okimoto, B W Brannigan, et al., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med 2004;350: 2129-39.

[13] W Pao, V Miller, M Zakowski, J Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, et al., EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 13306-11.

[14] Shigemastsu H, Lin L, Takahashi T.et al. Clinical and biologic features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. J Natl Cancer Inst 2005; 97:339-46.

[15] Han SW, Kim TY, Hwang PG, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor in non-smoking in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. J Clin Oncol 2005; 23:2493-501.

[16] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Mutation of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implication. Cancer Res 2004; 64: 8919-23.

[17] Hideharu Kimura, Kazuo Kasahara, Makoto Kawaishi et al., Detection of epidermal growth factor receptor mutation in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with Non-Small Cell lung cancer. Clin Cancer Res 2006;12(13):3915-21.

[18] Wells A (2000) The Epidermal Growth Factor Receptor- a new target in cancer therapy.signal 1:4-11.

[19] Nielson UB, Cardone MH, Sinskery AJ, et al. Profiling Receptor Tyrosine Kinase Activation by using Ab microarrays. Proc Natl Sci, USA 2003; 100: 9330-5.

[20] HS Para, R Cavina, F Latteri, et al. Analysis of epidermal growth factor receptor expression as predictive factor for response to gefitinib (Iressa, ZD 1839) in Non-small cell lung cancer. Br J Cancer 2004 ;91: 208-12.

[21] Bruce E.Johnson, Pasi A.Janne. Epidermal growth factor receptor mutation in patients with non-small cell lung cancer. Cancer Res 2005;65 :7525-29.

[22] JG Paez, PA Janne, J C Lee, S Tracy, H Greulich, S Gabriel, et al., EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science 2004;304: 1497-500.

[23] Tokomo M, Toyooka S, Kiura K, et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. Clin Caner Res 2005;11:1167-73.

[24] Tetsuya Mitsudori, Takayuki Kosaka, Hideki Endoh, et al. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene Predict Prolonged Survival After Gefitinib Treatment in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer With Postoperative Recurrence. J Clin Oncol 2005;23:2513-20.

[25] Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized trials. Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group. BMJ 1995; 311:899-909.

[26] Cappuzzo F, Gregorc V, Rossi E, et al.Gefitinib in pretreated non-small cell lung cancer (NSCLC): Analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic NSCLC. J Clin Oncol 2003;21:2658-63.

[27] Nicholson RI, Gee JM, Harper ME.EGFR and cancer prognosis. Eur J Cancer 2001;37:S9-15.

[28] Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C, et al.Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. Cancer Res1993;53:2379-85.

[29] Fontanini G, De Laurentiis M,Vignati S, et al. Evalutation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors of neoangiogenesis in completely resected stage I–IIIa non-small cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival.Clin Cancer Res 1998;4:241-49.

[30] Lai VVW, Chen FF, Wu MH, et al. Immunohistochemical analysis of epidermal growth factor receptor family members in stage I non-small cell lung cancer. Ann Thorac Surg 2001;72:1868-76.

[31] MG Kris, RB Natale, RS Herbst, TJ Lynch, Jr, D Prager, C P Belani, et al., Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. JAMA 2003;290: 2149-58.

[32] M. Fukuoka, S. Yano, G. Giaccone, T. Tamura, K. Nakagawa, J. Y. Douillard, et al., Mult-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected] . J Clin Oncol 2003; 21: 2237-46.

[33] Daphne W. Bell, Thomas J. Lynch, Sara M. Haserlat, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations and Gene Amplification in Non–Small-Cell Lung Cancer: Molecular Analysis of the IDEAL/INTACT Gefitinib Trials; J Clin Oncol 2005; 02: 7078.

[34] MG Kris, RB Natale, RS Herbst, TJ Lynch, Jr, D Prager, C P Belani, et al., Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. JAMA 2003; 290:2149-2158.

[35] M. Fukuoka, S. Yano, G. Giaccone, T. Tamura, K. Nakagawa, J. Y. Douillard, et al., Mult-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected] . J Clin Oncol 2003 ;21: 2237-46.

[36] Perez-Soler R.,Chachoua A, Hammond LA, et al. Determinant s of tumor response and survival with erlotinib in patient with Non-Small Cell Lung Cancer. J Clin Oncol 2004;22:3238-47.

[37] Chen KC, Chang GC, Yang TY. A comparison of gefitinib monotherapy and chemotherapy with cisplatin and gemcitabine in chemonaive patient with advanced NSCLC: A Case control study.Thoracic Med 2003 ;18: S6 218.

[38] Fred R, Hirsch, Mailaila Varella-Gracia, Jason Mclong et al. Increase Epidermal Growth Factor Receptor gene copy number detected by Fluoresence in situ hybridization (FISH) associated with increase sensitivity to gefitinib. J Clin Oncol 2005;23: 6838.

[39] Asano A, Toyooka S, Tokumo M, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. Clinical Cancer Research 2006;12: 43-8.

[40] Sriuranpong V, Chantranuwat C, Huapai N, et al. High frequency of mutation of epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinoma in Thailand. Cancer Lett. 2006;239(2): 292-7.

[41] Apiwat Mutirangura, Wichai Pornthanakasem, Apiradee Theamboonlers, Virote Sriuranpong, Prasert Lertsanguansinchai, Saowanee Yenrudi, Narin Voravud et al.Epstein-Barr Viral DNA in Serum of patients with nasopharyngeal carcinoma. Clinical Cancer Research 1998;4: 665-9.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.
แบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย

The Study of Comparison of Prediction Between Tissue and Plasma Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Analysis in Non-Small Cell Lung Cancer Patients	
☐ CASE.....	**เลขที่**: ☐☐☐
Date of diagnosis ☐☐ ☐☐ ☐☐☐☐	HN ☐☐ ☐☐☐☐☐☐

1. ข้อมูลทั่วไป **สำหรับเจ้าหน้าที่**

1. อาย ☐☐ ปี — AGE ☐☐
2. โรคประจำตัว
   1. ☐ ไม่มี
   2. ☐ มี ระบุ 2.1 ☐ เบาหวาน
      2.2 ☐ ความดันโลหิตสูง
      2.3 ☐ ไขมันในเลือดสูง
      2.4 ☐ อื่นๆ..... — DISEASE ☐☐

3. ประวัติการสูบบุหรี่ 1. ☐ ไม่สูบ 2. ☐ ยังคงสูบ .....มวน/วัน นาน.....ปี — SMOKE ☐
   3. ☐ เคยสูบ.....มวน/วัน นาน.....ปี และเลิก..... ปี

4. ประวัติการดื่มสุรา 1. ☐ ไม่ดื่ม2. ☐ ยังดื่ม ปริมาณ..... นาน.....ปี — ALC ☐
   3. ☐ เคยดื่ม ปริมาณ..... นาน.....ปี และเลิก..... ปี

5. น้ำหนัก 1. ☐ ไม่ลด 2. ☐ ลด .....kg ในเวลา.....เดือน — WEIGHT ☐
   3. ☐ เพิ่ม
   1. ☐ ไม่มี 2. ☐ มี ระบุ_____

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ระยะของโรค 1. ☐ ระยะที่ 1 2. ☐ ระยะที่ 2 STAGE ☐

3. ☐ ระยะที่ 3 4. ☐ ระยะที่ 4

7. น้ำในเยื่อหุ้มปอด 1. ☐ มี 2. ☐ ไม่มี PLR EFF ☐

7. ชนิดของเซลล์ 1. ☐ Adenocarcinoma CELL TYPE ☐

2. ☐ Large Cell

3. ☐ Squamous Cell

4. ☐ Bronchoalveolar Cell

5. ☐ Adenosquamous Cell

6. ☐ Other, specified.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

แบบสมัครใจเข้าร่วมการศึกษาวิจัย (Informed Consent Form)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ข้าพเจ้า.....อายุ..... ปี
อาศัยอยู่บ้านเลขที่.....หมู่.....ซอย.....ถนน.....
ตำบล/แขวง.....อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....
ได้รับทราบรายละเอียดโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของตัวรับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิว ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดไม่ใช่เซลล์ขนาดเล็กในชิ้นเนื้อเปรียบเทียบกับในพลาสมา”

ข้าพเจ้าทราบว่าจะได้รับการตรวจยืนยันการวินิจฉัยโรคมะเร็งปอดโดยการตรวจทางพยาธิวิทยากายวิภาคและ/หรือการตรวจชิ้นเนื้อด้วยวิธีการพิเศษใด ๆ รวมทั้งการตรวจเลือดและการประเมินระยะของโรคโดยอาศัยการตรวจทางรังสีวิทยา ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของขบวนการการวินิจฉัยและการรักษาตามมาตรฐาน และเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัย โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายใด ๆ เพิ่มเติม และการศึกษานี้จะไม่เปลี่ยนแปลงการรักษาที่ได้รับตามปกติ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะของดการเจ้าร่วมโครงการวิจัยโดยไม่ต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้า ซึ่งการกระทำดังกล่าวจะไม่มีผลกระทบต่อการบริการการรักษาที่ได้รับแต่ประการใด

ข้าพเจ้าได้รับทราบจากผู้วิจัยว่าจะไม่เปิดเผยข้อมูลหรือผลวิจัยของข้าพเจ้าเป็นรายบุคคลต่อสาธารณชน หากผู้วิจัยมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวกับงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ข้าพเจ้าทราบโดยไม่มีการปิดบัง

หากมีข้อสงสัยประการใด ข้าพเจ้าสามารถติดต่อกับ นพ.ศรายุทธ รอดไหม (ผู้วิจัย) โดยตรงที่หมายเลข 01-8184534 หรือที่สาขามะเร็งวิทยา ตึกว่องวานิช ชั้น 4 โทรศัพท์ 02-2564533

ข้าพเจ้าได้ทราบและซักถามผู้วิจัยจนหมดข้อสงสัยโดยตลอดแล้วและยินดีเข้าร่วมในการวิจัย จึงลงลายชื่อไว้เป็นหลักฐานต่อหน้าพยาน

ลงชื่อ.....ผู้ยินยอมหรือผู้แทนโดยชอบธรรม

(.....)

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการวิจัย

(.....)

ลงชื่อ.....พยาน

(.....)

ลงชื่อ.....พยาน

(.....)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นามสกุล	นาย ศรายุทธ รอดไหม
ประวัติส่วนตัว	เกิดวันที่ 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ2) จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ในปีการศึกษา 2542
ประวัติการทำงาน	เป็นพนักงานของรัฐ ที่โรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช ระหว่างปี พ.ศ. 2542-2544 ปี พ.ศ. 2544-2547 เป็นแพทย์ประจำบ้านโลหิตวิทยา อายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ปี พ.ศ. 2547 ได้รับวุฒิบัตรผู้เชียวชาญโลหิตวิทยาอายุรศาสตร์ ปี พ.ศ. 2548-ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอดมะเร็งวิทยา และนิสิตปริญญาโทภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย