

ร้อยละของการแสดงออกของ ESTROGEN RECEPTOR BETA ในเซลล์ต่อมน้ำเหลือง  
ของผู้ป่วย DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA



นางสาวศรุตดา ฝึกนวม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PERCENTAGE OF ESTROGEN RECEPTOR BETA EXPRESSION IN LYMPH NODES  
OF PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA

Miss Saruta Faknuam



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 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ร้อยละของการแสดงออกของ ESTROGEN RECEPTOR  
BETA ในเซลล์ต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วย DIFFUSE LARGE  
B CELL LYMPHOMA

โดย

นางสาวศรุตฯ ฟักนวม

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์พลภัทร โรจน์นครินทร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมบัติ ตรีประเสริฐสุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์พลภัทร โรจน์นครินทร์)

..... กรรมการ  
(นายแพทย์ สราวุฒิ ศิวโมกษธรรม)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(อาจารย์ นายแพทย์ รวิสุต เตียววิศเรศ)

ศรุตดา พิภนวม : ร้อยละของการแสดงออกของ ESTROGEN RECEPTOR BETA ในเซลล์ต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วย DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA (PERCENTAGE OF ESTROGEN RECEPTOR BETA EXPRESSION IN LYMPH NODES OF PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ.พลภัทร โรจนนครินทร์, 41 หน้า.

ที่มา: Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) มีการแสดงออกใน lymphoid cell และมีฤทธิ์ด้านการแบ่งตัวของเซลล์เหล่านี้ การศึกษาในหนูทดลองพบว่า ER $\beta$  selective agonist สามารถยับยั้งมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด Burkitt และ Mantle cell ได้ แต่การศึกษาการแสดงออกของ ER $\beta$  ในเซลล์ต่อมน้ำเหลืองของ ผู้ป่วย Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) นั้น ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

วัตถุประสงค์: ศึกษาร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ ER $\beta$  ในเนื้อเยื่อ DLBCL โดยวิธี Immunohistochemistry และศึกษาความสัมพันธ์กับระยะเวลาปลอดโรค (Event-free survival) ของผู้ป่วย

วิธีการศึกษา: ย้อม ER $\beta$  ในเนื้อเยื่อจากต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วยผู้ใหญ่ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น nodal DLBCL และได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดสูตร R-CHOP ตั้งแต่ มกราคม 2551 ถึง ธันวาคม 2556 ประเมินการแสดงออกของ receptor และศึกษาความสัมพันธ์กับระยะเวลาปลอดโรคของผู้ป่วย

ผลการศึกษา: ผู้ป่วยทั้งหมด 36 คน อายุเฉลี่ย 57.4 ปี (พิสัย 19-85 ปี) เป็นเพศหญิงร้อยละ 38.9 การแสดงออกของ ER $\beta$  ในเนื้อเยื่อ DLBCL พบว่ามีความหลากหลายตั้งแต่ร้อยละ 1 ถึง 85 ค่าเฉลี่ยของการแสดงออกในกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาคือ ร้อยละ 12.8 เทียบกับกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาหรือเสียชีวิตคือร้อยละ 38.1 (P = 0.001) เมื่อวิเคราะห์ ROC(Receiver operating characteristic) พบว่าการแสดงออก ER $\beta$  ที่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5 สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี มีค่าความไว 78% และค่าความจำเพาะ 78% การแสดงออกระดับสูง (ER $\beta$   $\geq$  17.5%) สัมพันธ์กับระยะเวลาปลอดโรคที่สั้น มี hazard ratio (HR) 4.74, 95% confidence interval (CI) 1.55-14.49, P = 0.001 ค่ามัธยฐานของระยะเวลาปลอดโรค 133 วัน ในกลุ่มที่มีการแสดงออก ER $\beta$  สูงเทียบกับ 2,500 วัน ในกลุ่มที่มีการแสดงออกต่ำ นอกจากนี้ การแสดงออกของ ER $\beta$  ไม่มีความสัมพันธ์กับกลุ่มเสี่ยง (IPI) การวิเคราะห์พหุตัวแปร (multivariate analysis) พบว่าการแสดงออกของ ER $\beta$  (HR 4.27, 95% CI 1.39-13.1, P = 0.011) และกลุ่มที่มี IPI สูง (HR 4.96, 95% CI 1.11-22.2, P = 0.036) สัมพันธ์อย่างอิสระกับระยะเวลาปลอดโรคที่สั้น

สรุป: เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองในผู้ป่วย DLBCL มีการแสดงออกของ ER $\beta$  ที่หลากหลาย โดยการแสดงออกที่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5 สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี

ภาควิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2558

# # 5774094230 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: ESTROGEN RECEPTOR / DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA / EVENT FREE SURVIVAL

SARUTA FAKNUAM: PERCENTAGE OF ESTROGEN RECEPTOR BETA EXPRESSION IN LYMPH NODES OF PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA. ADVISOR: PROF. PONLAPAT ROJNUKARIN, M.D., Ph.D., 41 pp.

*Background:* Estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) is expressed in lymphoid tissues. Recently, experimental mouse models showed that ER $\beta$ -selective agonists inhibited Burkitt and Mantle lymphoma growth. However, there has been no reported study of ER $\beta$  expression in human diffuse large B cell lymphoma (DLBCL).

*Objectives:* To determine the ER $\beta$  expression in DLBCL tissue using immunohistochemistry and correlate with clinical outcomes.

*Methods:* Adult patients who were newly diagnosed as nodal DLBCL and received R-CHOP chemotherapy at King Chulalongkorn Memorial Hospital were enrolled. The patients, who had transformed lymphoma, received previous chemotherapy or were loss to follow-up before 3 years, were excluded. The lymph node specimens were stained for ER $\beta$  proteins and counted for ER $\beta$ -expressing cells. The expression was correlated with the patient event-free survival (EFS).

*Results:* There were 36 patients included in the study. The mean age was 57.4 (range 19-85) years and 38.9% were female. The ER $\beta$  expression in DLBCL tissue was varied from 1% to 85%. The mean expressions in the responsive vs. relapsed/refractory groups were 12.8 % vs. 38.0%, respectively (P = 0.001). The ROC analysis showed that the expression of greater than 17.5% was related to poor outcomes at 78% sensitivity and 78% specificity.

The ER $\beta$  expression of 17.5% or more was significantly related to poor EFS after R-CHOP therapy (Hazard ratio [HR] 4.74, 95% Confidence interval [CI] 1.55-14.49, P = 0.001). The median EFS were 133 vs. 2,500 days in the high vs. low ER $\beta$  expression groups, respectively. In addition, ER $\beta$  expression was not significantly associated with the international prognostic index (IPI) risk group. The multivariate analysis showed that ER $\beta$  expression (HR 4.27, 95%CI 1.39-13.1, P = 0.011) and high IPI (HR 4.96, 95%CI 1.11-22.2, P = 0.036) independently associated with poor EFS.

*Conclusions:* DLBCL cells expressed variable degrees of ER $\beta$  protein. The expressing cells of 17.5% or more were associated with a poor prognosis.

Department: Medicine

Student's Signature .....

Field of Study: Medicine

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2015

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากความเมตตากรุณา และความช่วยเหลือ

เป็นอย่างดีจาก ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พลภัทร โรจน์นครินทร์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

วิทยานิพนธ์หลัก ผศ.พญ.พันธุ์จาง หาญวิวัฒน์กุล และ รศ. นพ.ธรรมธร อาศนะเสน ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้เสียสละเวลาในการให้คำปรึกษาอย่างดีเสมอมา ซึ่งผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอบพระคุณ พยาบาลและเจ้าหน้าที่หน่วยงานโลหิตวิทยาและพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูล เก็บตัวอย่างเลือด และขอบพระคุณผู้ป่วยและผู้ดูแลทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าร่วมโครงการครั้งนี้

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง ในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ ซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย .....	2
1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	3
1.4 สมมติฐาน .....	3
1.5 กรอบความคิดแนววิจัย .....	4
1.6 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย.....	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	5
1.8 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการศึกษาวิจัยและมาตรฐานการแก้ไข .....	6
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7
ฮอร์โมนเอสโตรเจน .....	7
ผลของ ERs ต่อการเติบโตแบ่งตัว (Proliferation) และการตาย (Apoptosis) ของเซลล์ .....	9
การปรากฏของชนิดของ ERs บนเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันและบทบาทหน้าที่ ERs ในเซลล์ลิมโฟ ไซต์.....	10
ผลของฮอร์โมน E <sub>2</sub> ต่อ lymphoid cell.....	10
ผลของ ERs และE <sub>2</sub> ต่อ myeloid cells .....	11

บทบาทของ ERs ใน lymphoid malignancies .....	12
บทบาทของ ER $\beta$ agonists ในฐานะยาต้านมะเร็ง .....	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	14
3.1 รูปแบบการวิจัย .....	14
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย .....	14
3.3 ขนาดตัวอย่าง .....	14
3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย .....	16
3.5 การรวบรวมข้อมูล .....	16
3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย .....	17
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล .....	17
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	18
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล .....	18
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ .....	27
5.1 อภิปรายผล .....	27
5.2 สรุปผล .....	28
5.3 เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่เคยศึกษา .....	28
5.4 ข้อดีของการศึกษานี้ .....	28
5.5 ข้อด้อยของการศึกษานี้ .....	29
5.6 ข้อเสนอแนะ .....	29
รายการอ้างอิง .....	30
รายการอ้างอิง .....	39
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	41



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การปรากฏของ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันแต่ละชนิด <sup>(57, 58)</sup> .....	12
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย DLBCL ที่เข้าร่วมการศึกษาแบ่งตามการตอบสนองต่อการรักษาของโรคดี และไม่ดี.....	20
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย DLBCL ที่เข้าร่วมการศึกษาแบ่งตามการแสดงออกของ ER $\beta$ ที่น้อยกว่าร้อยละ 17.5 และมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5.....	22
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนครั้งของการรักษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกของ ER $\beta$ ที่น้อยกว่าร้อยละ 17.5 และมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5.....	23
ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ER $\beta$ และ ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง ซึ่งต่างก็สัมพันธ์กับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival) โดยทั้งสองปัจจัยนั้นเป็นตัวแปรที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน.....	26

## สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 กรอบความคิดแนววิจัย .....	4
รูปภาพที่ 2 แสดงที่มาของจำนวนประชากรที่ศึกษา.....	18
รูปภาพที่ 3 แสดงการแสดงออกของ ER $\beta$ ใน DLBCL (ภาพกลาง) โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกจะติดสีน้ำตาลตรงบริเวณนิวเคลียส Positive control (ภาพซ้าย) คือ granulosa cell ใน ovary negative control (ภาพขวา) คือ เนื้อเยื่อที่ไม่ได้ย้อม .....	19
รูปภาพที่ 4 แสดงการแสดงออกของ ER $\beta$ ที่หลากหลาย ใน DLBCL.....	20



## สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 แสดง ROC analysis ของ ER $\beta$ expression พบว่ามี area under the curve ที่ร้อยละ 82.7 (P = 0.001) พบว่าการแสดงออกที่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5 นั้นสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีที่ค่าความไวร้อยละ 78 และค่าความจำเพาะร้อยละ 78 .....	21
แผนภูมิที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ER $\beta$ กับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival).....	24
แผนภูมิที่ 3 แสดง ความสัมพันธ์ระหว่าง ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง(High IPI) กับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival).....	25
แผนภูมิที่ 4 แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ER $\beta$ และดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคกับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival).....	25

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง ชนิด non-Hodgkin lymphoma (NHL) นั้นเป็นโรคมะเร็งที่พบได้ทั่วโลก และมีแนวโน้มว่าจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในประเทศสหรัฐอเมริกา อุบัติการณ์จาก 11.1 รายต่อประชากร 100,000 คน เมื่อปี ค.ศ.1975 สูงขึ้นเป็น 19.5 รายต่อประชากร 100,000 คน ในปี ค.ศ.2005 และคาดการณ์ว่าจะมีผู้ป่วย NHL รายใหม่จำนวนมากกว่า 60,000 ราย ในช่วงทศวรรษนี้ ในประเทศไทยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองเป็นมะเร็งทางโลหิตวิทยาที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทยและติดอันดับ 1 ใน 5 ของมะเร็งที่พบบ่อยในคนไทย โดยคาดว่าน่าจะมีผู้ป่วยใหม่ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองปีละกว่า 1,000 ราย พยาธิกำเนิดของโรคนี้อาจไม่ทราบแน่ชัด และโรค NHL นั้นยังแบ่งแยกออกเป็นชนิดย่อย ที่ซับซ้อนและมีลักษณะแตกต่างกันตั้งแต่ follicular lymphoma (FL) ซึ่งโรคมักดำเนินช้า จนถึง diffuse large-B-cell lymphoma (DLBCL) ที่มีการดำเนินโรครวดเร็วและรุนแรง

เมื่อเปรียบเทียบอุบัติการณ์ของโรคระหว่าง เพศชายและเพศหญิง พบว่าโดยรวมแล้วเพศหญิง มีอุบัติการณ์ของโรค NHL ต่ำกว่า ราวร้อยละ 30 อย่างไรก็ตามพบว่าความแตกต่างนี้ในกลุ่มชนิดย่อยของ NHL ไม่เหมือนกัน เพศหญิงมีอุบัติการณ์ของ DLBCL ต่ำกว่า แต่ในกรณีของ FL พบว่าเพศชายและเพศหญิงมีอุบัติการณ์ของโรคไม่ต่างกัน<sup>(1)</sup> ดังนั้นฮอร์โมนเอสโตรเจนและฮอร์โมนอื่นที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ อาจช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรค NHL ในบางกลุ่มย่อย เช่น DLBCL ในเพศหญิง

ฮอร์โมนเพศมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันผ่านกลไกต่างๆหลายช่องทาง<sup>(2)</sup> ได้แก่ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน การปล่อยสารไซโตไคน์ การเพิ่มจำนวน (Proliferation) และพัฒนา (Differentiation) ของบีเซลล์ รวมไปถึงขั้นตอนต่างๆของการเกิดมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Lymphomagenesis)<sup>(3-7)</sup> การได้รับสัมผัสต่อฮอร์โมนระบบสืบพันธุ์ในผู้หญิงนั้น หมายรวมถึงตั้งแต่การมีระดู การตั้งครรภ์ การได้รับฮอร์โมนจากภายนอก เช่น การรับประทานยาคุมกำเนิดและการได้รับฮอร์โมนทดแทนหลังหมดประจำเดือน การศึกษาโดย Lee และคณะพบว่าจำนวนครั้งของการตั้งครรภ์นั้นสัมพันธ์กับความเสี่ยงที่ลดลงของการเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลือง ในขณะที่จำนวนครั้งของการคลอดบุตรลดความเสี่ยงต่อโรคนั้นพบแต่ในชนิด DLBCL<sup>(8)</sup>

ส่วนการรับประทานยาคุมกำเนิดนั้นมีทั้งข้อมูลที่สนับสนุนว่าช่วยลดความเสี่ยงของ NHL ทุกชนิด<sup>(8)</sup> ลดความเสี่ยงได้ถ้าเริ่มรับประทานก่อนอายุ 25 ปี<sup>(9)</sup> หรือลดความเสี่ยงแต่ใน DLBCL<sup>(10)</sup> และไม่ลดความเสี่ยงเลย<sup>(11)</sup> ทั้งนี้อาจมีผลมาจากความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนในยาเม็ดคุมกำเนิดที่ใช้กันและชนิดของมะเร็งต่อม้าน้ำเหลืองที่อยู่ในการศึกษาแต่ละการศึกษา นอกจากนี้การศึกษา 9 การศึกษาจาก Inter Lympho pooled analyses ยังพบว่า การรับประทานยาคุมกำเนิดเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด FL โดยเฉพาะถ้าได้รับหลังอายุ 21 ปี และระยะเวลาน้อยกว่า 5 ปี หรือหยุดมากกว่า 20 ปี ก่อนการวินิจฉัยมะเร็งต่อม้าน้ำเหลือง<sup>(2)</sup>

ส่วนการได้รับฮอร์โมนทดแทน Lu และคณะทำการศึกษาดูตามครุในมลรัฐแคลิฟอร์เนียที่ได้รับการผ่าตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง พบว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมนทดแทนมีความเสี่ยงต่อการเกิด NHL มากกว่ากลุ่มที่ได้รับถึง 3 เท่า<sup>(10)</sup> ข้อมูลจาก NIH-AARP cohort โดย Morton และคณะแสดงให้เห็นว่าการได้รับฮอร์โมนทดแทนในผู้หญิงที่ทำการผ่าตัดมดลูกจะลดความเสี่ยงของ DLBCL ลงถึงร้อยละ 50<sup>(11)</sup> ในทางตรงกันข้าม Teras และคณะกลับพบว่า ความเสี่ยงของการเกิด FL และ DLBCL นั้นสัมพันธ์กับการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนเดี่ยวๆ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ในการให้ฮอร์โมนแบบ combined therapy<sup>(12)</sup>

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นฮอร์โมนเอสโตรเจนจึงน่าจะมีบทบาทในพยาธิกำเนิดของโรค NHL การออกฤทธิ์ของฮอร์โมนนั้นต้องทำการจับกับตัวรับ (Estrogen receptor) โดยการแสดงออก (expression) ของ receptor นี้มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากรและพบว่าพันธุกรรมมีผลโดยตรง ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจมีผลต่อบทบาทของฮอร์โมนต่อการเกิดมะเร็งต่อม้าน้ำเหลืองแต่ละชนิด หรือต่อระหว่างกลุ่มประชากรต่างเชื้อชาติ ผลการศึกษาที่แตกต่างกันปัจจัยของฮอร์โมนกับมะเร็งต่อม้าน้ำเหลืองอาจเกี่ยวเนื่องมาจากชนิดและการแสดงออก ของ estrogen receptor ที่ปรากฏบนเซลล์มะเร็งนั่นเอง ซึ่งการทราบชนิดและผลจากการทำงานของ receptor เหล่านี้ อาจนำไปสู่การพัฒนาการรักษา NHL แนวทางใหม่ที่มีการตอบสนองดีขึ้นและผลข้างเคียงลดลง

การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาถึงการแสดงออก ของ Estrogen receptor ที่ปรากฏอยู่บนเซลล์มะเร็ง NHL ทั้งชนิด และอัตราส่วน พร้อมทั้งทำการเปรียบเทียบระหว่างเพศและกลุ่มที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่

## 1.2 คำถามของการวิจัย

### คำถาม(หลัก)

เซลล์ต่อม้าน้ำเหลืองของผู้ป่วยมะเร็งต่อม้าน้ำเหลืองชนิด DLBCL มีการแสดงออกของ Estrogen receptor beta หรือไม่

### คำถาม(รอง)

เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการแสดงออกของ Estrogen receptor beta ของกลุ่มที่มีการตอบสนองต่อการรักษาเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ต่อการรักษาหรือเสียชีวิต แตกต่างกันหรือไม่

### 1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

#### วัตถุประสงค์(หลัก)

ศึกษาอัตราส่วนของผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด DLBCL ที่แสดงออกของ Estrogen receptor beta ในเนื้อเยื่อ Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) ตั้งแต่ร้อยละ 1% ขึ้นไป โดยวิธี Immunohistochemistry

#### วัตถุประสงค์(รอง)

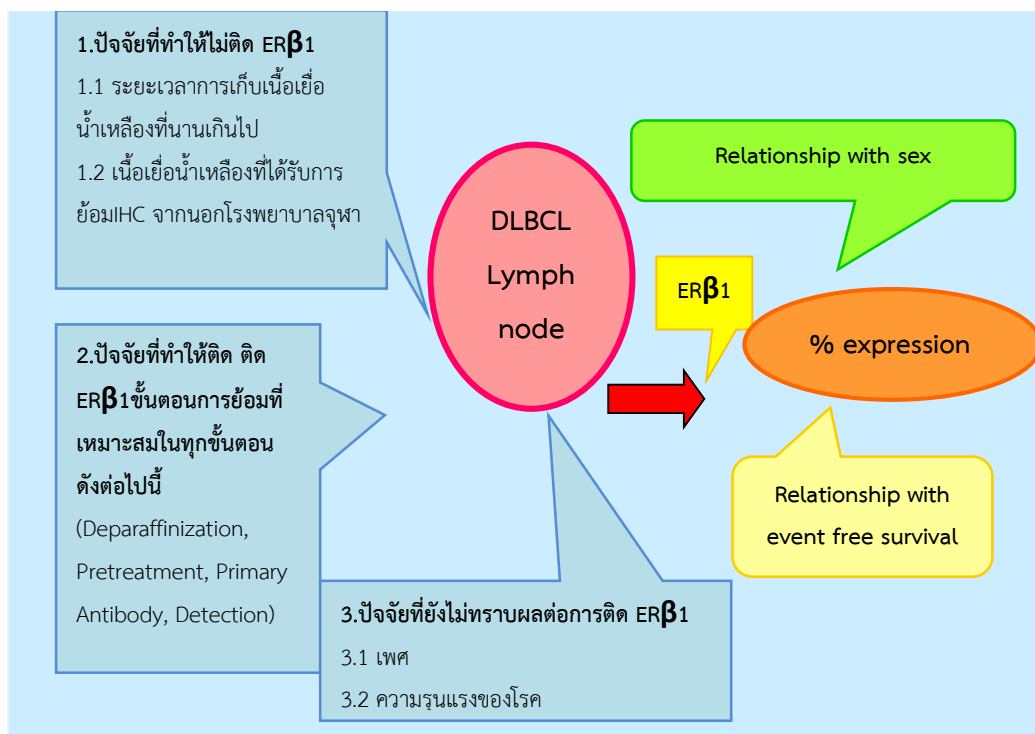
ดูความสัมพันธ์ของร้อยละการแสดงออกของ Estrogen receptor beta ในเซลล์ต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วย DLBCL กับระยะเวลาที่ปลอดเหตุการณ์ (Event free survival) ซึ่งแบ่งประชากรเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการตอบสนองต่อการรักษาเทียบกับกลุ่มที่ต่อการรักษาหรือเสียชีวิต โดยดูจากเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการแสดงออกของทั้งสองกลุ่มว่าแตกต่างกันหรือไม่

### 1.4 สมมติฐาน

เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองชนิด DLBCL มีการแสดงออกของโปรตีน Estrogen receptor beta

## 1.5 กรอบความคิดแนววิจัย

รูปภาพที่ 1 กรอบความคิดแนววิจัย



## 1.6 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย

Event free survival (EFS) หมายถึงระยะเวลาตั้งแต่สิ้นสุดการรักษามะเร็งจนผู้ป่วยเกิดโรคลุกลาม (Progressive disease) ในรายที่ไม่ได้ complete remission หรือโรคเป็นซ้ำ (ในรายที่ได้ remission) หรือ เสียชีวิต

Progressive disease (PD) หมายถึง มีเนื้องอกที่ตำแหน่งใหม่เกิดขึ้น หรือ เนื้องอกขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเกินร้อยละ 50 หรือมีการลุกลามในไขกระดูก

Complete remission (CR) หมายถึง ไม่มีอาการผิดปกติจากโรค ตรวจร่างกายปกติ ผลการตรวจเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ปกติ (ขนาดเนื้องอกน้อยกว่า 1 ซม. จาก CT scan) และ ผลการตรวจไขกระดูกปกติ

ร้อยละของเซลล์ที่แสดงออกของ Estrogen receptor beta ในเนื้อเยื่อ DLBCL หมายถึง จำนวนเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด DLBCL ที่ย้อมติดโปรตีน Estrogen receptor beta ต่อ

เซลล์มะเร็งทั้งหมด 500 เซลล์ (ไม่นับรวม lymphoid cell ปกติ) จากการนับด้วยพยาธิแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางโลหิตวิทยา (Hematopathologist)

การแสดงออกของ Estrogen receptor beta (Estrogen receptor beta expression) หมายถึง พบจำนวนเซลล์มะเร็งที่มีการแสดงออกของ Estrogen receptor beta ตั้งแต่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 1 ขึ้นไป ต่อจำนวนเซลล์มะเร็งทั้งหมด

ผู้ป่วยกลุ่มตอบสนองต่อการรักษา (good response) คือกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย R-CHOP 4-8 ครั้งตามปัจจัยเสี่ยงและระยะโรคแล้วมีผลตอบสนองการรักษาชนิด complete remission และไม่มีการกำเริบของโรคจนกระทั่งสิ้นสุดวันติดตามการรักษา

ผู้ป่วยกลุ่มไม่ตอบสนองต่อการรักษา (poor response) คือกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย R-CHOP 4-8 ครั้งตามปัจจัยเสี่ยงและระยะโรคแล้วมีการติดต่อการรักษา หรือ มีการกำเริบของโรค หรือเสียชีวิตจากตัวโรค (ไม่รวมการเสียชีวิตที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ)

Relapsed/refractory คือ การกลับเป็นซ้ำของโรค การติดต่อการรักษา หรือ มีผลตอบสนองต่อการรักษาน้อยกว่า Complete remission มีการกำเริบของโรค หรือเสียชีวิตจากตัวโรค ( ในกรณีนี้ผู้ป่วยยังอยู่ในช่วงของการรับยาเคมีบำบัดแล้วเสียชีวิตจากสาเหตุอื่นที่ไม่ใช่จากตัวโรค หรือภาวะแทรกซ้อนเช่นการติดเชื้อ จะถูกตัดออกจากการศึกษา โดยในการศึกษานี้มีจำนวน 2 ราย)

ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่ำ (Low IPI) คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มี IPI score ตั้งแต่ 0-2 ( Low and Low-intermediate risk ) ในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี และ กลุ่มผู้ป่วยที่มี aalPI score ตั้งแต่ 0-1 ( Low and Low-intermediate risk ) ในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 60 ปี

ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง (High IPI) คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มี IPI score ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป ( High-intermediate and High risk ) ในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี และกลุ่มผู้ป่วยที่มี aalPI score ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป ( High-intermediate and High risk ) ในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 60 ปี

## 1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1.7.1 ทราบอัตราความชุกของการแสดงออกของ Estrogen receptor ซึ่งแสดงในเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองของผู้ป่วย DLBCL

1.7.2 ทราบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ Estrogen receptor ในผู้ป่วย DLBCL สองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการตอบสนองต่อการรักษา กับกลุ่มที่ติดต่อการรักษาหรือเสียชีวิต โดยดูจากเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการแสดงออกของทั้งสองกลุ่มว่าแตกต่างกันหรือไม่ และ ความสัมพันธ์ของ



เปอร์เซ็นต์การแสดงผลของ Estrogen receptor กับ ระยะเวลาที่ปราศจากเหตุการณ์ (event free survival)

1.7.3 ทราบความสัมพันธ์ของการแสดงออกกับข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ได้แก่ อายุ และ International prognostic index (IPI) ของ DLBCL และสามารถบอกลักษณะการแสดงผลออกในเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองเชื่อมโยงกับอาการทางคลินิกเพื่อเป็นเกณฑ์ในการให้ความหมายของการแสดงออกต่อไป

1.7.4 เป็นข้อมูลการแสดงผลออกของเชื้อชาติไทยเนื่องจากการศึกษานี้ยังไม่มีใครทำมาก่อนในประเทศไทย

1.7.5 เพื่ออาจจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาบทบาทของ hormonal treatment ในอนาคต

## 1.8 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรฐานการแก้ไข

แม้ผู้ป่วยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด DLBCL ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มีจำนวนมากก็จริง แต่ผู้ป่วยส่วนน้อยเท่านั้นที่ได้รับการรักษาด้วย standard regimen (R-CHOP) ทำให้การรวบรวมขนาดตัวอย่างนั้นต้องเก็บย้อนหลังเป็นเวลาหลายปีเพื่อให้เพื่อให้ได้ครบตามจำนวนที่ต้องการ ซึ่งอาจทำให้มีผลต่อคุณภาพของชิ้นเนื้อต่อมน้ำเหลืองที่นำมาศึกษาได้

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### ฮอร์โมนเอสโตรเจน

ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการทำงานหลายอย่างในร่างกายไม่ว่าจะเป็นการเจริญเติบโต การพัฒนา การจำแนกของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ในผู้หญิงที่ยังไม่หมดประจำเดือน รังไข่เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจนแหล่งสำคัญ ฮอร์โมนที่สร้างส่วนใหญ่คือ 17 $\beta$ -Estradiol (E2) ซึ่งออกฤทธิ์มีผลเฉพาะที่และทั้งระบบอวัยวะและเซลล์ต่างๆ ส่วนผู้หญิงที่หมดระดูและผู้ชายนั้น E2 ถูกเปลี่ยนมาจากฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) และแอนโดรสติไดโอน (androstenedione) โดยเอนไซม์ cytochrome P450 aromatase นอกจาก E2 จะมีผลต่อเซลล์ปกติแล้ว ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรคมะเร็งด้วย<sup>(13)</sup>

ผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อเซลล์ต่างๆนั้นผ่านทาง estrogen receptors (ERs) ซึ่งมี 2 ชนิดด้วยกันคือ estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) และ estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) ทั้งคู่อยู่ใน nuclear receptor family E<sub>2</sub> จับกับ receptor ทั้งสองด้วยกันด้วย affinity พอๆ กัน<sup>(14)</sup> ERs นั้นประกอบด้วย 3 ส่วนคือ NH<sub>2</sub>-terminal domain (NTD), DNA-binding domain (DBD) และ COOH-terminal หรือ ligand binding domain (LBD)<sup>(15)</sup> ส่วน NTD นั้นล้อมรอบ ligand-independent activation (AF1) ของเป้าหมาย ซึ่งบริเวณ AF1 นี้ รับผิดชอบต่อการนำเข้ามาของ co-regulatory proteins พบว่า AF1 ใน ER $\alpha$  นั้นทำงานอย่างมาก ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน แต่สำหรับ ER $\beta$  แล้วการทำงานของ AF1 กลับต่ำมาก<sup>(16)</sup> ส่วนของ DBD นั้น ทั้งใน ER $\beta$  จะจับกับ ลำดับเบสที่จำเพาะของยีนเป้าหมาย ซึ่งเรียกว่า estrogen-responsive elements (EREs) ส่วนสุดท้ายคือ LBDs ของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  พบว่า ร้อยละ 59 มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกันและส่วนของ ligand-binding pockets ของทั้งคู่มีความแตกต่างทางโครงสร้างน้อยมาก<sup>(17)</sup> แต่ความแตกต่างเล็กน้อยนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการเลือกจับกับ ligand ซึ่งเลือกแสดง affinity และ activity ผ่าน ER $\alpha$  และ ER $\beta$ <sup>(18)</sup> ตัว ligand ที่เลือกจับกับ ERs แบบจำเพาะนี้ นำมาใช้บ่งชี้การทำงานที่จำเพาะของ ERs ทั้งสองและยีนเป้าหมายเฉพาะของแต่ละตัว เช่น Propyl pyrazoletriol (PPT) เป็นสาร ER $\alpha$  selective agonist มีความจำเพาะในการจับกับ ER $\alpha$  มากกว่า ER $\beta$  ถึง 410 เท่า<sup>(19)</sup> นอกจากนี้ยังมีการสังเคราะห์ ER $\beta$  agonists หลายตัว หนึ่งในนั้นคือ 2, 3 bis (4-hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN) ซึ่งมีสมรรถนะและความแรงในจับกับ ER $\beta$  มากกว่า ER $\alpha$  70-300 เท่า<sup>(20)</sup> โดยทั่วไปแล้วสาร ER $\beta$  agonists แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ER $\beta$  binders คือส่วนที่

selective ER $\beta$  agonists ไปจับอย่างแน่นหนากว่า ER $\alpha$  ในขณะที่ ER $\beta$  activators จะจับทั้ง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  เหมือนๆกันแต่จะกระตุ้นเฉพาะ ER $\beta$  เท่านั้น ซึ่งบ่งบอกถึง co-activators ต่อ ERs ที่แตกต่างกัน ส่วนสาร DPN นั้นเป็น ER $\beta$  binders/activators คือ จับกับ ER $\beta$  อย่างแน่นหนา มากกว่าและมีคุณสมบัติในการกระตุ้น ER $\beta$  แรงกว่า ER $\alpha$  ด้วย การศึกษาพบว่ายีนส่วนใหญ่ถูกควบคุมการทำงานด้วย ER $\beta$  agonists ทั้ง 3 กลุ่มไม่แตกต่างกัน แต่จะมียีน บางยีนที่ ER $\beta$  agonist แต่ละกลุ่ม มีผลในการควบคุมยีนแตกต่างกันไป ส่วน LBD นั้น มี activation domain (AD2) อยู่ด้วยซึ่งการทำงานส่วนนี้เป็น ligand-dependent ซึ่งแตกต่างจาก AF1 เมื่อ agonist ligand จับกับ AF2 domain จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนอกจากนี้ยังเกิดการจับกันของ ER $\alpha$  เป็น homodimers (ER $\alpha$ : ER $\alpha$  หรือ ER $\beta$ : ER $\beta$ ) หรือ heterodimers (ER $\alpha$ : ER $\beta$ ) และไปจับกับ EREs ของยีนเป้าหมาย (15, 21) หลังจาก ERs จับกับ EREs แล้วจะมี recruitment ของ co-regulatory และ chromatin remodeling proteins แล้ว ERs จะควบคุมการแสดงออกของยีนนั้น (14, 22) นอกจากนี้ ERs อาจปรับเปลี่ยนการแสดงออกของยีนหลังจากจับกับ ERs บน DNA โดยการจับ DNA-binding transcription factors เช่น NF- $\kappa$ B, specificity protein 1 (Sp1), activator protein1(AP1) และ p53 เป็นต้น ซึ่งอาจมีผลกระตุ้นหรือกดการแสดงออกของยีน (22) การศึกษาหลายการศึกษาไม่มานี้ แสดงให้เห็น multiple binding sites บนจีโนมของมนุษย์และตำแหน่งเหล่านี้จำนวนมาก อยู่บน intron หรือ อยู่ไกลจากตำแหน่งเริ่มต้นของการถอดรหัสซึ่งบ่งถึงกลไกการควบคุมการถอดรหัสจากตำแหน่งที่ห่างออกไป (23-25)

ยิ่งกว่านั้น ligand ยังสามารถกระตุ้น ER signaling ผ่าน non-genomic mechanism โดยการจับกับ membrane-associated ERs มีผลทำให้เซลล์ตอบสนองอย่างรวดเร็ว (26) นอกจากนี้ ERs ยังสามารถควบคุมการถอดรหัสของยีนเป้าหมายโดยไม่ต้องอาศัย ligand ได้ด้วย โดยทั้ง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  เป็นเป้าหมายของ post-translational modification ซึ่งอาจทำให้ ER-mediated gene transcription เพิ่มขึ้นหรือลดลง (27) ตัวอย่างเช่น growth factor receptors อาจกระตุ้น ERs โดยขบวนการ phosphorylation (28) หรือ ER $\alpha$  สามารถกระตุ้น insulin-like growth factor 1 receptors signaling pathway (29) การทดลองในหนูแสดงให้เห็น transcriptional responses ที่แตกต่างกันของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  (30) และยังมีการศึกษาในหลอดทดลอง โดยใช้เซลล์ที่มี ERs ทั้ง 2 ชนิด และใส่ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  selective agonist ลงไปหรือ nonselective E<sub>2</sub> แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของเซลล์แตกต่างกันไป ตาม ligand แต่ละชนิด (31) ผลการศึกษาต่างๆข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ERs มีบทบาทควบคุมการทำงานของยีนต่างๆได้อย่างกว้างขวางทั้งยีนทั่วไปและที่เป็น ER subtype-specific genes

ER $\alpha$  นั้นส่วนใหญ่ปรากฏบนเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ คือมดลูกและรังไข่ เต้านม ไต กระจกเนื้อเยื่อไขมันขาว และตับ ในขณะที่ ER $\beta$  พบในรังไข่ ระบบประสาท ระบบหัวใจและหลอดเลือด

ปอด อวัยวะสืบพันธุ์เพศชาย ต่อมลูกหมาก ลำไส้ใหญ่ ไต และระบบภูมิคุ้มกัน<sup>(32, 33)</sup> นอกจากนี้ wild-type full-length ERs แล้ว ERs ยังมี isoforms ต่างๆจากผลของ alternative splicing ซึ่ง splice variants เหล่านี้พบได้ในเซลล์ปกติ เซลล์มะเร็งหลายชนิด<sup>(22)</sup> ตัวอย่างเช่น ER $\alpha$  mRNA variants พบในเซลล์มะเร็งเต้านม<sup>(34, 35)</sup> มะเร็งเยื่อบุหลอด<sup>(36)</sup> มะเร็งรังไข่<sup>(37)</sup> และมะเร็งลำไส้ใหญ่<sup>(38)</sup> ส่วน splice variants ของ ER $\beta$  นั้นพบในเซลล์มะเร็งเต้านม<sup>(34)</sup> มะเร็งเยื่อบุหลอด<sup>(39, 40)</sup> และมะเร็งต่อมไทรอยด์<sup>(41)</sup> ส่วนใหญ่ของ splice variants นั้นไม่จับกับ ER ligand แต่มีผลเปลี่ยน transcriptional activity ของ wild-type receptors<sup>(42, 43)</sup> ทั้ง wild-type ERS ของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ซึ่งพบในเซลล์ลิมโฟด์ปกติ<sup>(44)</sup>

ผลของ ERs ต่อการเติบโตแบ่งตัว (Proliferation) และการตาย (Apoptosis) ของเซลล์

ER $\alpha$  และ ER $\beta$  นั้นพบว่ามีผลตรงข้ามกันต่อขบวนการเจริญเติบโตแบ่งตัวและการตายของเซลล์ เมื่อฮอร์โมนเอสโตรเจนจับกับ ER $\alpha$  จะกระตุ้นการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์เต้านม หลอด และต่อมลูกหมาก ดังนั้นจึงเพิ่มความเสี่ยงของการเติบโตของเซลล์มะเร็ง<sup>(45, 46)</sup> ในทางตรงกันข้ามผลการทดลองใน ER $\beta$  knock-out mice พบว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนเมื่อจับกับ ER $\beta$  จะกวดการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ต่อมลูกหมาก เต้านม ลำไส้ใหญ่ ปอด และเซลล์ต้นกำเนิดในไขกระดูก (stem cells) หนูที่เป็น ER $\beta$  knock-out mice จะมีต่อมลูกหมากโตและเป็นโรค myeloproliferative neoplasm ที่มีอาการคล้ายคลึง chronic myeloid leukemia with lymphoid blast crisis ที่พบในคน<sup>(47)</sup> และการศึกษาที่เป็น trisection studies ในเซลล์มะเร็งเต้านมและลำไส้ใหญ่ที่ไม่มี ER $\beta$  ในเซลล์ เพื่อให้เซลล์มี ER $\beta$  พบว่ากระบวนการเติบโตแบ่งตัวของเซลล์จะลดลง ซึ่งเห็นผลทั้งจากการศึกษาแบบ cell culture และ *in vivo* xenograft experiments<sup>(48-50)</sup>ที่น่าสนใจยิ่งกว่านั้นคือพบว่าการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งนั้นไม่ขึ้นกับฮอร์โมน (hormone-independent pathway) บ่งชี้ว่า ER $\beta$  เป็น tumor suppressor<sup>(48, 49)</sup> ซึ่งผ่านกลไกใดยังไม่ทราบแน่ชัด

ในแง่ของกระบวนการ apoptosis พบว่า E<sub>2</sub> ยับยั้งการเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง Jurkat T lymphoma โดยการชักนำให้เกิดการ apoptosis<sup>(51)</sup> แต่ E<sub>2</sub> มีผล anti-apoptotic ต่อเซลล์ที่ลิ้มโฟซัยท์ และโมนอซัยท์ ในหลอดทดลองและเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ<sup>(52, 53)</sup> การศึกษาหลายการศึกษา ยังแสดงให้เห็นว่า E<sub>2</sub> อาจควบคุม apoptosis pathways ในเซลล์มะเร็งด้วย นอกเหนือจากการมีผลต่อเซลล์ปกติ ตัวอย่าง เช่น E<sub>2</sub> ทำให้ anti-apoptotic Bcl-2 gene ในเซลล์ ovarian surface epithelium<sup>(54)</sup> ซึ่งเป็นผลผ่านทาง ER $\alpha$  ส่วน ER $\beta$  กลับเพิ่ม FasL ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein ligand และยังมีรายงานผล pro-apoptosis ของ ER $\beta$  ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากและรังไข่ด้วย<sup>(45, 55)</sup>

) การศึกษาโดยการใช้ selective ER $\beta$  agonist DPN พบว่าสามารถเพิ่ม apoptosis ของเซลล์มะเร็ง

ในหนูทดลองที่เป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองได้ด้วย<sup>(56)</sup> ข้อมูลต่างๆเหล่านี้ช่วยสนับสนุนว่าโดยทั่วไปแล้ว ER $\beta$  มีผล pro-apoptosis ขณะที่ ER $\alpha$  มีผล anti-apoptosis ทั้งนี้การตอบสนองขึ้นกับชนิดของเซลล์และการปรากฏของชนิดของ ER

การปรากฏของชนิดของ ERs บนเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันและบทบาทหน้าที่ ERs ในเซลล์ลิมโฟไซต์

ช่วงระยะไม่นานมานี้ได้มีความก้าวหน้าการศึกษาเพื่อดูระดับการแสดงออกของ ERs ในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันซึ่งพบว่า ER $\alpha$  และ ER $\beta$  mRNA และโปรตีนมีการแสดงออกใน peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) และเซลล์นิวโทรฟิล<sup>(44)</sup> อย่างไรก็ตามการปรากฏของ ERs ทั้ง 2 มีความแตกต่างกันในเซลล์แต่ละชนิด คือ CD4+T cells มีการแสดงออก ER $\alpha$  mRNA ระดับสูง ขณะที่ใน B cells กลับพบระดับ ER $\beta$  mRNA สูงกว่า ER $\alpha$  mRNA<sup>(57)</sup> ส่วน CD8+T cells พบ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  mRNA ในระดับต่ำทั้งคู่<sup>(65)</sup> ถ้าดูที่ระดับโปรตีน พบว่า ER $\beta$  ปรากฏเด่นชัดกว่าในเม็ดเลือดขาวที่เติบโตเต็มที่ จาก peripheral blood ต่อมนอนซิล หรือม้ามของคนปกติ<sup>(58)</sup> และในสายของ B cells มีการแสดงออกของ ER $\beta$  mRNA มากกว่า ER $\alpha$  mRNA โรค chronic lymphocytic leukemia (CLL) โรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง Hodgkin lymphoma, Burkitt lymphoma และโรค multiple myeloma มีการแสดงออก ER $\beta$  โปรตีนอย่างมาก ขณะที่ระดับ ER $\alpha$  โปรตีนต่ำมาก หรือตรวจไม่พบเลย<sup>(56, 57, 59)</sup> นอกจากนี้ทั้ง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  โปรตีนยังพบใน NK cells ด้วย<sup>(58)</sup>

ผลของฮอร์โมน E<sub>2</sub> ต่อ lymphoid cell

ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันทั้ง innate และ adaptive system ยิ่งกว่านั้นพบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลต่อทั้งต่อมไทมัส และไขกระดูก<sup>(60, 61)</sup> โดยมีผลกดการสร้างบีและทีเซลล์ (B and T lymphopoiesis) หนูที่ได้รับ E<sub>2</sub> จะมีการสร้างเซลล์บีลิมโฟไซต์ที่ไขกระดูกลดลง<sup>(61)</sup> ขณะที่หนูที่โดนตัดรังไข่ออกจะมีการสร้างเซลล์บีลิมโฟไซต์เพิ่มขึ้น<sup>(62)</sup> และยังพบว่า E<sub>2</sub> สามารถเปลี่ยนแปลงขบวนการเติบโตของบีเซลล์ด้วย<sup>(63)</sup> ส่วนผลของ E<sub>2</sub> ต่อทีเซลล์ พบว่า E<sub>2</sub> ทำให้เกิด thymic involution<sup>(60)</sup> และลดการเปลี่ยนแปลงของ thymic CD4/CD8 phenotypic profile ซึ่งบ่งถึงบทบาทอันสำคัญของ ER $\alpha$  ใน estrogen-induced thymic atrophy<sup>(64)</sup> นอกจากนี้ E<sub>2</sub> ยังยับยั้ง T cell-dependent immune reactions จากการศึกษาพบว่า การให้ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) สามารถกดกระบวนการตอบสนองของแอนติบอดีในหนูทดลองได้<sup>(65)</sup> ขณะที่ทำให้การสร้างแอนติบอดีจากบีเซลล์เพิ่มขึ้น<sup>(66)</sup> ผลของ E<sub>2</sub> ต่อการตอบสนองของทีเซลล์นั้นอธิบายได้จากการพบ ER $\alpha$  ใน CD4+CD25 T cells และ E<sub>2</sub> ในระดับปกติจะทำให้มีการปรากฏของ Foxp3 เพิ่มขึ้น และเปลี่ยน CD4+CD25 ไปเป็น regulatory CD4+CD25+T cells<sup>(67)</sup> นอกจากนี้ E<sub>2</sub> จะ

ยับยั้งการสร้างที่เซลล์แล้ว ยังพบว่า E2 มีผลต่อการตอบสนองของ T helper cells ทั้ง Th1 และ Th2 ด้วยโดยเอสโตรเจนยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ของ Th1 เช่น IL-12, TNF- $\alpha$  และ TFN-2 เป็นต้น แต่กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์จาก Th2 ที่มีผลด้านการอักเสบ ได้แก่ IL-10, IL-4 และ TGF-B<sup>(68)</sup> สรุปว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อเซลล์ภูมิคุ้มกัน ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการเกิดโรคของระบบภูมิคุ้มกันที่เป็น gender-related diseases

ผลของ ERs และ E2 ต่อ myeloid cells

เซลล์กลุ่ม myeloid ได้แก่ เซลล์โมโนไซต์ เซลล์แมคโครฟาจ และเซลล์เดนดริติก นั้นพบว่ามี ERs ทั้ง E<sub>2</sub> และ ER $\beta$  โดยเซลล์โมโนไซต์มี ER $\beta$  มากกว่า ขณะที่เซลล์แมคโครฟาจพบ ER $\alpha$  มากกว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลในการปรับเปลี่ยนขบวนการของเซลล์ตั้งแต่ maturation, differentiation และ migration<sup>(69)</sup> และ E2 ยังมีผลทำให้การเก็บกิน phagocytic activity ของเซลล์นิวโทรฟิลและเซลล์อื่นดีขึ้นด้วย ซึ่งข้อมูลนี้อาจเป็นคำอธิบายความแตกต่างของ innate immune reactivity ระหว่างเพศชายและเพศหญิง<sup>(70)</sup> ส่วนเซลล์เดนดริติกนั้น E2 ส่งเสริมการ differentiation ของเซลล์ไซโตทูค และยังเพิ่มการแสดงออกของ MHC class II บนผิวเซลล์ทำให้เซลล์ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนได้ดี<sup>(71, 72)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าการ differentiation ของเซลล์เดนดริติก จะถูกยับยั้งใน ER $\alpha$  knock-out bone marrow cell<sup>(73)</sup> และ ER $\alpha$  นั้นจำเป็นสำหรับการผลิต IFN $\alpha$  จาก plasmacytoid dendritic cells ที่ดำเนินการผ่าน T cell-like receptor<sup>(74)</sup> การแสดงออกของ ERs ในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การปรากฏของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันแต่ละชนิด<sup>(57, 58)</sup>

Immune cell type	Expression of E	Expression of	References
CD4 <sup>+</sup> T cells	+,high (mRNA)	+/-, low (mRNA)	Phiel et al.(2005)
CD8 <sup>+</sup> T cells	+, low (mRNA)	+, low (mRNA)	Phiel et al.(2005)
B cells	+/-, low (mRNA)	+,high (mRNA)	Phiel et al.(2005)
NK cells	+/-, low (mRNA)	+ (mRNA)	Henderson et al.(2003)
	+ (protein)	+ (protein)	Curran et al.(2001)
Monocytes	+ (mRNA)	+ (mRNA)	Komi and Lassila.2000
	- (protein)	+ (protein)	Mor et al.(2003)
Macrophages	+ (protein)	- (protein)	Mor et al.(2003)
Dendritic cells	+ (protein)	+ (protein)	Mao et al.(2005)

### ERs ใน lymphoid malignancies

ความแตกต่างของเพศและ lymphoid malignancies มะเร็งหลายชนิดพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับ E<sub>2</sub> โดยเฉพาะมะเร็งเต้านมและมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก ส่วนมะเร็งทางระบบโลหิตนั้น แม้ว่าทั่วไปจะไม่จัดอยู่ในกลุ่ม hormone-dependent cancer ก็ตาม แต่สำหรับ lymphoid malignancies นั้น ฮอโมนเอสโตรเจนน่าจะมีความสำคัญ ทั้งนี้จากผลการศึกษาด้านระบาดวิทยา ซึ่งแสดงให้เห็นความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ทั้งในแง่อุบัติการณ์และพยากรณ์โรคของผู้ป่วย เพศชาย และเพศหญิง<sup>(75, 76)</sup> ความสัมพันธ์ของ reproductive hormonal factors และ การรับประทานยาคุมกำเนิด กับการลดลงของความเสี่ยงในการเกิดโรค NHL ถึงร้อยละ 50<sup>(8, 15)</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ชายมีอุบัติการณ์ของการเกิดโรค acute lymphoblastic leukemia (ALL) และ chronic lymphocytic leukemia (CLL) มากกว่าผู้หญิงถึง 2 เท่า<sup>(75, 76)</sup> อัตราอุบัติการณ์ของโรค Burkitt lymphoma และ mantle cell lymphoma ในเพศชายต่อเพศหญิง 3:1<sup>(76)</sup> ในส่วนของ มะเร็ง T-cell พบว่าอัตราการเกิดโรคชายต่อหญิงในประชากรผิวขาวอยู่ที่ 1.8-2.0<sup>(76)</sup> และการทดลอง ในหนูที่เป็น T cell lymphoma ยังแสดงให้เห็นว่า หนูเพศชาย มีขนาดก้อนมะเร็งใหญ่กว่าเพศหญิง ซึ่งถ้านำหนูเพศหญิงไปตัดรังไข่การเติบโตของมะเร็งจะเพิ่มขึ้น ไม่ต่างจากหนูเพศชาย ซึ่งแสดงให้เห็น ถึงผลของฮอโมนเอสโตรเจนต่อการควบคุมโรคมะเร็ง<sup>(56)</sup>

### บทบาทของ ERs ใน lymphoid malignancies

Yakimchuck และคณะได้ทำการศึกษาพบว่า ER $\beta$  expression ใน Burkitt lymphoma cell lines<sup>(56)</sup> และ PBMCs จากผู้ป่วย CLL<sup>(77)</sup> ซึ่งบ่งชี้ว่า ER $\beta$  agonists อาจมีผลต่อทั้งเซลล์

lymphoma และ leukemia นอกจากนี้ในผู้ป่วย CLL ยังพบว่าการแสดงออกของ ER $\beta$  splice variant ER $\beta_2$  เพิ่มขึ้นด้วย<sup>(77)</sup>

ความสำคัญทางคลินิกของ ER $\beta_2$  นั้นยังไม่ทราบแน่นอน แต่มักบ่งชี้ถึงผลลัพธ์ที่ไม่ดีของโรค เช่น โรคมะเร็งต่อมลูกหมาก<sup>(78)</sup> เป็นต้น และในเต้านมปกติจะพบ ER $\beta_2$  ระดับต่ำ แต่จำนวนจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนใน invasive mammary carcinoma ส่วนในผู้ป่วย CLL ที่พบ ER $\beta_2$  ไม่ว่าจะที่ซัยโตพลาสซึมหรือ นิวเคลียสและซัยโตพลาสซึม พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตด้อยกว่ากลุ่มที่พบแต่บริเวณ นิวเคลียส<sup>(78-80)</sup>

ความสำคัญของ ERs บริเวณผิวเซลล์ ต่อขบวนการ differentiation ของ hematopoietic cell นั้นพบใน myeloblastic leukemia HL-60 cell<sup>(81)</sup> ซึ่งพบว่ามี ER $\alpha$  ทำให้ยับยั้ง terminal differentiation ของเซลล์มะเร็งนี้ โดย non-internalizable E2 ผลการศึกษาบ่งชี้ว่า E2 บริเวณผิวเซลล์ อาจควบคุมไม่ให้เกิดการ differentiation ของเซลล์ myeloblasts ในอีกด้านหนึ่ง พบว่า ER $\beta$  knock-out mice จะเกิดโรค myeloliferative disease เกิด lymphoid proliferation และต่อมลูกหมากโต<sup>(54)</sup> ซึ่งผลนี้บ่งชี้ว่า ER $\beta$  อาจเกิดการเติบโตเพิ่มจำนวนของ myeloid cell และทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ในกลุ่มโรคมะเร็งโลหิต

บทบาทของ ER $\beta$  agonists ในฐานะยาต้านมะเร็ง

การพบ ER $\beta$  expression ใน lymphoid cells และบทบาทในแง่ anti-proliferative ของ ER $\beta$  สนับสนุนว่าการรักษาโดยใช้ selective ER $\beta$  agonists อาจเป็นแนวทางการรักษาใหม่ ปัจจุบันมีการผลิต ER $\beta$  selective agonists หลายชนิดและเมื่อเร็วๆ นี้ มีการทดลองใช้ selective ER $\beta$  lymphoma-dependent anti-proliferative และ pro-apoptotic effect ในหนูทดลองและเซลล์ lymphoma ของคน ที่มีการปรากฏของ endogenous ER $\beta$  ซึ่งพบว่า ER $\beta$  agonists DDN และ KB9520 สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ<sup>(64)</sup> ทั้งยังมีการศึกษา ใน B cell lymphoid malignancy คือ Burkitt lymphoma ในหนูซึ่งพบว่าเมื่อฉีด ER $\beta$  agonists เข้าไปแล้วขนาดก้อนมะเร็งโตช้ากว่ากลุ่มที่ไม่ได้ให้อย่างชัดเจน<sup>(8)</sup> นอกจากนี้การให้ selective ER $\alpha$  agonist PPT ไม่มีผลต่อการโตของมะเร็งต่อมน้ำเหลือง<sup>(56)</sup> ผลการศึกษาข้างต้นบ่งชี้ว่า highly selective ER $\beta$  selective agonists อาจจะเป็นการรักษาที่มีประสิทธิภาพดีในโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองจากข้อมูลเบื้องต้นทั้งหมดจึงเป็นที่มางานวิจัยนี้ที่ต้องการศึกษา ERs ที่ปรากฏในโรค NHL ทั้งในแง่ชนิดและปริมาณ ซึ่งเป็นการศึกษาที่ไม่เคยมีมาก่อนในประชากรไทย พร้อมทั้งทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาที่มีในปัจจุบัน และกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

การวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive study) เป็น observational case control study

#### 3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (Target Population) คือ เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง (Lymph node) ของผู้ป่วย DLBCL ที่เคยได้รับการวินิจฉัยและรักษาแล้วใน โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ โดยนำเนื้อเยื่อดังกล่าวมาตรวจเพิ่มเติม

##### เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยมีอายุอยู่ในช่วง 18-80 ปี
2. ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัย DLBCL เป็นครั้งแรก จากผลชิ้นเนื้อต่อมน้ำเหลือง ตาม criteria ของ World Health Organization (WHO) ในปี 2008
3. เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองได้รับการตรวจทาง Immunohistochemistry ใน โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์
4. ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดสูตร R-CHOP และ ตรวจติดตามอย่างน้อย 3 ปี หรือ เสียชีวิตก่อน 3 ปี (เพื่อให้สามารถประเมิน EFS ได้)

##### เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

1. เป็น DLBCL ที่กลาย (transformation) มาจากมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดอื่น
2. มีโรคมะเร็งชนิดอื่น ๆ ร่วมด้วย
3. ผู้ป่วยเคยได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมาก่อน

#### 3.3 ขนาดตัวอย่าง

##### ในคำถามการวิจัยแรก (primary research question)

เนื่องจากการศึกษาที่ไม่เคยมีมาก่อนและเป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของสองกลุ่ม จึงใช้สูตรคำนวณหาขนาดตัวอย่างดังนี้

$$n = Z^2 pq / e^2$$

โดยที่ n = sample size

Z = ค่า Z score ของ Normal distribution

e = ความคาดเคลื่อนในการประมาณค่าด้วย X ซึ่งในที่นี้กำหนดให้ค่าความคาดเคลื่อนที่ 10% e จึงเท่ากับ 0.1

p = สัดส่วนของประชากรที่จะทำการศึกษา ซึ่งในการศึกษานี้

P = 1 จาก pilot study ที่ทำ

การศึกษาเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองในผู้ป่วย DLBCL จำนวน 5 รายพบว่ามี การแสดงออกของ Estrogen receptor beta จำนวน 5 ราย

$$q = 1 - p$$

จากการแทนค่าในสูตร ได้ n = 0 ราย เนื่องจากเป็น one sample proportion ดังนั้นจึงใช้ประชากรที่สามารถเก็บรวบรวมได้ทั้งหมด และตอบคำถามการวิจัยแรกได้ว่า ร้อยละของการแสดงออกของ ERβ นั้นมีการแสดงออกร้อยเปอร์เซ็นต์

คำถามการวิจัยรอง( secondary research question)

คำนวณ sample size จากค่า mean difference ระหว่างกลุ่มโดยใช้สูตร (Testing two independent mean)

$$n_1 = \frac{(z_{1-\frac{\alpha}{2}} + z_{1-\beta})^2 \left[ \sigma_1^2 + \frac{\sigma_2^2}{r} \right]}{\Delta^2}$$

$$r = \frac{n_2}{n_1}, \Delta = \mu_1 - \mu_2$$

โดยที่ n = sample size

Z1 = ค่า Z score ของ Normal distribution

$\alpha = 0.05$  จะได้  $z_{1-\alpha/2} = Z_{0.975} = 1.96$

$\beta = 0.8$  จะได้  $z_{1-\beta/2} = Z_{0.2} = 0.84$

$\sigma_1$  = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของประชากรในกลุ่มไม่ตอบสนอง (=24.6)

$\sigma_2$  = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของประชากรในกลุ่มตอบสนอง (=15.3)

$\mu_1$  = ค่าเฉลี่ยของประชากรในกลุ่มไม่ตอบสนอง( = 38.1)

$\mu_2$  = ค่าเฉลี่ยของประชากรในกลุ่มตอบสนอง( = 12.8)

จากการแทนค่าในสูตร ได้ n= 10 ราย

จากการศึกษาพบว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการแสดงออกที่ชัดเจนระหว่างกลุ่ม  
ตอบสนองกับไม่ตอบสนองการรักษาจากประชากรทั้ง 36 รายที่ power ร้อยละ 94.9 จึงคิดย้อนกลับ  
เพื่อหาจำนวนประชากรที่เหมาะสม

### 3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย

1. สืบค้นผู้ป่วยตามรหัสโรค (C833) ที่มีอายุ 18-80 ปี และมีเงื่อนไขดังข้อกำหนด
2. โดยเลือกผู้ป่วยเรียงตามรหัสของผู้ป่วย
3. คั้น tissue เมื่อแรกวินิจฉัยที่เหลืออยู่ของผู้ป่วย เมื่อได้ tissue ที่ต้องการแล้วจึง

ดำเนินการย้อม ER $\beta$ 1

4. กระบวนการย้อม (immunohistochemistry) ประกอบด้วย

- 1.) ตัดชิ้นเนื้อหนา 2 ไมโครเมตร
- 2.) การกู้คืนคุณภาพของโปรตีน(De-paraffinization และ antigen retrieval)  
ด้วย target retrieval solution ที่ high pH ด้วยเครื่อง DAKO PT LINK
- 3.) ย้อม primary antibody ด้วย Genetex mouse monoclonal antibody to  
estrogen receptor beta clone PPG5/10 dilution 1:40 ย้อมด้วยเครื่อง  
Autostain Link 48 (DAKO) โดยเปรียบเทียบกับ positive control จาก ovary  
ซึ่งมีการแสดงออกของER $\beta$  ที่ granulosa cell 4.) Secondary antibody ด้วย  
DAKO Envision DAB detection

5. ประเมินการแสดงออกของ ER $\beta$  ใช้วิธี การนับโดยพยาธิที่มีความเชี่ยวชาญทาง  
โลหิตวิทยาจำนวน 1 ท่าน (manual count method) จากการแสดงออกของเซลล์มะเร็งจำนวน  
500 เซลล์ แม้ว่าพบความสัมพันธ์กันระหว่างวิธีการนับเองกับการใช้โปรแกรมนับในระดับต่ำ  
(program count) ค่า  $r = 0.43$  ( $p = 0.010$ ) โดย Spearman rank correlation

หากแต่การใช้โปรแกรมนับนั้นไม่สามารถเลือกนับเฉพาะเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นจึงมีความ  
แม่นยำน้อยกว่าวิธีการนับเองโดยพยาธิ (manual count) ซึ่งสามารถเลือกนับเฉพาะ  
เซลล์มะเร็งได้

6. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ER $\beta$  กับระยะเวลาปลอดเหตุการณ์

### 3.5 การรวบรวมข้อมูล

ประเมินการแสดงออกของ Estrogen receptor เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติที่มีการ  
แสดงออกของ ER $\beta$ 1 ในการศึกษาที่ใช้เนื้อเยื่อจากรังไข่

### 3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย

แม้การรักษาเมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด DLBCL ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มีจำนวนมากก็จริง แต่ผู้ป่วยส่วนน้อยเท่านั้นที่ได้รับการรักษาด้วย standard regimen (Rituximab-CHOP) ทำให้การรวบรวมขนาดตัวอย่างนั้น ต้องเก็บย้อนหลัง เป็นเวลาหลายปีเพื่อให้เพื่อให้ได้รับตามจำนวนที่ต้องการ ซึ่งทำให้มีผลต่อคุณภาพของชิ้นเนื้อต่อมน้ำเหลืองที่นำมาศึกษาได้

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 20.0 บอกเป็นร้อยละของการแสดงออก

วิธีการวัดการแสดงออกของเนื้อเยื่อ มาจากการวัดโดยพยาธิแพทย์ที่นับร้อยละการติดจากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ใน 500 เซลล์ แสดงข้อมูลเป็นร้อยละของนิวเคลียสที่ย้อมติดสี

เปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานของประชากร เช่น อายุ เพศ ปัจจัยที่มีผลต่อการพยากรณ์โรค ในระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกกับกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของ ERβ แสดงข้อมูลเป็นตารางเปรียบเทียบ

ศึกษาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มที่มีการตอบสนองต่อการรักษาดีกับไม่ดี (mean different between response versus relapsed refractory group) จากนั้นนำมาคำนวณหา Receiver Operator Characteristic (ROC) curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง true positive rate (sensitivity) กับ false positive rate (1- specificity) เพื่อเลือกจุดตัดที่เหมาะสมของการแสดงออก ของ ER beta เพื่อนำไปคำนวณความแตกต่างของการพยากรณ์โรคต่อไป

การศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรของความแตกต่างของการแสดงออกของ ERβ กับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival) โดยใช้ Pearson correlation โดยใช้จุดตัดที่เหมาะสมของการแสดงออก ของ ERβ ดังกล่าวข้างต้น

ศึกษาว่าปัจจัยการแสดงออกนั้นสัมพันธ์กับผลการรักษานั้นเกี่ยวข้องกับปัจจัย (prognostic index) หรือไม่ โดยใช้ multivariate analysis

ค่า P value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

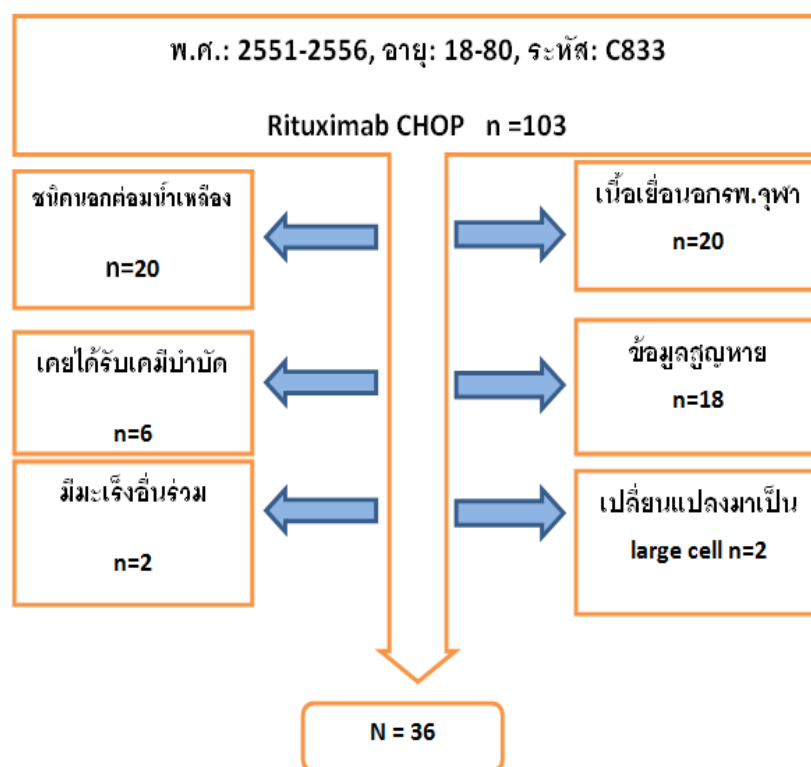
## บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 1. ประชากรที่ศึกษา

อยู่ในช่วงระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ถึง 2556 มีผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด DLBCL และได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดตามมาตรฐานการรักษา ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่อยู่ในเกณฑ์เข้าร่วมการศึกษา จำนวนทั้งหมด 36 ราย

รูปภาพที่ 2 แสดงที่มาของจำนวนประชากรที่ศึกษา



#### 2. ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด DLBCL จำนวนทั้งสิ้น 36 ราย มีข้อมูลพื้นฐาน มีอายุเฉลี่ย 57.4 (พิสัย 19-85) ปี เป็นเพศหญิงร้อยละ 38.9 เป็นกลุ่มเสี่ยงมาก (high IPI) 12 ราย (ร้อยละ 65) และ

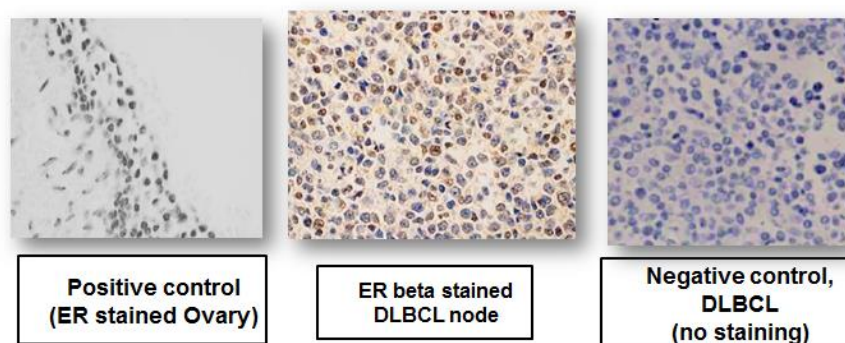
เป็นกลุ่มเสี่ยงมากในคนอายุน้อยกว่า 60 ปี (high age-adjusted IPI) 13 ราย (ร้อยละ 72) ได้รับความล้มเหลว 4- 8 ครั้ง 32 ราย (ร้อยละ 89)

จากทั้งหมด 36 รายหลังได้รับการรักษาพบว่า มี 18 รายเป็นกลุ่มตอบสนอง (good response) และ 18 รายเป็นกลุ่มไม่ตอบสนอง มี 21 ราย (ร้อยละ 58) มีการตอบสนองแบบ ก้อนมะเร็งหายหมด (complete remission, CR) และ 15 ราย (ร้อยละ 42) ก้อนมะเร็งหายไม่หมด จาก 21 รายที่ก้อนมะเร็งหายหมดนั้นมี 3 ราย (ร้อยละ 14) มีการกลับเป็นซ้ำของโรค (relapsed) มีผู้ป่วยเสียชีวิต 13 ราย โดย 4 รายเสียชีวิตจากตัวโรคขณะได้อาเคมีบำบัด 1-3 ครั้ง, 1 รายเสียชีวิตจากตัวโรคขณะได้อาเคมีบำบัดแบบรุนแรง (savage regimen) และ 8 รายเสียชีวิตหลังจากมีการกลับเป็นซ้ำของโรค (relapsed disease)

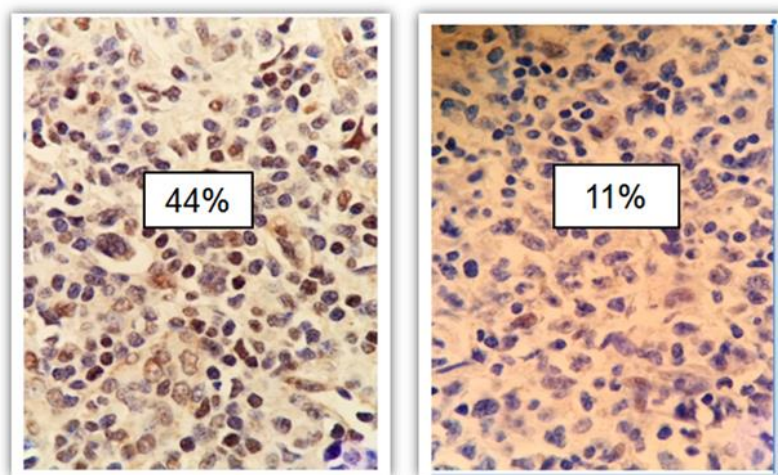
### 3. ผลการแสดงผลของ ER $\beta$

พบว่า เนื้อเยื่อ Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) โดยวิธี IHC นั้นมีการแสดงผลของ ER $\beta$  ที่หลากหลายตั้งแต่ร้อยละ 1 – 85

รูปภาพที่ 3 แสดงการแสดงผลของ ER $\beta$  ใน DLBCL (ภาพกลาง) โดยเซลล์ที่มีการแสดงผลจะติดสีน้ำตาลตรงบริเวณนิวเคลียส Positive control (ภาพซ้าย) คือ granulosa cell ใน ovary negative control (ภาพขวา) คือ เนื้อเยื่อที่ไม่ได้ย้อม



รูปภาพที่ 4 แสดงการแสดงออกของ ER $\beta$  ที่หลากหลาย ใน DLBCL



คำนวณค่าเฉลี่ยการแสดงออก ER $\beta$  ในกลุ่มตอบสนองดีคือ ร้อยละ 12.8 ค่าเฉลี่ยการแสดงออกในกลุ่มตอบสนองไม่ดีคือ ร้อยละ 38.1 และค่าเฉลี่ยของทั้งสองกลุ่มนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.001$ ) เมื่อนำมาวิเคราะห์ ROC analysis พบว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกมากกว่า ร้อยละ 17.5 นั้น สัมพันธ์กับกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาไม่ดี (poor response) ค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 78 และค่าจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 78

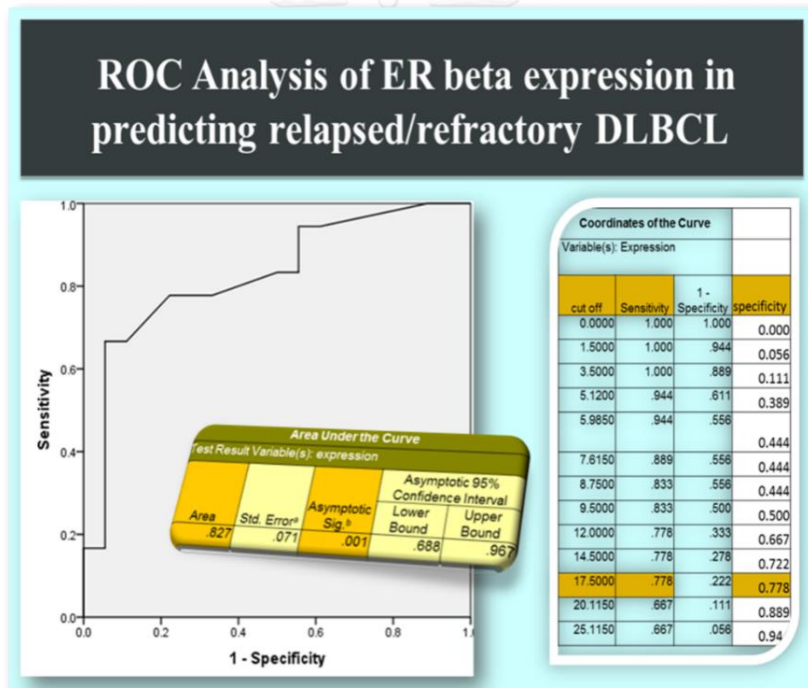
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย DLBCL ที่เข้าร่วมการศึกษาแบ่งตามการตอบสนองต่อการรักษาของโรคดี และไม่

Baseline Characteristics	Good Response n=18(%)	Poor response n=18(%)	P value
Age : > 60 year	10(55.6)	7(38.9)	0.32
Sex : Male	11(61.1)	11(61.1)	1.00
PS : 2-4	12(66.7)	12(66.7)	1.00
Stage : 3-4	14(77.8)	9(50)	0.08
LDH : Elevated	15(83.3)	14(77.8)	1.00
IPI : High (>=3)	7/10(70)	5/8(62.5)	1.00
aalPI : High (>=2)	8/8(100)	5/10(50)	0.04
Mean Cycles of RCHOP	6.6	5.4	0.17

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอายุ ( $P=0.32$ ) เพศ ( $P=1.0$ ) ระดับความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน (performance status,  $P=1.0$ ) มีระยะของโรคตั้งแต่ระยะที่สามขึ้นไป ( $P=0.08$ ) มีแลกเตตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์ (LDH) ที่สูงกว่าปกติ ( $P=1.0$ ) มีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง (IPI,  $P=1.0$ ) ทั้ง 2 กลุ่มได้จำนวน course R CHOP ไม่แตกต่างกัน ( $P = 0.17$ )

พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของมีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูงในกลุ่มคนที่อายุน้อยกว่า 60 ปี (aapI,  $P=0.04$ ) ซึ่งสามารถพบได้ในความเป็นจริง และเป็นข้อจำกัดของการศึกษาในลักษณะการเก็บข้อมูลย้อนหลัง ( case control study )

แผนภูมิที่ 1 แสดง ROC analysis ของ ER $\beta$  expression พบว่ามี area under the curve ที่ร้อยละ 82.7 ( $P = 0.001$ ) พบว่าการแสดงออกที่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5 นั้นสัมพันธ์





#### 4. ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยแยกตามกลุ่มที่ ER $\beta$ แสดงออกต่ำและสูง

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกของเนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่มากกว่าร้อยละ 17.5 (high expression) กับที่น้อยกว่าร้อยละ 17.5 (low expression) พบว่า มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี ในกลุ่ม high expression 8 ราย (คิดเป็นร้อยละ 44.4) ในกลุ่ม low expression 9 ราย (คิดเป็นร้อยละ 50) เป็นเพศชายในกลุ่ม high expression 11 ราย (คิดเป็นร้อยละ 61.1) ในกลุ่ม low expression 11 ราย (คิดเป็นร้อยละ 61.1) มีระดับความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน ตั้งแต่ระดับสองขึ้นไป (performance status 2-4) ในกลุ่ม high expression 9 ราย (คิดเป็นร้อยละ 50) ในกลุ่ม low expression 11 ราย (คิดเป็นร้อยละ 66.6) มีระยะของโรคตั้งแต่ระยะที่สามขึ้นไป ในกลุ่ม high expression 13 ราย (คิดเป็นร้อยละ 76.4) ในกลุ่ม low expression 10 ราย (คิดเป็นร้อยละ 55.5) มีแลกเตตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์ (LDH) ที่สูงขึ้น ในกลุ่ม high expression 15 ราย (คิดเป็นร้อยละ 83.3) ในกลุ่ม low expression 14 ราย (คิดเป็นร้อยละ 77.8) มีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง (IPI) ในกลุ่ม high expression 6 ราย (คิดเป็นร้อยละ 75) ในกลุ่ม low expression 6 ราย (คิดเป็นร้อยละ 60) มีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง (aalPI) ในกลุ่ม high expression 8 ราย (คิดเป็นร้อยละ 80) ในกลุ่ม low expression 5 ราย (คิดเป็นร้อยละ 62.5) มีการตอบสนองต่อการรักษาดีมาก (complete remission) ในกลุ่ม high expression 8 ราย (คิดเป็นร้อยละ 44.4) ในกลุ่ม low expression 13 ราย (คิดเป็นร้อยละ 72.2)

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย DLBCL ที่เข้าร่วมการศึกษาแบ่งตามการแสดงออกของ ER $\beta$  ที่น้อยกว่าร้อยละ 17.5 และมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5

Baseline Characteristics	ER < 17.5 n=18(%)	ER $\geq$ 17.5 n=18(%)	P value
Age : > 60 year	9(50)	8(44.4)	0.73
Sex : Male	11(61)	11(61)	1.00
PS : 2-4	12(67)	9(50)	0.40
Stage : 3-4	10(56)	14(76)	0.13
LDH : Elevated	14(78)	15(83)	1.00
IPI : High ( $\geq$ 3)	11(60)	13(70)	0.62
aalPI : High ( $\geq$ 2)	11(63)	14(80)	0.78
Mean Cycles of RCHOP	6	6.5	0.87
GCB type	7/9(78)	10/11(91)	-
Non GCB type	2/9(22)	1/11(9)	-
Double expression	2/4(50)	2/3(67)	-

พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอายุ ( $P=0.73$ ) เพศ ( $P=1.0$ ) ระดับความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน (performance status,  $P=0.4$ ) มีระยะของโรคตั้งแต่ระยะที่สามขึ้นไป ( $P=0.13$ ) มีแลกเตตดีไฮโดรจีเนส เอนไซม์ (LDH) ที่สูงกว่าปกติ ( $P=1.0$ ) มีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง (IPI,  $P=0.62$  หรือ aIPI,  $P=0.78$ ) มีการตอบสนองต่อการรักษาดีมาก (complete remission) ( $P=0.09$ ) ที่มีข้อมูลบันทึกไว้จากการย้อม immunohistochemistry และใช้ Hans criteria ว่าเป็น DLBCL ชนิด GCB และ non-GCB type เพียง 20 ราย และเป็น double expression เพียง 7 ราย ทั้ง 2 กลุ่มได้จำนวน course R CHOP ไม่แตกต่างกัน ( $P = 0.86$ )

ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ER beta กับเพศพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กัน อย่างไรก็ตามผู้ป่วยเพศหญิงส่วนใหญ่ในการศึกษานี้มีอายุอยู่ในช่วงวัยหมดประจำเดือนแล้ว จึงอาจจะทำให้ไม่มีผลของเอสโตรเจนฮอร์โมน

หลังจากคำนวณค่าเฉลี่ยของการแสดงออก ER beta เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ตอบสนองกับไม่ตอบสนองแล้วพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แล้ววิเคราะห์ ROC analysis ต่อจนได้จุดตัดการแสดงออกที่ร้อยละ 17.5 แล้วแจกแจงข้อมูลพื้นฐานของทั้งสองกลุ่มดังตารางที่ 3 และแสดงจำนวนครั้งของการรักษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มดังตารางที่ 3

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนครั้งของการรักษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกของ ER $\beta$  ที่น้อยกว่าร้อยละ 17.5 และมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5

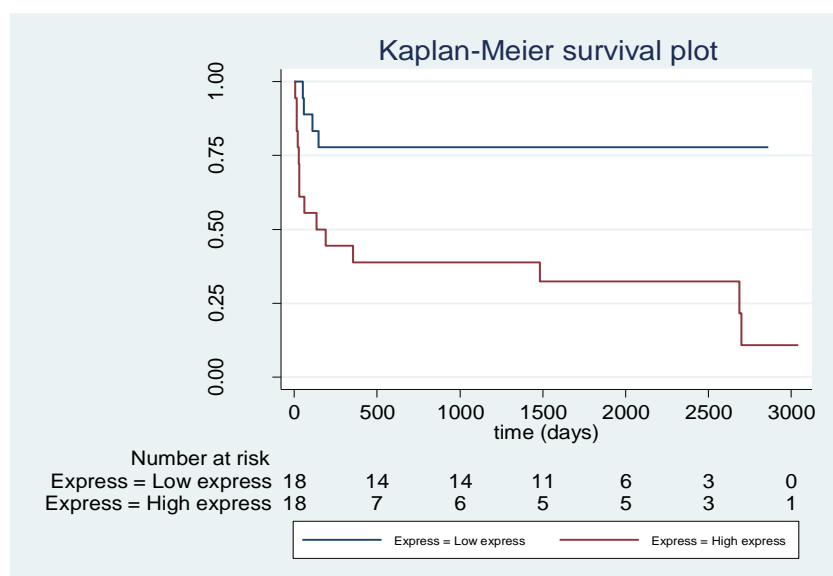
R CHOP treatment	Low ER $\beta$ expression (n=18)	High ER $\beta$ expression(n=18)
Complete 4- 8 cycles	17	14
4 cycles switch to savage regimen	0	1
Less than 4 cycles and death	1	3

##### 5. พบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ER $\beta$ กับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival)

พบว่าในกลุ่มที่มีการแสดงออกของ ER $\beta$  ที่น้อยกว่าร้อยละ 17.5 นั้น ทั้งหมด 18 ราย เป็นกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา กลุ่มที่มีการแสดงออกของ ER $\beta$  ที่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5 นั้น

ทั้งหมด 18 ราย เป็นกลุ่มที่ติดต่อการรักษาหรือเสียชีวิต 8 ราย (คิดเป็นร้อยละ 80) นำมาคำนวณความแตกต่างโดยใช้ Chi square test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ การแสดงออกที่เท่ากับหรือมากกว่า ร้อยละ 17.5 สัมพันธ์กับระยะเวลาปลอดโรคที่สั้น โดยมี hazard ratio (HR) 4.74, 95% confidence interval (CI) 1.55 – 14.49 (P =0.015) ค่ามัธยฐานของเวลาปลอดโรคคือ 133 เทียบกับ มากกว่า 2,500 วัน ในกลุ่มที่มีการติด ER $\beta$  มากและน้อยกว่า ร้อยละ 17.5 ตามลำดับ

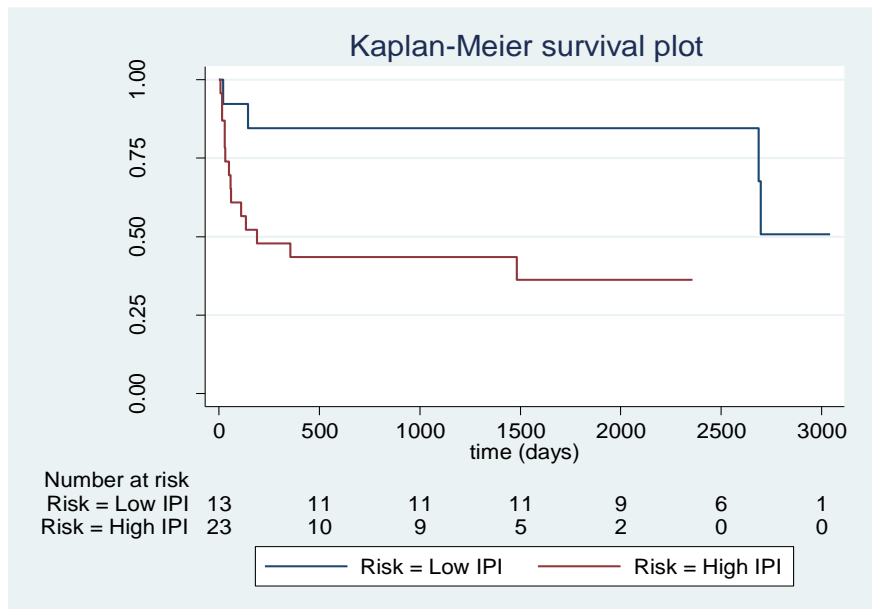
แผนภูมิที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ER $\beta$  กับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival)



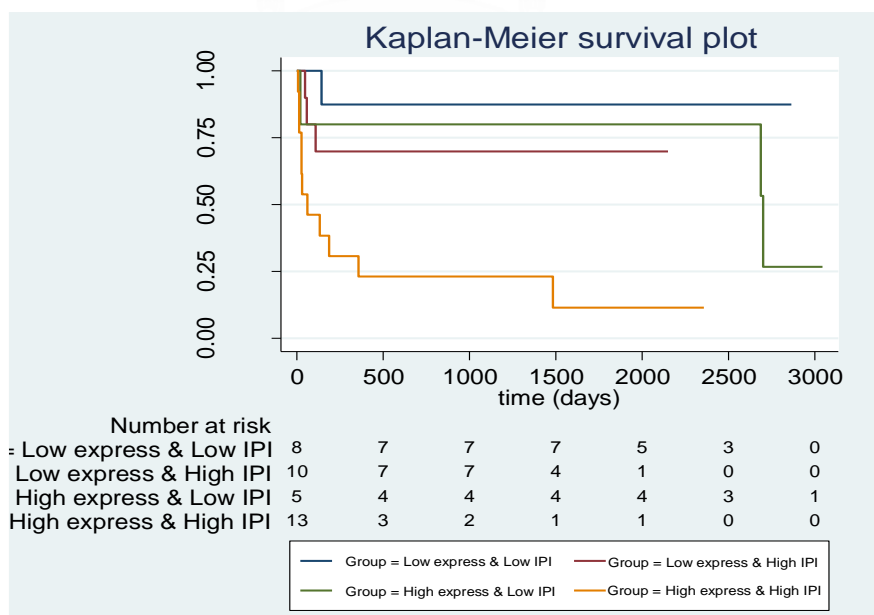
6. พบความสัมพันธ์ระหว่าง ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง (High IPI) กับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ที่โรคกำเริบหรือกลับเป็นซ้ำหรือเสียชีวิต (event free survival)

พบว่าในกลุ่มที่มี ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรค (International prognostic index, IPI) อยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่ำทั้งหมด 13 ราย เป็นกลุ่มที่ติดต่อการรักษาหรือเสียชีวิต 4 ราย (คิดเป็นร้อยละ 31) ในกลุ่มที่มีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง นั้น ทั้งหมด 23 ราย เป็นกลุ่มที่ติดต่อการรักษาหรือเสียชีวิต 14 ราย (คิดเป็นร้อยละ 61) นำมาคำนวณความแตกต่างโดยใช้ cox regression พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ปลอดโรคที่สั้น HR 5.64, 95%CI 1.27 -25.03 (P = 0.023)

แผนภูมิที่ 3 แสดง ความสัมพันธ์ระหว่าง ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง(High IPI) กับ ระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival)



แผนภูมิที่ 4 แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ERβ และดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรค กับ ระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival)



จากกราฟแสดงให้เห็นว่า กลุ่มที่มีการแสดงออกของ ER $\beta$  ต่ำและดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคต่ำ มีระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์มากที่สุด ขณะที่กลุ่มที่มีการแสดงออกของ ER $\beta$  สูงและดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคสูง มีระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์สั้นที่สุด พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P = 0.009$  และ  $P = 0.007$  ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่มีการแสดงออกของ ER $\beta$  สูงและดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคต่ำ มีระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ที่มากกว่ากลุ่มที่มีการแสดงออกของ ER $\beta$  ต่ำและดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคสูง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P = 0.21$  และ  $P = 0.25$  ตามลำดับ

## 7. การแสดงออกของ ER $\beta$ สามารถพยากรณ์โรคได้โดยไม่ขึ้นกับดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรค

เนื่องจากการแสดงออก ER $\beta$  ที่สูงและกลุ่มเสี่ยง IPI สูงต่างก็สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ดังนั้นจึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรซึ่งก็พบว่า ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงออกสูง (high expression) กับกลุ่มที่มีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคสูง (high risk) อย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นจึงยืนยันด้วยการทำ multivariate analysis พบว่าทั้ง การแสดงออกสูงมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5 (high expression) และกลุ่มที่มีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคสูง (high risk) สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ดี โดยที่ทั้งสองปัจจัยนั้นมีความเป็นอิสระต่อกัน (independent factor)

ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ER $\beta$  และ ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง ซึ่งต่างก็สัมพันธ์กับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์ (event free survival) โดยทั้งสองปัจจัยนั้นเป็นตัวแปรที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน

Multivariate analysis :				
ER beta expression and high IPI indepently associated with poor EFS				
	HR	95%CI		P value
		Lower	Upper	
<b>Expression</b>				
< 17.5 %	Reference			
$\geq 17.5\%$	4.27	1.39	13.07	<b>0.011</b>
<b>Risk</b>				
Low IPI	reference			
High IPI	4.96	1.11	22.2	<b>0.036</b>

## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และ ข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผล

การแสดงผลของ ERβ ที่มีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นต้องรู้เทคนิคและเข้าใจกลไกของ immunohistochemistry เป็นอย่างดีเพื่อทำให้การถนอมเนื้อเยื่อ (preserve antigen) และการกู้คืนคุณภาพของโปรตีน (antigen retriever) ให้สามารถจับกับ antibody ได้ดีที่สุด จึงเป็นที่มาของการศึกษาที่เลือกเก็บข้อมูลชิ้นเนื้อย้อนหลังไม่เกิน 10 ปี และดำเนินกระบวนการทุกขั้นตอนตั้งแต่หลังจากทำการตัดต่อม้าน้ำเหลืองของผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เนื่องจากเนื้อเยื่อจะได้รับการถนอมด้วยฟอร์มาลีน (formalin fixation) ภายใน 30 นาที จากนั้นจึงนำมาสู่ขั้นตอน Deparaffinization, pretreatment, primary antibody, detection และ counterstaining ที่ได้มาตรฐานดังกล่าวต่อไป

อย่างไรก็ตามการแสดงผลของ ERβ สามารถเกิดความคลาดเคลื่อนจากการเลือกตัวอย่าง (sampling error) ได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อได้รับการตัด (biopsy) ที่นำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry นั้นเป็นเพียงส่วนน้อยมาก เมื่อเทียบกับก้อนเนื้ออกของผู้ป่วย DLBCL เป็นเหตุผลว่าเนื้อเยื่อนั้นอาจไม่ใช่ตัวแทนที่ดีของมะเร็งทั้งหมด ทำให้ค่าการแสดงผลของ ERβ นั้นน้อยกว่าความเป็นจริงได้

พบว่าค่าเฉลี่ยการแสดงผลของ ERβ ระหว่างทั้งสองกลุ่ม คือกลุ่มตอบสนองดีกับกลุ่มตอบสนองไม่ดีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.001$ ) เมื่อนำมาวิเคราะห์ ROC analysis พบว่ากลุ่มที่มีการแสดงผลออก มากกว่าร้อยละ 17.5 นั้น สัมพันธ์กับกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาไม่ดี ค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 78 และค่าจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 78

พบว่า กลุ่มที่มีการแสดงผลของ ERβ ที่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 17.5 นั้น สัมพันธ์กับระยะเวลาปลอดโรคที่สั้น ( $HR = 4.74$ , 95% [CI] 1.55 – 14.49 ,  $P = 0.015$ )

พบความสัมพันธ์ระหว่าง ดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคอยู่ในกลุ่มเสี่ยงสูง กับระยะเวลาที่ปลอดจากเหตุการณ์เส้น ตามข้อมูลที่ทราบกันอยู่แล้วในปัจจุบัน

ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่มีการแสดงผลออกสูง (high expression) กับกลุ่มที่มีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคสูง (high risk) เมื่อทำ multivariate analysis พบว่าทั้ง การแสดงผลออก ERβ สูง (high expression) และกลุ่มที่มีดัชนีชี้วัดการพยากรณ์โรคสูง (high risk) สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาที่ไม่ดี ดังนั้นทั้งสองปัจจัยนี้มีความอิสระต่อกันสัมพันธ์กัน (independent factor )

จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่า B lymphocyte แสดงออก ER mRNA ชนิด beta มากกว่า alpha จึงเข้าได้กับผลการศึกษานี้ที่พบว่า lymphoma cell ชนิด DLBCL มีการแสดงออกของโปรตีน ER $\beta$  ทุกราย คือ มีการแสดงออกมากกว่าร้อยละ 1 ขึ้นไป แต่มีระดับการแสดงออกที่หลากหลาย ขณะที่ไม่พบการแสดงออกของ ER $\alpha$  จากวิธี immunohistochemistry จึงควรมีการศึกษาต่อไปว่า ER beta จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของ DLBCL หรือไม่ อย่างไร

เนื่องจากการศึกษาและค้นพบดังกล่าวข้างต้นถือเป็นการศึกษานำร่อง ยังไม่เคยมีข้อมูลที่มีคนเคยศึกษามาก่อนมาเปรียบเทียบหรือสามารถอธิบายกลไกการเกิดที่แท้จริงว่าทำไมการแสดงออกที่มากจึงสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของ DLBCL ทั้งที่ ER $\beta$  นั้นมีบทบาทเป็น protective effect ในเนื้ออกชนิดอื่นๆ ผู้ป่วยหญิงในการศึกษานี้ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุที่หมดประจำเดือนแล้ว จึงไม่สามารถบอกได้ว่าการมี estrogen ในเลือด จะมีผลต่อการดำเนินโรคหรือไม่ และเป็นไปได้ว่า lymphomagenesis ในกลุ่ม DLBCL อาจจะมีกลไกการเกิดที่ต่างกับชนิดอื่น ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

น่าจะมีการศึกษา Estrogen receptor  $\beta$  agonist มาทดลองกับ DLBCL ซึ่ง อาจจะนำไปสู่การใช้ยาที่จำเพาะ (target therapy) ในผู้ป่วย DLBCL และการมี ER $\beta$  expression นั้นอาจจะเป็น good prognostic index ในอนาคตได้ถ้าพบว่าการตอบสนองต่อยานี้

## 5.2 สรุปผล

เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองในผู้ป่วย DLBCL ทั้งหมด มีการแสดงออกของ ER $\beta$  ที่หลากหลายของร้อยละการแสดงออก โดยมีการแสดงออกที่เท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 17.5 นั้นสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี

## 5.3 เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าที่เคยศึกษา

ยังไม่มีเคยมีผู้ทำการศึกษาการแสดงออกของ ER $\beta$  ในเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง DLBCL มาก่อน มีแต่การศึกษาการแสดงออกของ ER $\beta$  ในเนื้อเยื่อของมะเร็งเต้านมและ เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองชนิด Mantle cell lymphoma และ Burkitt lymphoma จึงไม่สามารถนำมาใช้อ้างอิงได้

## 5.4 ข้อดีของการศึกษานี้

การศึกษานี้ใช้เทคนิค immunohistochemistry ซึ่งเป็นเทคนิคการศึกษาที่ราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับ gene expression profile และยังเป็นการตรวจที่มีในโรงพยาบาลทั่วไป จึงสะดวกในการใช้ตรวจและศึกษาได้ในผู้ป่วยทั่วไปการศึกษานี้เป็นลักษณะของ case control study คือศึกษาจากอาการแสดงการตอบสนองต่อการรักษาของผู้ป่วยแล้วจึงย้อนกลับไปหาคำตอบที่ต้นเหตุคือ การแสดงออกของ

ER $\beta$  เพื่อดู mean expression ระหว่างกลุ่ม ซึ่งการศึกษาในลักษณะนี้เหมาะกับการศึกษาเพื่อหาจุดตัดของการตรวจ test (cut point of ER $\beta$  expression) การศึกษานี้เป็นการศึกษาที่ยังไม่เคยมีผู้ทำการศึกษามาก่อน จึงสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาในอนาคต

#### 5.5 ข้อดีของการศึกษานี้

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาเชิงพรรณนายน้อยหลัง ซึ่งอาจทำให้เกิดค่าอคติได้ นอกจากนี้ขนาดตัวอย่างยังน้อย

#### 5.6 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในกลุ่มประชากรที่มากขึ้นจะช่วยให้ข้อมูลชัดเจน และต่อยอดได้ เช่น การศึกษาผล ER $\beta$  agonist ในสัตว์ทดลองที่เป็น DLBCL และ การตรวจระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในผู้ป่วย DLBCL เป็นต้น





## รายการอ้างอิง

1. Wu XC, Andrews P, Chen VW, Groves FD. Incidence of extranodal non-Hodgkin lymphomas among whites, blacks, and Asians/Pacific Islanders in the United States: anatomic site and histology differences. *Cancer Epidemiol* 2009;33:337-46.
2. Kane EV, Roman E, Becker N, Bernstein L, Boffetta P, Bracci PM, et al. Menstrual and reproductive factors, and hormonal contraception use: associations with non-Hodgkin lymphoma in a pooled analysis of InterLymph case-control studies. *Ann Oncol* 2012;23:2362-74.
3. Preti HA, Cabanillas F, Talpaz M, Tucker SL, Seymour JF, Kurzrock R. Prognostic value of serum interleukin-6 in diffuse large-cell lymphoma. *Ann Intern Med* 1997;127:186-94.
4. Kincade PW, Medina KL, Payne KJ, Rossi MI, Tudor KS, Yamashita Y, et al. Early B-lymphocyte precursors and their regulation by sex steroids. *Immunol Rev* 2000;175:128-37.
5. Medina KL, Strasser A, Kincade PW. Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. *Blood* 2000;95:2059-67.
6. Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol* 2004;113:224-30.
7. Olsen NJ, Kovacs WJ. Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 1996;17:369-84.
8. Lee JS, Bracci PM, Holly EA. Non-Hodgkin lymphoma in women: reproductive factors and exogenous hormone use. *Am J Epidemiol* 2008;168:278-88.
9. Lu Y, Wang SS, Sullivan-Halley J, Chang ET, Clarke CA, Henderson KD, et al. Oral contraceptives, menopausal hormone therapy use and risk of B-cell non-Hodgkin lymphoma in the California Teachers Study. *Int J Cancer* 2011;129:974-82.
10. Morton LM, Wang SS, Richesson DA, Schatzkin A, Hollenbeck AR, Lacey JV, Jr. Reproductive factors, exogenous hormone use and risk of lymphoid neoplasms among women in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study Cohort. *Int J Cancer* 2009;124:2737-43.

11. Cerhan JR, Krickler A, Paltiel O, Flowers CR, Wang SS, Monnereau A, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for diffuse large B-cell lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2014;2014:15-25.
12. Teras LR, Patel AV, Hildebrand JS, Gapstur SM. Postmenopausal unopposed estrogen and estrogen plus progestin use and risk of non-Hodgkin lymphoma in the American Cancer Society Cancer Prevention Study-II Cohort. *Leuk Lymphoma* 2013;54:720-5.
13. Huber JC, Schneeberger C, Tempfer CB. Genetic modelling of the estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorders. *Maturitas* 2002;42:1-12.
14. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007;87:905-31.
15. Nilsson S, Koehler KF. Oestrogen receptors and selective oestrogen receptor modulators: molecular and cellular pharmacology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:15-25.
16. Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:165-75.
17. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5925-30.
18. Leitman DC, Paruthiyil S, Vivar OI, Saunier EF, Herber CB, Cohen I, et al. Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:629-36.
19. Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, et al. Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *J Med Chem* 2000;43:4934-47.
20. Carroll VM, Jeyakumar M, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. Diarylpropionitrile (DPN) enantiomers: synthesis and evaluation of estrogen receptor beta-selective ligands. *J Med Chem* 2012;55:528-37.
21. Powell E, Xu W. Intermolecular interactions identify ligand-selective activity of estrogen receptor alpha/beta dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19012-7.

22. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2011;11:597-608.
23. Grober OM, Mutarelli M, Giurato G, Ravo M, Cicatiello L, De Filippo MR, et al. Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation. *BMC Genomics* 2011;12:36.
24. Lin CY, Vega VB, Thomsen JS, Zhang T, Kong SL, Xie M, et al. Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet* 2007;3:e87.
25. Zhao C, Gao H, Liu Y, Papoutsis Z, Jaffrey S, Gustafsson JA, et al. Genome-wide mapping of estrogen receptor-beta-binding regions reveals extensive cross-talk with transcription factor activator protein-1. *Cancer Res* 2010;70:5174-83.
26. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005;19:1951-9.
27. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* 2006;27:299-402.
28. Britton DJ, Hutcheson IR, Knowlden JM, Barrow D, Giles M, McClelland RA, et al. Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res Treat* 2006;96:131-46.
29. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem* 2000;275:18447-53.
30. Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA. ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids* 2008;73:1039-51.
31. Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA, Haldosen LA. Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 2005;24:6605-16.
32. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258-65.

33. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863-70.
34. Al-Bader M, Al-Saji S, Ford CH, Francis I, Al-Ayadhy B. Real-time PCR: detection of oestrogen receptor-alpha and -beta isoforms and variants in breast cancer. *Anticancer Res* 2010;30:4147-56.
35. Kumar VL, Kumar S, Srivastava A, Kumar V. Observations on the presence of E domain variants of estrogen receptor-alpha in the breast tumors. *J Surg Oncol* 2006;94:332-7.
36. Lin SL, Yan LY, Zhang XT, Yuan J, Li M, Qiao J, et al. ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS One* 2010;5:e9013.
37. Witek A, Paul-Samojedny M, Stojko R, Seifert B, Mazurek U. Coexpression index of estrogen receptor alpha mRNA isoforms in simple, complex hyperplasia without atypia, complex atypical hyperplasia and adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2007;106:407-12.
38. Cavallini A, Messa C, Pricci M, Caruso ML, Barone M, Di Leo A. Distribution of estrogen receptor subtypes, expression of their variant forms, and clinicopathological characteristics of human colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2002;47:2720-8.
39. Collins F, MacPherson S, Brown P, Bombail V, Williams AR, Anderson RA, et al. Expression of oestrogen receptors, ERalpha, ERbeta, and ERbeta variants, in endometrial cancers and evidence that prostaglandin F may play a role in regulating expression of ERalpha. *BMC Cancer* 2009;9:330.
40. Haring J, Skrzypczak M, Stegerer A, Lattrich C, Weber F, Gorse R, et al. Estrogen receptor beta transcript variants associate with oncogene expression in endometrial cancer. *Int J Mol Med* 2012;29:1127-36.
41. Dong W, Li J, Huang Y, Zhang H, Shan Z, Teng W. Differential expression patterns of estrogen receptor (ER)-beta splice variants between papillary thyroid cancer and nodular thyroid goiter. *Med Sci Monit* 2012;18:BR351-5.
42. Bollig A, Miksicek RJ. An estrogen receptor-alpha splicing variant mediates both positive and negative effects on gene transcription. *Mol Endocrinol* 2000;14:634-49.

43. Omoto Y, Eguchi H, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hayashi S. Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbeta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7. *Oncogene* 2003;22:5011-20.
44. Stygar D, Westlund P, Eriksson H, Sahlin L. Identification of wild type and variants of oestrogen receptors in polymorphonuclear and mononuclear leucocytes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64:74-81.
45. Cheng J, Lee EJ, Madison LD, Lazennec G. Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Lett* 2004;566:169-72.
46. Omoto Y, Imamov O, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor alpha and imprinting of the neonatal mouse ventral prostate by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1484-9.
47. Shim GJ, Wang L, Andersson S, Nagy N, Kis LL, Zhang Q, et al. Disruption of the estrogen receptor beta gene in mice causes myeloproliferative disease resembling chronic myeloid leukemia with lymphoid blast crisis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6694-9.
48. Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, Zhao C, Williams C, Strom A, et al. Tumor repressive functions of estrogen receptor beta in SW480 colon cancer cells. *Cancer Res* 2009;69:6100-6.
49. Li H, Tu Z, An L, Qian Z, Achilefu S, Gu Y. Inhibitory effects of ERbeta on proliferation, invasion, and tumor formation of MCF-7 breast cancer cells--prognostication for the use of ERbeta-selective therapy. *Pharm Biol* 2012;50:839-49.
50. Tu Z, Ma Y, Tian J, Li H, Akers W, Achilefu S, et al. Estrogen receptor beta potentiates the antiproliferative effect of raloxifene and affects the cell migration and invasion in HCT-116 colon cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:1091-103.
51. Blagosklonny MV, Neckers LM. Cytostatic and cytotoxic activity of sex steroids against human leukemia cell lines. *Cancer Lett* 1994;76:81-6.
52. Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Ghiorzo P, Sulli A, Villaggio B. Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1124-32.

53. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Alsheikh-Ali A, Eder S, Force T, et al. 17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload. *J Card Fail* 2008;14:245-53.
54. Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology* 2001;142:2351-60.
55. Bardin A, Hoffmann P, Boulle N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P, et al. Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64:5861-9.
56. Yakimchuk K, Iravani M, Hasni MS, Rhonnstad P, Nilsson S, Jondal M, et al. Effect of ligand-activated estrogen receptor beta on lymphoma growth in vitro and in vivo. *Leukemia* 2011;25:1103-10.
57. Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* 2005;97:107-13.
58. Curran EM, Berghaus LJ, Verneti NJ, Saporita AJ, Lubahn DB, Estes DM. Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. *Cell Immunol* 2001;214:12-20.
59. Shim GJ, Gherman D, Kim HJ, Omoto Y, Iwase H, Bouton D, et al. Differential expression of oestrogen receptors in human secondary lymphoid tissues. *J Pathol* 2006;208:408-14.
60. Erlandsson MC, Ohlsson C, Gustafsson JA, Carlsten H. Role of oestrogen receptors alpha and beta in immune organ development and in oestrogen-mediated effects on thymus. *Immunology* 2001;103:17-25.
61. Kouro T, Medina KL, Oritani K, Kincade PW. Characteristics of early murine B-lymphocyte precursors and their direct sensitivity to negative regulators. *Blood* 2001;97:2708-15.
62. Masuzawa T, Miyaura C, Onoe Y, Kusano K, Ohta H, Nozawa S, et al. Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *J Clin Invest* 1994;94:1090-7.

63. Hill L, Jeganathan V, Chinnasamy P, Grimaldi C, Diamond B. Differential roles of estrogen receptors alpha and beta in control of B-cell maturation and selection. *Mol Med* 2011;17:211-20.
64. Li J, McMurray RW. Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on immune functions in ovariectomized mice. *Int Immunopharmacol* 2006;6:1413-23.
65. Carlsten H, Holmdahl R, Tarkowski A, Nilsson LA. Oestradiol- and testosterone-mediated effects on the immune system in normal and autoimmune mice are genetically linked and inherited as dominant traits. *Immunology* 1989;68:209-14.
66. Erlandsson MC, Jonsson CA, Islander U, Ohlsson C, Carlsten H. Oestrogen receptor specificity in oestradiol-mediated effects on B lymphopoiesis and immunoglobulin production in male mice. *Immunology* 2003;108:346-51.
67. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, Afentoulis M, Vandenbark AA, Ziegler SF, et al. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J Immunol* 2004;173:2227-30.
68. Salem ML. Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3:97-104.
69. Harkonen PL, Vaananen HK. Monocyte-macrophage system as a target for estrogen and selective estrogen receptor modulators. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:218-27.
70. Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *J Autoimmun* 2012;38:J282-91.
71. Carreras E, Turner S, Paharkova-Vatchkova V, Mao A, Dascher C, Kovats S. Estradiol acts directly on bone marrow myeloid progenitors to differentially regulate GM-CSF or Flt3 ligand-mediated dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2008;180:727-38.
72. Nalbandian G, Paharkova-Vatchkova V, Mao A, Nale S, Kovats S. The selective estrogen receptor modulators, tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation. *J Immunol* 2005;175:2666-75.

73. Paharkova-Vatchkova V, Maldonado R, Kovats S. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c+ CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol* 2004;172:1426-36.
74. Seillet C, Laffont S, Tremollieres F, Rouquie N, Ribot C, Arnal JF, et al. The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor alpha signaling. *Blood* 2012;119:454-64.
75. Forsythe A, Breland T, Majumdar S, Elkin TD, Johnson D, Megason G. Gender differences in incidence rates of childhood B-precursor acute lymphocytic leukemia in Mississippi. *J Pediatr Oncol Nurs* 2010;27:164-7.
76. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 2006;107:265-76.
77. Yakimchuk K, Norin S, Kimby E, Hagglund H, Warner M, Gustafsson JA. Up-regulated estrogen receptor beta2 in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012;53:139-44.
78. Leung YK, Lam HM, Wu S, Song D, Levin L, Cheng L, et al. Estrogen receptor beta2 and beta5 are associated with poor prognosis in prostate cancer, and promote cancer cell migration and invasion. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:675-89.
79. Esslimani-Sahla M, Kramar A, Simony-Lafontaine J, Warner M, Gustafsson JA, Rochefort H. Increased estrogen receptor betacx expression during mammary carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2005;11:3170-4.
80. Shaaban AM, Green AR, Karthik S, Alizadeh Y, Hughes TA, Harkins L, et al. Nuclear and cytoplasmic expression of ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008;14:5228-35.
81. Kauss MA, Reiterer G, Bunaciu RP, Yen A. Human myeloblastic leukemia cells (HL-60) express a membrane receptor for estrogen that signals and modulates retinoic acid-induced cell differentiation. *Exp Cell Res* 2008;314:2999-3006.





รายการอ้างอิง





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวศรุตดา พิภนวม

วันเดือนปีเกิด 11 กันยายน พ.ศ. 2525 จังหวัดนครปฐม

สถานภาพ โสด

ตำแหน่งทางการศึกษาปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

พ.ศ. 2550-2553 แพทย์เพิ่มพูนทักษะโรงพยาบาลศูนย์อุดรธานี จังหวัดอุดรธานี

พ.ศ. 2553-2556 แพทย์ประจำบ้านสาขาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

พ.ศ. 2556-2557 อายุรแพทย์โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม

พ.ศ. 2557- ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาอายุรศาสตร์โลหิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาและประกาศนียบัตร

พ.ศ. 2550 แพทย์ศาสตร์บัณฑิต

พ.ศ. 2556 วุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาอายุรศาสตร์

