

การศึกษาความแตกต่างของแบบแผนทางโปรตีนโอมิกส์ในเนื้อเยื่อระหว่างแต่ละชนิดย่อย
ทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

นางสาวเบญญาพัชร เอี่ยมธนะสินชัย



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

A STUDY OF DIFFERENT PROTEOMICS PATTERNS OF SUBTYPES OF LUNG
ADENOCARCINOMA AT THE KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL

Miss Benyapatch Eiamthanasinchai



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

การศึกษาความแตกต่างของแบบแผนทางโปรตีนโอมิกสันใน
เนื้อเยื่อระหว่างแต่ละชนิดย่อยทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วย
มะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาในโรงพยาบาล
จุฬาลงกรณ์

โดย

นางสาวเบญญาพัชร เอี่ยมธนะสินชัย

สาขาวิชา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร. นายแพทย์ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. นายแพทย์ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เอกภพ สิริชัยนันท์)

เบญญาพัชร เอี่ยมธนะสินชัย : การศึกษาความแตกต่างของแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ในเนื้อเยื่อระหว่างแต่ละชนิดย่อยทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (A STUDY OF DIFFERENT PROTEOMICS PATTERNS OF SUBTYPES OF LUNG ADENOCARCINOMA AT THE KING CHULALONGKORN MEMORIAL HOSPITAL) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. นพ.วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร. นพ.ไตรรักษ์ พิธิษฐ์กุล, 76 หน้า.

ที่มา มะเร็งปอด เป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข กระบวนการเกิดมะเร็งปอดมีความซับซ้อน การศึกษากลไกการเกิดมะเร็งปอดจึงต้องศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA และการแสดงออกของโปรตีน ผู้วิจัยจึงศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งปอด และวิเคราะห์แบบแผนที่ผิดปกติของการแสดงออกของโปรตีน

วัตถุประสงค์ การศึกษาความแตกต่างของแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ในเนื้อเยื่อระหว่างแต่ละชนิดย่อยทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

วิธีการศึกษา ผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาที่ได้รับการผ่าตัดปอดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตั้งแต่เดือนมกราคม 2551 ถึง ธันวาคม 2557 ทบทวนบันทึกในเวชระเบียน ส่งตรวจชิ้นเนื้อเพื่อวิเคราะห์แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์โดยใช้วิธีการตรวจแมสสเปกโตรเมตรี และนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์กับ ชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับปัจจัยทางคลินิกที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ระยะเวลาการอยู่รอด, การรักษาเสริมเคมีบำบัด, การกลับเป็นซ้ำของโรค

ผลการศึกษา การศึกษาแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ในเนื้อเยื่อที่ได้ทั้งหมด 27 ตัวอย่าง โดยหาความสัมพันธ์กับลักษณะชนิดย่อยทางพยาธิวิทยาของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา สามารถหาความสัมพันธ์ต่อชนิดย่อยทางพยาธิวิทยาได้เมื่อใช้วิธี supervised เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มย่อย solid เปรียบเทียบกับกลุ่มย่อยอื่นๆ คือ non-solid ได้แก่ acinar, micropapillary, papillary, lepidic พบว่าแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ของ solid pattern มีความแตกต่างกับกลุ่ม non-solid pattern ด้วยวิธีการจัดแบบ hierarchical clustering analysis และ principal component analysis และปัจจัยทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับ solid pattern คือ เพศชาย, การรักษาเสริมเคมีบำบัด และการกลับเป็นซ้ำของโรค มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.006, 0.029, 0.012$ ตามลำดับ)

สรุป แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ในจำนวนตัวอย่างที่จำกัด สามารถแยกความแตกต่างกลุ่ม solid predominant กับ non-solid predominant ได้ และ solid pattern สัมพันธ์กับเพศชาย, ระยะเวลาปลอดโรค และการได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด ส่วนโปรตีนที่พบใน solid pattern อาจนำมาพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคได้ในอนาคต

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5774104930 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: PROTEOMICS PATTERNS / / HISTOLOGIC SUBTYPE / ADENOCARCINOMA OF LUNG
CANCER / MASS SPECTROMETRY

BENYAPATCH EIAMTHANASINCHAI: A STUDY OF DIFFERENT PROTEOMICS PATTERNS OF
SUBTYPES OF LUNG ADENOCARCINOMA AT THE KING CHULALONGKORN MEMORIAL
HOSPITAL. ADVISOR: ASSOC. PROF. VIROTE SRIURANPONG, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR:
TRAIRAK PISITKUN, M.D., Ph.D., 76 pp.

Background: Lung cancer is a leading cause of mortality worldwide including Thailand. The major histologic subtype is adenocarcinoma. Recently a revised histopathological classification including adenocarcinoma subtypes has been implemented. The classification is heavily relied on morphological appearance of lung cancer.

Objective: To characterize proteomics signatures to distinguish subtypes of the lung adenocarcinoma which may suitable for a molecular classification

Methods: All patients were early stage resected lung adenocarcinoma diagnosed and treated at the King Chulalongkorn Memorial Hospital during January 2551 to December 2557. Demographic and clinical information were collected from medical record review. All collected tumor tissue were analyzed with mass spectrometry technique for possible proteomics patterns. Proteomics patterns were analyzed for signatures of individual histologic pattern. Additional correlative analyses of proteomics signatures with available clinical data were performed.

Result: Total 27 samples were included in the study. Under supervised classification, we could find proteomics patterns to distinguish between solid versus non- solid adenocarcinoma subtypes. We found a group of robust signatures for solid histology by hierarchical clustering and principal component analysis. In the solid group. Clinical factors associated with the solid pattern was male gender, adjuvant chemotherapy and recurrence of the disease that associated with a statistically significant ($P = 0.006, 0.029, 0.012$, respectively).

Conclusion: Proteomics patterns could distinguish between solid versus non-solid predominant subtype. Solid pattern associated with gender, DFS and adjuvant chemotherapy. A larger cohort will be needed to confirm the important of this proteomic signatures of solid subtype lung adenocarcinoma and may serve as biomarker for lung cancer in the future.

Department: Medicine

Student's Signature

Field of Study: Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2015

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงที่ได้มีส่วนร่วมให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์

รองศาสตราจารย์นายแพทย์วิโรจน์ ศรีอุฬารพงศ์

กรุณาให้ความรู้ ข้อคิด และข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์

อาจารย์ดร.นายแพทย์ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล

ที่ให้ความรู้ ให้ความกรุณาระหว่างขั้นตอนดำเนินงานวิจัย การวิเคราะห์ขั้นเนื้อเพื่อศึกษาแบบแผนทางโปรตีนโอมิกส์และเสนอแนะแนวทางอันเป็นประโยชน์

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ปทุมวิชัญญ์ จันทรานูวัฒน์

ให้คำปรึกษาการทำวิจัย ให้ความกรุณาวิเคราะห์ขั้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

อาจารย์ดร.แพทย์หญิงสุทิมา เหลืองดิลก

ให้คำปรึกษาการทำวิจัยและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์

ดร.ธรรมกร แซ่ตั้ง

ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาด้านการวิเคราะห์ทางสถิติ

เจ้าหน้าที่ดำเนินงานวิจัย

นางสาว ศิริพร ขุนศรี ผู้ช่วยนักวิจัย

นายไอยนรรฐ กกล้าหาญ ผู้ช่วยนักวิจัย

ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมตัวอย่างขั้นเนื้อและขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

ผู้ช่วยเหลือด้านการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

และขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยมะเร็งวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ให้ความช่วยเหลือทุกประการ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย.....	1
1.2. คำถามของการวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.4 สมมุติฐาน	3
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	3
1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	4
1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย.....	4
1.8 ข้อจำกัดทางการวิจัย.....	4
1.9 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	4
1.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6
การวินิจฉัยและการจัดแบ่งกลุ่มทางพยาธิวิทยา(Histologic classification) ⁽⁸⁾	6
การรักษามะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา.....	18

การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน.....	19
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	22
3.1 รูปแบบการวิจัย	22
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย.....	22
3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง	22
3.4 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย.....	24
3.5 การดำเนินการวิจัย.....	25
3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล	32
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล	32
3.8 การนำเสนอข้อมูล.....	33
3.9 ปัญหาทางจริยธรรม.....	33
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	34
1. ประชากรที่นำมาศึกษา.....	34
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	50
5.1 อภิปรายผล.....	50
5.2 สรุปผล	54
5.3 ข้อดีของการศึกษานี้.....	54
5.4 ข้อด้อยของการศึกษานี้	54
5.5 ข้อเสนอแนะ.....	55
รายการอ้างอิง	56
ภาคผนวก.....	62
ภาคผนวก ข	65
รายการอ้างอิง	74

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์76



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มตามพยาธิวิทยาของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาตามแบบเดิมปี 2004 WHO และ ปัจจุบันแบ่งตาม IASLC/ATS/ERS ⁽³⁾	7
ตารางที่ 2 แสดงการวินิจฉัย, นิยามศัพท์และคำแนะนำในเนื้อเยื่อขนาดเล็ก ⁽³⁾	9
ตารางที่ 3 ตารางที่ 4 แสดงความไวและความจำเพาะในการวิเคราะห์ด้วยตัวบ่งชี้ตามชนิดของ มะเร็ง ⁽²⁶⁻²⁸⁾	20
ตารางที่ 5 แสดงลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (n=27).....	36



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ lepidic predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์.....	10
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ acinar predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์.....	10
ภาพที่ 3 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ papillary predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์.....	11
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ micropapillary predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์	11
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ solid predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์.....	12
ภาพที่ 6 แสดงเครื่องแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry)	29
ภาพที่ 7 แสดงขั้นตอนการสกัดและวิเคราะห์โปรตีน	30
ภาพที่ 8 แสดงโปรตีนสเปกตรัมที่บันทึกหลังผ่านขั้นตอน mass spectrometry	31
ภาพที่ 9 แสดงการรวบรวมจำนวนผู้ป่วยในโครงการวิจัย	35
ภาพที่ 10 แสดงการจัดกลุ่มโปรตีนแบบเป็นลำดับขั้น (Hierarchical clustering analysis) (A) และ จัดกลุ่มโดยวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) (B) วิเคราะห์ด้วยวิธี unsupervised	39
ภาพที่ 11 แสดงการจัดกลุ่มโปรตีนแบบเป็นลำดับขั้น (Hierarchical clustering analysis) วิเคราะห์ด้วยวิธี supervised โดยพบ solid predominant แยกออกจากชนิดย่อยอื่นๆ.....	39
ภาพที่ 12 แสดงการจัดกลุ่มโดยวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) วิเคราะห์ด้วยวิธี supervised โดยพบ solid predominant แยกออกจากชนิดย่อยอื่นๆ	41

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 แสดงระยะปลอดโรคหลังผ่าตัดปอดในแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1	14
แผนภูมิที่ 2 แสดงระยะปลอดโรคและอัตราการอยู่รอดหลังผ่าตัดปอดในแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1-4	15
แผนภูมิที่ 3 แสดงอัตราการอยู่รอดหลังผ่าตัดปอดในตามชนิดย่อยของมะเร็งปอดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1-3	15
แผนภูมิที่ 4 แสดงระยะปลอดโรคหลังผ่าตัดปอดตามชนิดย่อยของมะเร็งปอดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1-4 โดยไม่ได้รับการรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัด (A) หรือ การรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัด (B), ระยะที่ 3-4 ที่ไม่ได้การรักษาเสริมด้วยการฉายแสง (C) หรือ ได้รับการรักษาเสริมด้วยการฉายแสง (D)	16
แผนภูมิที่ 5 แสดงอุบัติการณ์การกลับเป็นซ้ำของโรค (A), ระยะเวลาการอยู่รอดหลังโรคกลับเป็นซ้ำ (B) หลังได้รับการผ่าตัดแบ่งตามชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1	17
แผนภูมิที่ 6 แสดงระยะเวลาปลอดโรค (disease free survival) เปรียบเทียบระหว่าง solid และ non-solid pattern.....	47
แผนภูมิที่ 7 แสดงระยะเวลาการอยู่รอด (overall survival) เปรียบเทียบระหว่าง solid และ non-solid pattern.....	47
แผนภูมิที่ 8 แสดงมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 2-3 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม solid pattern และกลุ่ม non-solid pattern ตามระยะเวลาปลอดโรค (A) และระยะเวลาการอยู่รอด (B), มะเร็งปอดระยะที่ 2-3 ที่ได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด ตามระยะเวลาปลอดโรค (C) และระยะเวลาการอยู่รอด (D).....	49

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

NSCLC	Non small cell lung cancer
EGFR	Epidermal growth factor receptor
TKI	Tyrosine kinase inhibitor
IHC	Immunohistochemistry
WHO	World health organization
TTF-1	Thyroid transcription factor-1
AIS	Adenocarcinoma in situ
MIA	Minimally invasive adenocarcinoma
CK	Cytokeratin
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
MS	Mass spectrometry
LC	Liquid chromatography
PCA	Principal component analysis

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย

โรคมะเร็งปอด เป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญในประชากรทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย และอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งสูงขึ้นเรื่อยๆ⁽¹⁾ ในประเทศไทย มะเร็งปอด เป็นโรคที่พบมากและเป็นสาเหตุการตาย ในอันดับต้นๆทั้งในเพศชายและหญิงและอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งกำลังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ธรรมชาติทางชีววิทยาของมะเร็งปอด ทำให้เราพบผู้ป่วยแม้จะเริ่มมีอาการ แต่โรคกลับมีการลุกลาม และแพร่กระจายไปแล้ว โดยอัตราการรอดชีพที่ 5 ปีเฉลี่ยประมาณร้อยละ 15 เป็นผลให้ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 90 เสียชีวิตจากโรคมะเร็งภายในเวลา 1-2 ปี ผู้ป่วยในระยะเริ่มต้นที่ได้รับการผ่าตัด ยังพบผู้ป่วยจำนวนหนึ่งที่มีการกลับเป็นซ้ำของโรค แม้จะได้รับการรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัด ภายหลังการผ่าตัด⁽²⁾

มะเร็งปอดแบ่งออกเป็นมะเร็งปอดชนิด small cell lung cancer และมะเร็งปอดชนิด non small cell lung cancer ซึ่ง non - small cell lung cancer (NSCLC) มีจำนวนถึงร้อยละ 85 ในมะเร็งปอดทั้งหมดและเป็นชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (adenocarcinoma) มีจำนวนมากกว่าร้อยละ 50 ของ non - small cell lung cancer การเข้าใจชนิดของมะเร็งปอดและชีววิทยาของโรครวมทั้งการจำแนกชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา จะสามารถบอกพยากรณ์โรคและบอกแนวทางการเลือกใช้ได้

ปัจจุบัน การที่จะจำแนก ชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา จะเป็นการตรวจทางพยาธิวิทยาโดยการย้อมสีและส่องกล้องจุลทรรศน์ของเซลล์ที่แตกต่างกันของแต่ละชนิดย่อย เพื่อแยกว่าชนิดย่อยแบบใดมีลักษณะเด่นกว่าในก้อนมะเร็งนั้น โดยชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาได้มีการจำแนกกลุ่มแบบใหม่ในปี 2011⁽³⁾ เพื่อให้มีประโยชน์ในแง่การรักษา และการบอกพยากรณ์โรค แต่อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางพยาธิวิทยาแม้จะแยกตามชนิดย่อย ก็ไม่สามารถจะบอกความสำคัญได้ทั้งหมด อย่างเช่น การมีผลอ่านทางพยาธิวิทยาเหมือนกัน แต่ความรุนแรงของโรคต่างกัน โดยเฉพาะใน มะเร็งปอดระยะเริ่มต้น อาจจะต้องการตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) เพื่อจำแนกความแตกต่างดังกล่าว

แม้ว่าพยาธิวิทยาของมะเร็งปอดจะมีความสำคัญในด้านการรักษา แต่ข้อมูลความรู้ระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องหรือการกำหนดการแสดงออกทางพยาธิวิทยา ยังเป็นสิ่งที่มีการศึกษาค้นพบไม่มากและไม่ชัดเจน การเกิดมะเร็งปอดมีกระบวนการซับซ้อนหลายขั้นตอนซึ่งรวมถึงการกระตุ้นยีนส์ก่อมะเร็ง (oncogenes) เช่น EGFR, ras, c-kit และกดการทำงานของยีนส์ต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) เช่น p53, p16, FHIT⁽⁴⁾ การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมดังกล่าวสามารถส่งผลกระทบต่อการสร้างเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) และการแสดงออกของโปรตีน ส่งผลให้เกิดเป็นมะเร็ง ดังนั้นการเกิดมะเร็งปอดไม่สามารถที่จะเกิดจากยีนใดยีนหนึ่ง หรือโปรตีนเพียงอย่างเดียว ซึ่งจำเป็นต้องเข้าใจกลไกพื้นฐานทางชีววิทยาของมะเร็ง เพื่อพัฒนาการรักษาให้มีประสิทธิภาพ จึงมีศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนในมะเร็งปอด และวิเคราะห์แบบแผนที่ผิดปกติของการแสดงออกของโปรตีน⁽⁵⁾

โปรตีโอม (Proteome) คือ โปรตีนทั้งหมดที่ผ่านกระบวนการแปลงจากรหัสพันธุกรรม ซึ่งโปรตีนเป็นเครื่องมือสำคัญอย่างหนึ่งในระดับเซลล์ โดยปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ ถูกกระตุ้นและควบคุมโดยเอนไซม์ การขนส่งโมเลกุลต่างๆ ถูกควบคุมโดยสัญญาณจากโปรตีน การแสดงออกของยีน การนำพลังงานไปใช้ในการทำงานต่างๆ ก็ล้วนถูกควบคุมโดยโปรตีน ข้อมูลเกี่ยวกับความผิดปกติของรหัสพันธุกรรมอาจสามารถตรวจพบด้วยการศึกษาโปรตีน เพราะฉะนั้นเพื่อศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนทั้งหมด ทำให้ช่วยบอกว่ามีความผิดปกติในเซลล์นั้นๆ⁽⁵⁾

ส่วนคำว่าโปรตีโอมิกส์ (Proteomics)⁽⁶⁾ เป็นการศึกษาโปรตีนในแง่ต่างๆ ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ รวมถึงจำแนกกระบวนการต่างๆ ที่มีโปรตีนเกี่ยวข้อง ซึ่งโปรตีโอมิกส์ อาจจะช่วยจำแนกกลุ่มของมะเร็งปอดในแง่การรักษาหรือพยากรณ์โรคได้ดีกว่าการแยกโดยลักษณะทางพยาธิวิทยาแบบปัจจุบัน

การศึกษานี้จึงต้องการศึกษาเกี่ยวกับแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ เพื่อช่วยจำแนกกลุ่มของมะเร็งปอดในระดับโมเลกุล โดยเฉพาะกลุ่มที่เป็นมะเร็งปอดระยะเริ่มต้นที่ผ่าตัดได้

1.2. คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก (Primary research question) แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ในเนื้อเยื่อ มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดย่อยทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา หรือไม่

คำถามรอง (Secondary research question) แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา มีความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอด, การได้รับการรักษาเสริมหลังผ่าตัด, การกลับเป็นซ้ำของโรค หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความแตกต่างของแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ในเนื้อเยื่อระหว่างแต่ละชนิดย่อยทางพยาธิ

วิทยาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

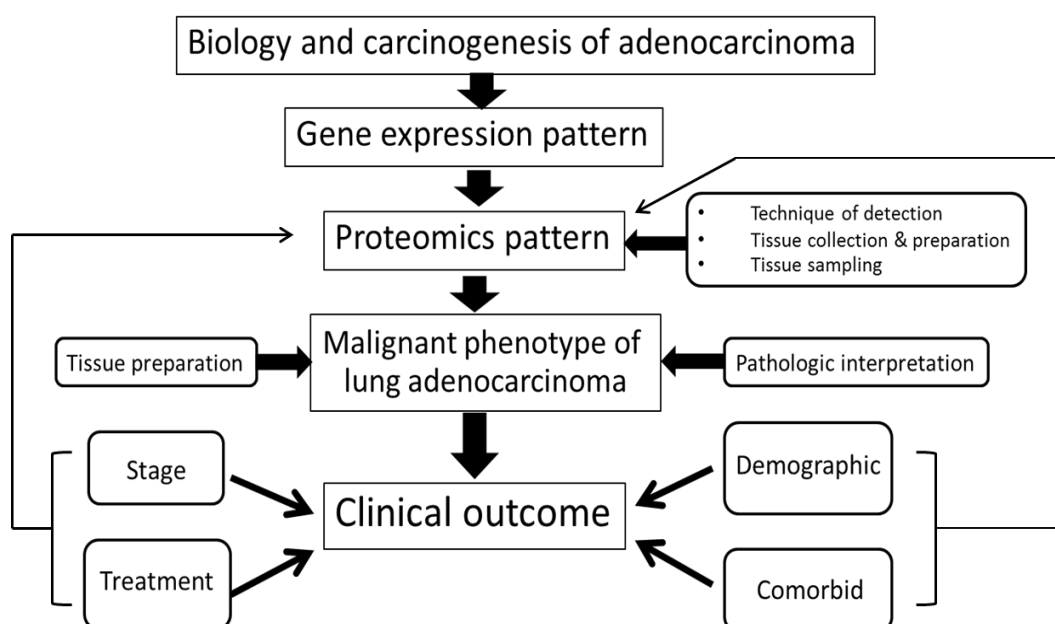
2. เพื่อศึกษาว่าแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา มีความสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอด, การได้รับการรักษาเสริมหลังผ่าตัด, การกลับเป็นซ้ำของโรค หรือไม่

1.4 สมมุติฐาน

Ho : แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ไม่มีความแตกต่างระหว่างแต่ละชนิดย่อยทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

Ha : แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์มีความแตกต่างระหว่างแต่ละชนิดย่อยทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น

- วันที่ได้รับการวินิจฉัย คือ วันที่มีผลทางพยาธิวิทยายืนยันว่าเป็น มะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

- วันที่โรคกลับเป็นซ้ำ คือ วันที่มีการตรวจทางคลินิกหรือการตรวจทางรังสีวิทยาหรือมีผลชิ้นเนื้อ

ยืนยันว่ามีการกลับเป็นซ้ำของโรคร่วมกับในประวัติการรักษามีบันทึกว่าโรคกลับเป็นซ้ำ

- มะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาภายในก้อนเดียวกัน มีความแตกต่างทางพยาธิวิทยาของชนิดย่อยได้หลากหลาย (heterogeneity) แต่ข้อตกลงในการศึกษานี้คือ มะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาภายในก้อนเดียวกันนั้น ไม่มีความแตกต่างทางพยาธิวิทยาของชนิดย่อย (homogeneous)

1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย

- Overall survival (OS) ระยะเวลาตั้งแต่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งปอด จนถึงเสียชีวิต
- Disease free survival (DFS) ระยะเวลาตั้งแต่ได้รับการผ่าตัด จนถึงโรคกลับเป็นซ้ำรวมเสียชีวิต

1.8 ข้อจำกัดทางการวิจัย

- ค่าที่ได้จากการตรวจชิ้นเนื้อ อาจไม่เที่ยงตรงได้ ถ้าชิ้นเนื้อเก็บไม่ดีหรือมีอายุานเกินไป
- ข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลทางคลินิกอาจเก็บได้ไม่ครบถ้วน เนื่องจากการศึกษาแบบย้อนหลัง (retrospective analysis)
- มีขั้นตอนในการเตรียมงานหลายขั้นตอน โดยระยะเวลาดำเนินงานมีจำกัด อาจทำให้ได้ข้อมูลที่จะวิเคราะห์ไม่ครบถ้วน
- ยังไม่มีข้อมูลเบื้องต้นเพียงพอที่จะนำมาคำนวณขนาดประชากรได้ (sample size)

1.9 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

- ทราบถึงแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ เพื่อดูความแตกต่างระหว่างแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาได้
- ทราบถึงความสัมพันธ์ของแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์กับปัจจัยอื่นๆได้แก่ อัตราการอยู่รอด, การได้รับการรักษาเสริมหลังผ่าตัด และการกลับเป็นซ้ำของโรค โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเลือกการรักษาในผู้ป่วยแต่ละรายได้เหมาะสมยิ่งขึ้น

1.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข

- อาจไม่สามารถนำชิ้นเนื้อมาย้อมเพิ่มเติมได้เนื่องจากเป็นชิ้นเนื้อที่เก็บโดยวิธีแช่แข็งทำให้มีการบิดเบือนของ morphology ของเซลล์และยากต่อการจำแนกชนิดย่อยของ adenocarcinoma ชิ้นเนื้อที่มีขนาดเล็กอาจไม่เป็นตัวแทนของประชากรที่ดี หรือชิ้นเนื้อที่เก็บไว้มีการเสื่อมคุณภาพจากกระบวนการเก็บหรือสกัดโปรตีน แก้ไขเรื่องการจำแนกชนิดย่อยของพยาธิวิทยาโดยดูชิ้นเนื้อจากที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลิน (Hematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) ครั้งแรก หรือถ้าไม่พบชิ้นเนื้อที่ย้อมสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน จึงคัดออกจากการศึกษา

- ข้อมูลในเวชระเบียนไม่ครบถ้วนเพียงพอ แก้ไขโดยสอบถามข้อมูลทางโทรศัพท์



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา มีความหลากหลายในแง่ของพยาธิวิทยา ซึ่งเป็นเรื่องยากในการจัดหมวดหมู่ให้มีความเกี่ยวข้องกันทั้งทางคลินิกและชีวภาพ ซึ่งปี 2004 โดยองค์การอนามัยโลก หรือ WHO ได้จัดหมวดหมู่จำแนกประเภทของมะเร็งปอด⁽⁷⁾ เนื่องจากข้อมูลทางพยาธิวิทยาของโรคมะเร็งปอดได้มีการเติบโตอย่างมากรวมทั้งพยาธิวิทยาด้านโมเลกุลที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาการรักษา ความก้าวหน้าดังกล่าวมีผลกระทบที่สำคัญในแง่ของการตัดสินใจให้การรักษา ต่อมาในปี 2011 มีความเข้าใจด้านชีววิทยาของมะเร็งปอดมากขึ้น จึงได้มีการจำแนกประเภทแบบใหม่ตามชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา เพื่อลดความสับสนของนิยามคำศัพท์และเกณฑ์ที่ใช้ในการวินิจฉัย เนื่องจากก่อนมะเร็งมักจะถูกประกอบด้วยหลากหลายแบบแผนทางพยาธิวิทยา ซึ่งการจำแนกแบบปี 2004 อาจจะแยกได้ไม่ชัดเจน แต่ในปี 2011 จะจำแนกตามความเด่นของชนิดย่อยของอะดีโนคาร์ซิโนมาโดยเฉพาะส่วนที่มีการลุกลาม หรือ invasive part (predominant pathologic subtype)

การวินิจฉัยและการจัดแบ่งกลุ่มทางพยาธิวิทยา(Histologic classification)⁽⁸⁾

การแบ่งการจำแนกกลุ่มตามพยาธิวิทยาแบบใหม่ของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (ตารางที่ 1) การรักษาด้วยวิธีการใหม่ๆและการเข้าใจชีววิทยา ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการจัดกลุ่มดังกล่าว ซึ่งเดิมแบ่งตามองค์การอนามัยโลก หรือ World Health Organization (WHO) ล่าสุดเมื่อปี 2004 โดยสิ่งที่เปลี่ยนแปลง คือ

1. ต้องมีสหสาขาวิชาชีพร่วมกับพยาธิแพทย์ คือมีแพทย์, นักชีวโมเลกุล, รังสีแพทย์ และ ศัลยแพทย์ ภายใต้ผู้สนับสนุนคือ International Association for the Study of Lung Cancer(IASLC), the American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS)

2. มีการทบทวนผลของการวินิจฉัย การรักษาและการจำแนกกลุ่มของการใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อ ที่เป็น small biopsy and cytologyซึ่งมีขนาดประมาณ 70%ของแบบเดิม

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มตามพยาธิวิทยาของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาตามแบบเดิมปี 2004 WHO และ ปัจจุบันแบ่งตาม IASLC/ATS/ERS⁽³⁾

2004 WHO classification	IASLC/ATS/ERS classification	Major changes in the new IASLC/ATS/ERS classification
Mixed subtype Acinar Papillary BAC Non mucinous Mucinous Mixed Solid adenocarcinoma Colloid Fetal Mucinous cystadenocarcinoma Signet-ring Clear-cell	Pre-invasive lesions Atypical adenomatous hyperplasia AIS Non-mucinous Mucinous Mixed MIA Non-mucinous Mucinous Mixed Invasive adenocarcinomas Lepidic predominant Acinar predominant Papillary predominant Micropapillary predominant Solid predominant with mucin production Variants of invasive adenocarcinomas IMA Colloid Fetal Enteric	<ul style="list-style-type: none"> • Discontinuation of the term BAC • Discontinuation of the mixed subtype • Comprehensive pathologic subtyping in 5% increments and classification of adenocarcinomas according to the predominant subtype • Introduction of AIS and MIA as new entities • Introduction of micropapillary adenocarcinoma as a predominant subtype • Introduction of lepidic predominant adenocarcinoma and lepidic growth as new terminologies • Exclusion of signet-ring and clear cell adenocarcinomas

Abbreviations: WHO, World Health Organization; IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer; ATS, American Thoracic Society; ERS, European Respiratory Society; BAC, bronchioloalveolar carcinoma; AIS, adenocarcinoma in situ; MIA, minimally invasive adenocarcinoma; IMA, invasive mucinous adenocarcinoma.

วิธีวินิจฉัยและนิยามคำศัพท์สำหรับ small biopsies/cytology

เกณฑ์มาตรฐานของลักษณะทางพยาธิวิทยาสำหรับมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (ตารางที่ 2) คือ พบมีglandular differentiation หรือมี mucin แต่ถ้าเป็นชนิดเยื่อบุพื้นผิว (squamous cell carcinoma) จะพบ keratinization, pearls หรือ intercellular bridges ถ้ามีสิ่งเหล่านี้สามารถวินิจฉัยได้เลยโดยไม่ต้องใช้เครื่องมืออื่น ในส่วนของชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา มีการอธิบายลักษณะว่าแบ่งเป็น lepidic, acinar, papillary, micropapillary, solid แต่ถ้าก้อนมะเร็งนั้นไม่ได้มีลักษณะตามเกณฑ์ ที่จะบ่งบอกว่าเป็น glandular หรือ squamous features ปัจจุบันตามข้อปฏิบัติ แนะนำว่าให้ใช้การย้อมimmunohistochemistry เพื่อเก็บเนื้อเยื่อไว้ให้ได้มากที่สุดสำหรับการตรวจระดับโมเลกุลต่อไป

Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ (marker) สำหรับมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา, Napsin A เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ ที่จำเพาะที่สุดสำหรับชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ในทางปฏิบัติมักใช้ TTF-1สำหรับชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาและ P63 สำหรับมะเร็งชนิดเยื่อบุพื้นผิว (squamous cell carcinoma) นอกจากนั้นยังมี P40 (จำเพาะที่สุด) หรือ CK 5/6 (cytokeratin 5/6) เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ สำหรับมะเร็งชนิดเยื่อบุพื้นผิว (squamous cell carcinoma)⁽⁹⁾ แต่ถ้าไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีการดังกล่าวก็จะจัดว่าเป็นกลุ่ม NSCLC-not otherwise specified (NOS) ซึ่งในกลุ่มนี้มักพบไม่เกิน 5% ส่วนบางตัวอย่างขึ้นเนื้ออาจจะมีลักษณะ หรือ immunohistochemical ที่เข้าได้ทั้ง มะเร็งชนิดเยื่อบุพื้นผิว (squamous) และ ชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา เนื่องจาก P63 สามารถมีผลเป็นบวกได้ถึง 1/3 ของอะดีโนคาร์ซิโนมา ซึ่งก็จะมีบางก้อนมะเร็งที่ย้อมติดทั้ง P63 และ TTF-1 แล้วก็เป็นชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา แต่ก็ไม่สามารถตัดการวินิจฉัย adenosquamous ไปได้

ตารางที่ 2 แสดงการวินิจฉัย, นิยามศัพท์และคำแนะนำในเนื้อเยื่อขนาดเล็ก⁽³⁾

Pathologic characteristics	2004 WHO terminology	IASLC/ATS/ERS terminology
Clear morphologic features present		
Presence of glands or mucin	Adenocarcinoma. Patterns are described if clearly present	Adenocarcinoma. Describe patterns if clearly present. Considerations: AIS/MIA cannot be diagnosed in small biopsies; if pure lepidic pattern/growth seen, add comment on invasive adenocarcinoma cannot be excluded nor assumed
Presence of keratinization, pearls or intercellular bridges	Squamous-cell carcinoma	Squamous-cell carcinoma
No morphologic features but distinctive positive immunostaining		
TTF-1 (or napsin A)	No specific terminology. Usually diagnosed as solid adenocarcinomas	NSCLC-favor adenocarcinoma
p63 (or p40 or CK 5/6)	No specific terminology	NSCLC-favor squamous-cell carcinoma
Conflicting results of morphology and IHC (Mixed)	No clear recommendations	Individualize. Considerations: adenosquamous tumors can only be diagnosed in resection specimens with >10 % of each component present; almost all TTF-1 and p63 positive are adenocarcinomas
No differentiation by morphology or IHC (both negative)	Large-cell carcinoma	NSCLC-NOS. Considerations: avoid the use of the term large-cell carcinoma in small specimens (restricted to resection specimens); this term should be used as little as possible

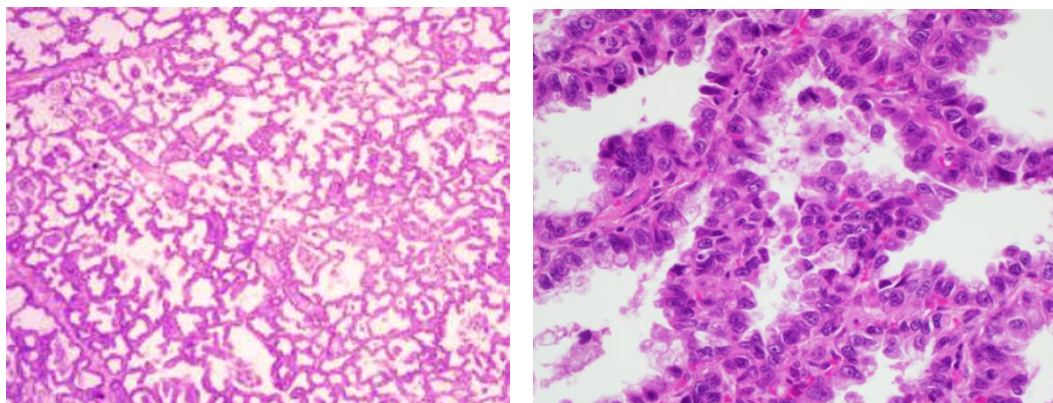
Abbreviations: แสดงการวินิจฉัย, นิยามศัพท์และคำแนะนำในเนื้อเยื่อขนาดเล็ก (3)WHO, World Health Organization; IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer; ATS, American Thoracic Society; ERS, European Respiratory Society; AIS, adenocarcinoma in situ; MIA, minimally invasive adenocarcinoma; NSCLC, non-small-cell lung cancer; NOS, not otherwise specified; IHC, immunohistochemistry.

มะเร็งปอดแบบลุกลามชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (Invasive adenocarcinomas)

จำแนกตามชนิดย่อยที่เด่น (predominant pathologic subtype)^(3, 8, 10)

1. Lepidic predominant adenocarcinoma

มีลักษณะคล้าย AIS (adenocarcinoma in situ) ร่วมกับ MIA (minimally invasive adenocarcinoma) แต่ต้องมีอย่างน้อยหนึ่งลักษณะดังนี้คือ >5 มิลลิเมตรของก้อนมะเร็ง, ขนาดก้อนมะเร็งที่เห็นด้วยตาเปล่า > 3 เซนติเมตร, ลุกลามเข้าไปในหลอดน้ำเหลือง, หลอดเลือดหรือเยื่อหุ้มปอด, มีการตายของก้อนมะเร็ง



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ lepidic predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์

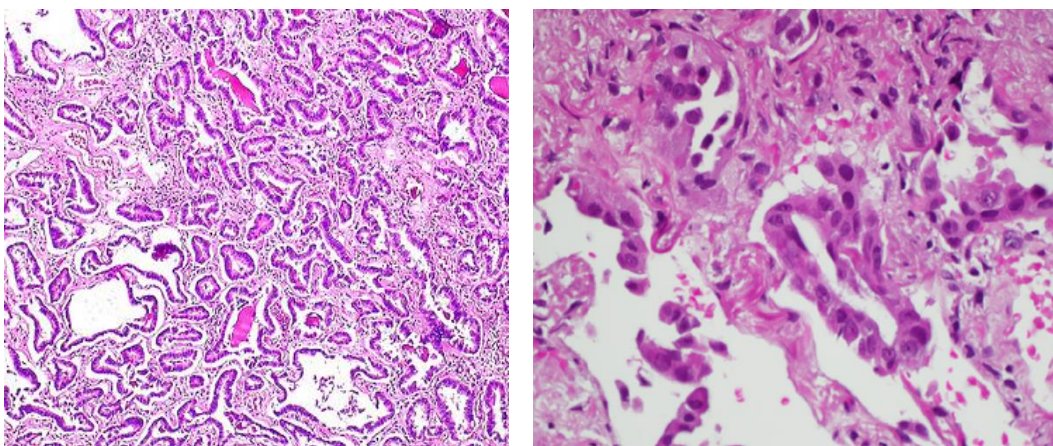
ลักษณะอื่นๆทางพยาธิวิทยา เช่น ยังคงมีโครงสร้างของ alveolar, มักมีการหนาตัวของ alveolar septa, เป็น cuboidal epithelium, ไม่มีโครงสร้างของ papillary Lepidic predominant พยากรณ์โรคดีที่สุด

2. Acinar predominant adenocarcinoma

เป็นชนิดย่อยที่พบบมากที่สุดถึง 40% ของ invasive adenocarcinoma ลักษณะทางพยาธิวิทยาประกอบด้วย ต่อมที่มีลักษณะกลมหรือรี ซึ่งมีบริเวณที่เป็นโพรง(lumen) ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์มะเร็ง

3. Papillary predominant adenocarcinoma

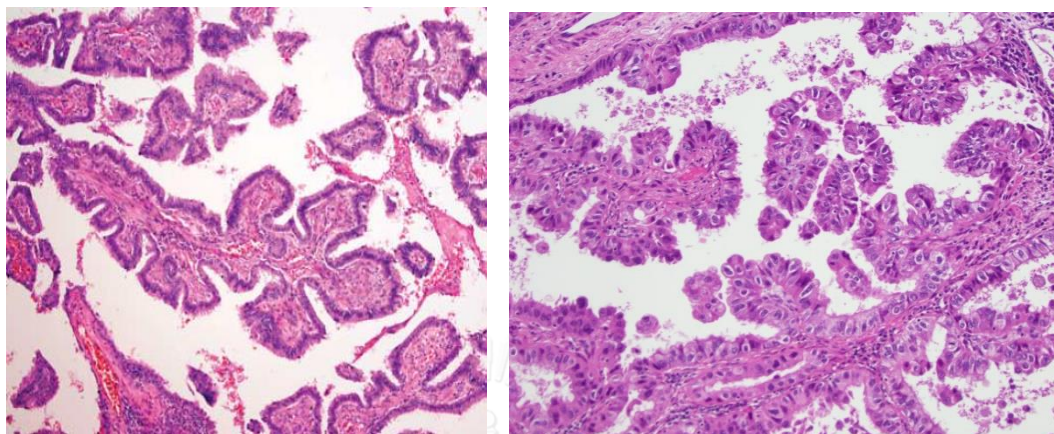
ลักษณะทางพยาธิวิทยาเป็นเซลล์ที่เป็นต่อม (glandular) และ growing along fibrovascular cores ⁽¹¹⁾



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ acinar predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์

3. Papillary predominant adenocarcinoma

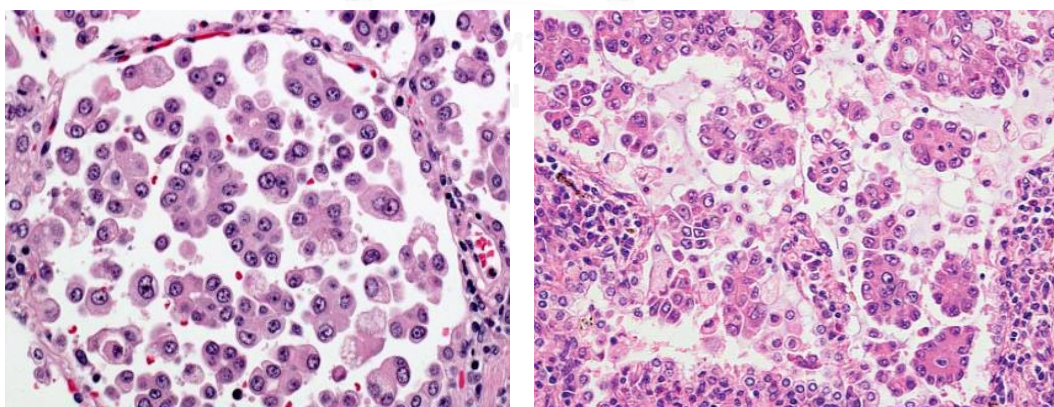
ลักษณะทางพยาธิวิทยาเป็นเซลล์ที่เป็นต่อม (glandular) และ growing along fibrovascular cores⁽¹¹⁾



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ papillary predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์

4. Micropapillary predominant adenocarcinoma

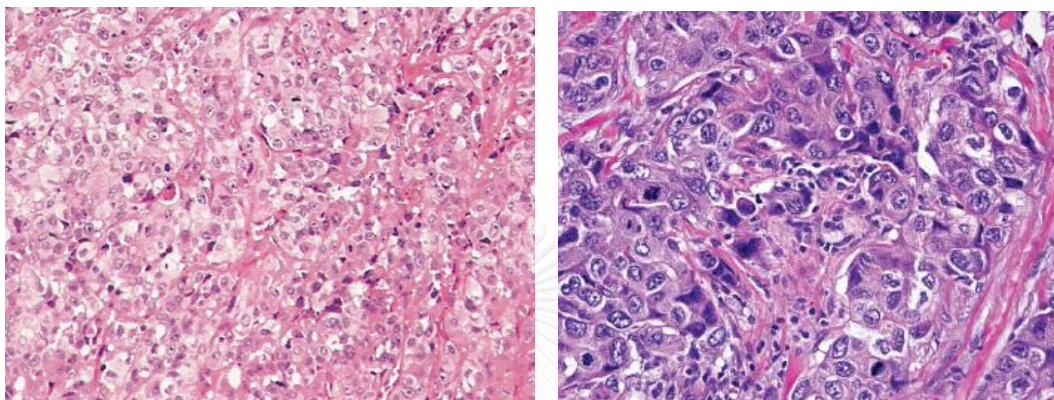
ลักษณะทางพยาธิวิทยาเป็นเซลล์ที่เป็นต่อม (glandular) ที่ growing in small papillary tufts แต่ไม่มี fibrovascular cores



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ micropapillary predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์

5. Solid predominant adenocarcinoma

ลักษณะทางพยาธิวิทยาประกอบด้วย polygonal tumor cells ซึ่งรวมเป็นแผ่นแน่นๆและมี cytoplasm จำนวนมาก รวมทั้งไม่ได้มีลักษณะแบบแผนจำเพาะของชนิดย่อยอื่น (lepidic, acinar, papillary or micropapillary) ลักษณะ clear cell และ signet ring features พบว่าสัมพันธ์กับ solid predominant ซึ่ง solid adenocarcinoma มีพยากรณ์โรคที่ไม่ดี⁽¹¹⁻¹⁵⁾



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของ solid predominant adenocarcinoma จากกล้องจุลทรรศน์

จะเห็นได้ว่าการจำแนกชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ยังคงใช้รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ทางพยาธิวิทยาเป็นหลัก ไม่ได้มีการนำเอาคุณสมบัติทางชีววิทยาของแต่ละชนิดย่อยมาใช้จำแนก อีกทั้งยังมีความคลุมเครือระหว่างชนิดได้ จึงนำไปสู่การศึกษาแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์เพื่อที่จะจำแนกชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาในระดับโมเลกุล ซึ่งอาจทำให้แยกชนิดย่อยได้ดียิ่งขึ้น

ความสำคัญในการเข้าใจชนิดย่อยของมะเร็งปอดในระยะเริ่มต้นและมะเร็งระยะลุกลามเฉพาะที่

ชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาโดยแบ่งตามความเด่น (predominant) สามารถเปลี่ยนแนวทางการรักษาในปัจจุบัน คือ

1. มีผลกับTNM staging โดยวัด invasive tumor size มากกว่าที่จะวัด total tumor size ซึ่งจะเป็นตัวชี้วัดของการอยู่รอด (independent predictor of survival) และดีกว่าขนาดของก้อนมะเร็งที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าในหลายๆรายงาน^(11, 16, 17) และ การเข้าใจชนิดย่อยใน multiple

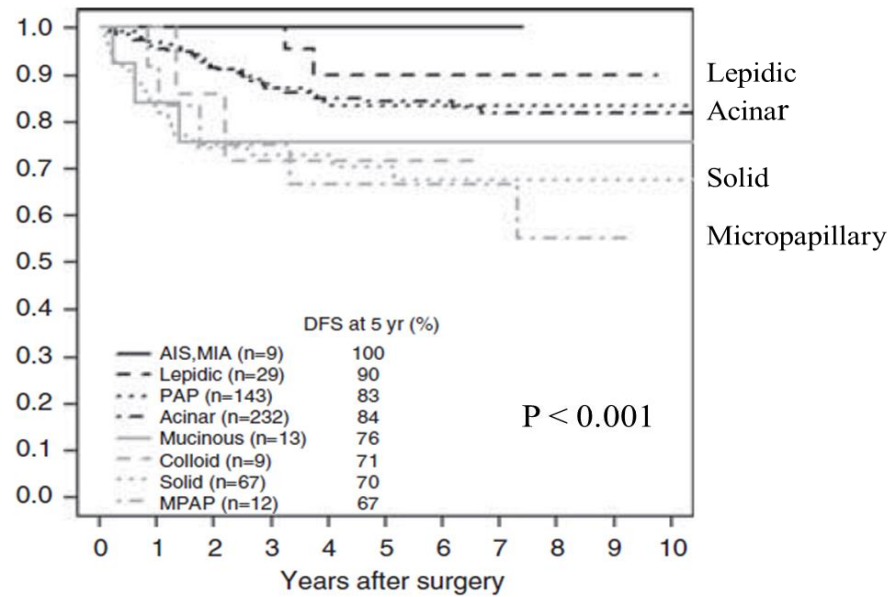
lung nodule อาจจะช่วยบ่งบอกว่าเป็น intrapulmonary metastasis หรือเป็น primary tumor ได้ด้วย⁽⁸⁾

2. ชนิดย่อยแต่ละชนิดจะมีระยะเวลาปลอดโรค (disease free survival) แตกต่างกัน เช่น lepidic predominate subtype มีระยะเวลาปลอดโรคที่ดีกว่า คือ 75-85% ที่ 5 ปี, acinar และ papillary subtype มีพยากรณ์โรคระดับปานกลาง ระยะเวลาปลอดโรคที่ 5 ปีเป็น 50-70%, solid and micropapillary predominant tumor มีพยากรณ์โรคที่แย่ที่สุด คือ ระยะเวลาปลอดโรคที่ 5 ปีเป็น 30-40%⁽¹⁸⁻²⁰⁾

3. ใช้เป็น predictive สำหรับประโยชน์ของ adjuvant chemotherapy ซึ่งมีรายงานใน World Conference of Lung Cancer ปี 2013 โดยพบว่า adjuvant chemotherapy กับ pathologic subtypes มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.007$), ส่วน micropapillary and solid subgroup มี significant DFS benefit from adjuvant chemotherapy (HR =0.58, 95% CI: 0.43-0.80, $P<0.001$) เมื่อเทียบกับ acinar and papillary subgroup (HR =1.12, 95% CI: 0.79-1.59, $P=0.53$)⁽¹⁷⁾

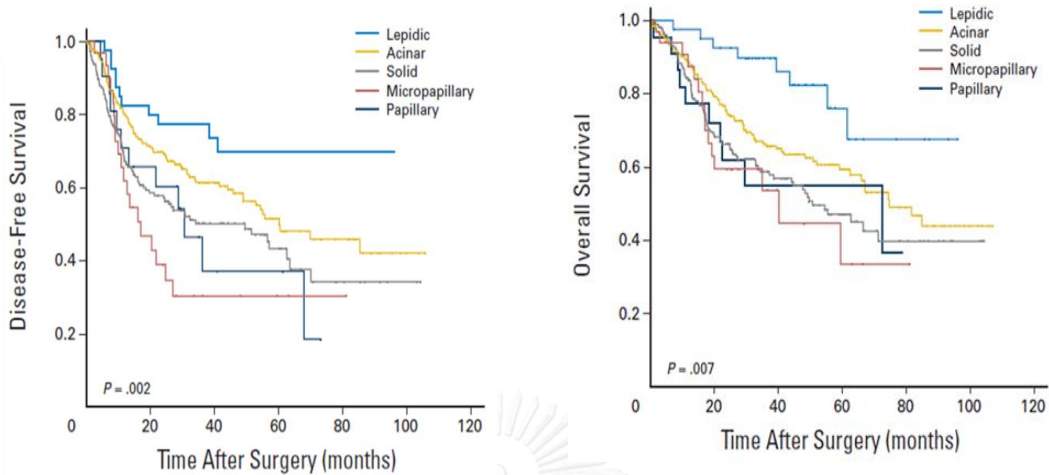
4. ชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ยังมีผลกับการรักษาด้วยการผ่าตัด เป็นที่รู้กันดีว่า lobectomy with systematic nodal dissection หรือ lymph node sampling ยังคงเป็นสิ่งที่ต้องทำในการรักษามะเร็งปอดระยะต้น แต่อย่างไรก็ตามการผ่าตัดแบบ limited resections (segmentectomy or wedge resections) อาจจะเป็นทางเลือกสำหรับก้อนมะเร็งขนาดเล็ก (2 เซนติเมตร) และก้อนที่อยู่แนวรอบ (peripheral tumors) ในบางราย แต่ไม่มี prospective data ที่ช่วยยืนยันในขณะนี้ พยากรณ์โรคสัมพันธ์กับชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาสำหรับการผ่าตัดปอดระยะที่ 1 ซึ่งมีสมมติฐานพบว่าไม่เพียงแต่ขนาดก้อนมะเร็งเท่านั้น แต่ชนิดย่อยทางพยาธิวิทยายังช่วยเป็นแนวทางในการเลือกวิธีผ่าตัดได้อีกด้วย

แผนภูมิที่ 1 แสดงระยะปลอดโรคหลังผ่าตัดปอดในแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิ



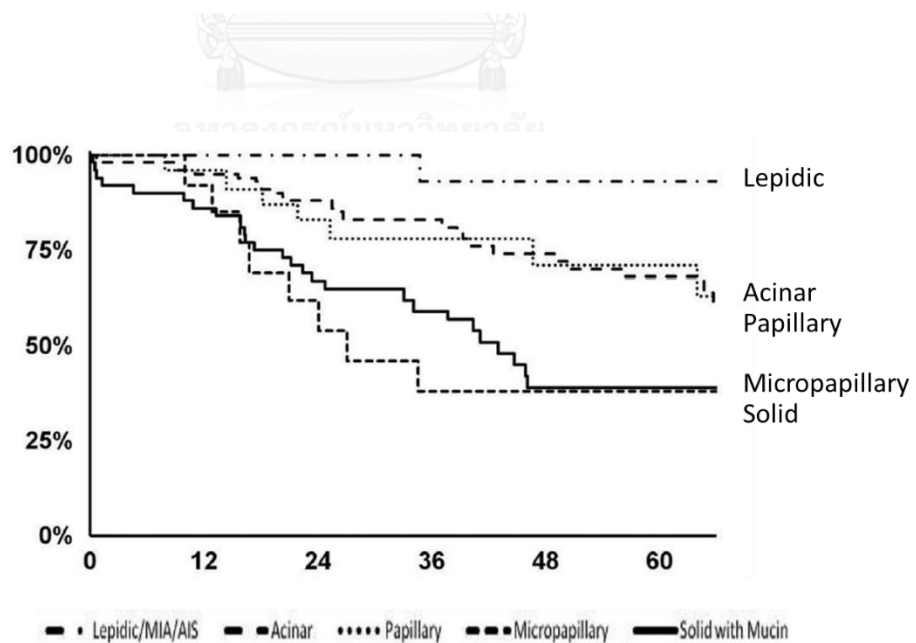
จากการศึกษา retrospective study ของ Yoshizawa A และคณะ⁽¹¹⁾ รวบรวมผู้ป่วย มะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาที่ได้รับการผ่าตัดปอดระยะที่ 1 จำนวน 514 คน พบว่าระยะปลอดโรคที่ 5 ปีใน micropapillary 67% และ solid 70% ซึ่งแย่กว่าใน lepidic, acinar subtype ซึ่งมีระยะปลอดโรคที่ 5 ปี เป็น 90% และ 84% ตามลำดับ (แผนภูมิที่ 1)

แผนภูมิที่ 2 แสดงระยะปลอดโรคและอัตราการอยู่รอดหลังผ่าตัดปอดในแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1-4



การศึกษา cohort study ของ Warth A และคณะ⁽¹⁹⁾ รวบรวมผู้ป่วยมะเร็งปอดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1-4 ที่ได้รับการผ่าตัดปอด 500 คน พบว่าระยะปลอดโรคและอัตราการอยู่รอดของ solid และ micropapillary subtype แย่กว่า lepidic และ acinar subtype (แผนภูมิที่ 2)

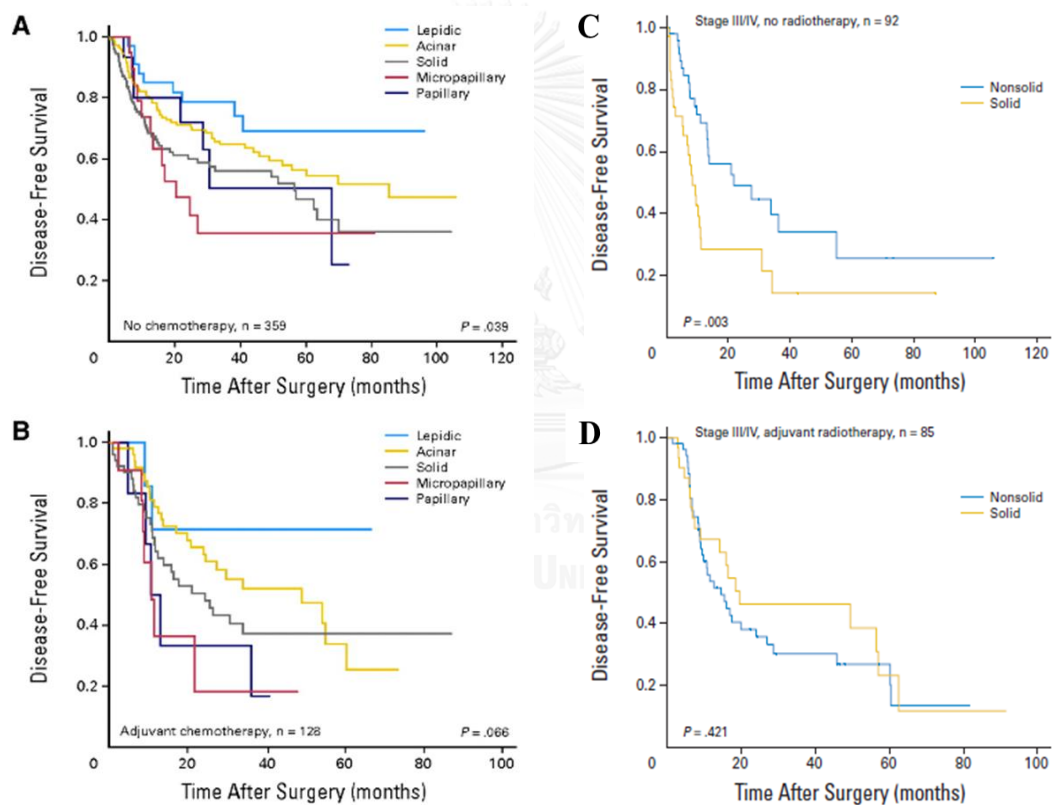
แผนภูมิที่ 3 แสดงอัตราการอยู่รอดหลังผ่าตัดปอดในตามชนิดย่อยของมะเร็งปอดอะดีโนคาร์ซิโนมา



จากการศึกษา retrospective study ของ Russell PA และคณะ⁽¹⁸⁾ รวบรวมผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด อะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1-3 ที่ได้รับการผ่าตัดปอดจำนวน 210 คน พบว่า lepidic

predominant (รวม AIS, MIA) มีอัตราการอยู่รอดที่ 5 ปีที่ดีที่สุดคือ 93% (18 คน) รองลงมาคือ acinar 68% (84 คน) และ papillary 71% (26 คน) ส่วน micropapillary 38% (14 คน) และ solid 39% (49 คน) มีอัตราการอยู่รอดที่ 5 ปีแย่มากที่สุด (แผนภูมิที่ 3)

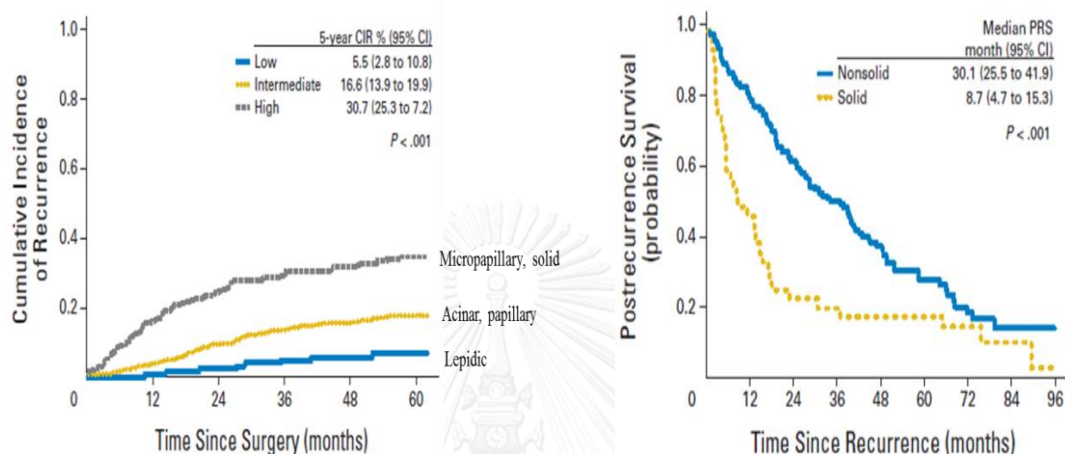
แผนภูมิที่ 4 แสดงระยะปลอดโรคหลังผ่าตัดปอดตามชนิดย่อยของมะเร็งปอดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1-4 โดยไม่ได้รับการรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัด (A) หรือ การรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัด (B), ระยะที่ 3-4 ที่ไม่ได้รับการรักษาเสริมด้วยการฉายแสง (C) หรือ ได้รับการรักษาเสริมด้วยการฉายแสง (D)



จากการศึกษา cohort study ของ Warth A และคณะ⁽¹⁹⁾ ศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งปอดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1-4 ที่ได้รับการผ่าตัดปอด พบว่าการได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัดกลุ่ม solid subtype มีระยะปลอดโรคดีขึ้น ขณะที่ papillary และ micropapillary ไม่ดีขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.066) (แผนภูมิที่ 4A, 4B) ส่วนการได้รับการรักษาเสริมฉายแสงในมะเร็งปอดระยะ 3-4 พบว่ากลุ่ม solid มีแนวโน้มระยะปลอดโรคดีกว่ากลุ่ม non-solid subtype แต่ไม่มีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p=0.421$) (แผนภูมิที่ 4C, 4D) ซึ่งอาจจะเป็นการช่วยบ่งบอกว่ากลุ่ม solid subtype น่าจะได้ประโยชน์จากการให้การรักษาเสริมหลังผ่าตัด

แผนภูมิที่ 5 แสดงอุบัติการณ์การกลับเป็นซ้ำของโรค (A), ระยะเวลาการอยู่รอดหลังโรคกลับเป็นซ้ำ (B) หลังได้รับการผ่าตัดดัดแปลงตามชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาในระยะที่ 1



โดยจากการศึกษาแบบย้อนหลังของ Ujiie H.⁽²¹⁾ รวบรวมผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาในระยะที่ 1 ที่ได้รับการผ่าตัดปอดจำนวน 1120 คน พบว่าหลังผ่าตัดจะมีโรคกลับเป็นซ้ำที่ 5 ปีในกลุ่มชนิดย่อยที่เป็น micropapillary และ solid สูงที่สุด คือ 40.9% และ 29.1% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ lepidic, acinar และ papillary ซึ่งจะมีโรคกลับเป็นซ้ำที่ 5 ปีเป็น 6.8%, 16.6% และ 16.6% ตามลำดับ (แผนภูมิที่ 5A) โดย micropapillary predominant มักจะมีการกลับเป็นซ้ำของโรคแบบเฉพาะที่⁽²²⁾ ส่วน solid predominant มักจะมีการกลับเป็นซ้ำของโรคแบบแพร่กระจายไปอวัยวะที่ไกลออกไป ส่วนระยะเวลาการอยู่รอดหลังโรคกลับเป็นซ้ำในกลุ่ม solid predominant ต่ำที่สุด คือ 8.7 เดือน ขณะที่ micropapillary, papillary, acinar มีระยะเวลาการอยู่รอดหลังโรคกลับเป็นซ้ำอยู่ที่ 43.8, 38.1, 27.6 เดือน ตามลำดับ (แผนภูมิที่ 5B)

ความสำคัญของชนิดย่อยของมะเร็งปอดกับการรักษาในระยะแพร่กระจาย

การรักษามีความแตกต่างระหว่างมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา และ ชนิดเยื่อหุ้มผิว (squamous cell carcinoma) ในระยะแพร่กระจาย การเลือกวิธีการรักษาต้องใช้ความรู้ด้านโมเลกุล เป็นอย่างแรก ในรายที่มี EGFR mutation และ ALK rearrangements จะมีการตอบสนองดีต่อการให้ EGFR TKI inhibitors (gefitinib, erlotinib, afatinib) และ ALK inhibitors (crizotinib)

(23, 24) โดยทดสอบ EGFR and ALK mutation ใช้ในการตรวจ adenocarcinoma, NSCLC-favor adenocarcinoma and NSCLC-NOS, ในขณะที่ squamous tumors จะไม่ใช่ตรวจ และพบว่าไม่มี ความสอดคล้องกันระหว่าง solid and mucinous predominant tumors กับ EGFR mutations, ไม่มีความสอดคล้องระหว่างการมีส่วนของ lepidic กับ K-RAS mutations, มีความสอดคล้อง ระหว่าง ALK rearranged และ solid signet-ring cell pattern หรือ ลักษณะ mucinous cribriform (18-19)

การรักษา มะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

1. การผ่าตัด

การรักษาหลักในผู้ป่วยมะเร็งปอด คือ การผ่าตัด ส่วนมากสามารถผ่าตัดได้ในระยะที่ 1, 2 และ 3A บางราย การทำผ่าตัดอาจจะเป็น wedge resection, segmental resection, lobectomy หรือ pneumonectomy

2. การฉายแสง

การให้การรักษาเสริม จะมีที่ใช้ในผู้ป่วยบางรายเพื่อหวังผลในการควบคุมโรค เช่น ผู้ป่วยที่ไม่สามารถผ่าตัดได้หมด หรือมีการแพร่กระจายของโรคไปที่ต่อมน้ำเหลืองบริเวณซั้วปอด (hilum) หรือ ช่องอก (mediastinum) การให้การรักษาเสริมโดยการฉายแสงหลังผ่าตัดจะช่วยเพิ่มอัตราการควบคุมโรคเฉพาะที่ ส่วนการฉายแสงร่วมกับเคมีบำบัด จะทำในรายที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ หรือ เพื่อช่วยลดขนาดของก้อนเนื้ออกในรายที่มีแนวโน้มจะผ่าตัดได้

3. เคมีบำบัด

ปัญหาที่สำคัญในการรักษา มะเร็งปอดหลังผ่าตัดคือ การกลับเป็นโรคซ้ำและมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะห่างไกล (distant metastasis) หลังผ่าตัดจึงต้องมีการให้การรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัด ซึ่งจะพิจารณาให้ในระยะที่ 1B-3A ร่วมกับการที่มีลักษณะเสี่ยงสูงในการกลับเป็นซ้ำได้แก่ poorly differentiation, vascular invasion, wedge resection, ก้อนเนื้ออก > 4 เซนติเมตร, visceral pleural involvement และ incomplete lymph node sampling ส่วนการให้ยาเคมีบำบัดร่วมกับฉายแสง จะทำในรายที่เป็นระยะลุกลามเฉพาะที่ หรือไม่สามารถผ่าตัดได้ แต่ถ้าระยะที่มีการแพร่กระจายไปแล้ว การให้ยาเคมีบำบัดจะเป็นการรักษาหลักที่ช่วยประคับประคองผู้ป่วย ปัจจุบันมียากลุ่มอื่น ๆ นอกเหนือจากยาเคมีบำบัด เรียกว่ายา รักษาตามเป้าหมาย (Targeted therapy) เช่น EGFR-TKI, ALK inhibitor แต่ต้องตรวจการกลายพันธุ์ของยีน (mutation) จึงจะสามารถใช้ยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน

โปรตีโอม (Proteome) คือ คือโปรตีนทั้งหมดที่ผ่านกระบวนการแปลงจากรหัสพันธุกรรม ซึ่งโปรตีนเป็นเครื่องมือสำคัญอย่างหนึ่งในระดับเซลล์ โดยปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆ ถูกกระตุ้นและควบคุมโดย เอนไซม์ การขนส่งโมเลกุลต่างๆ ถูกควบคุมโดยสัญญาณจากโปรตีน การแสดงออกของ ยีน การนำพลังงานไปใช้ในการทำงานต่างๆ ก็ล้วนถูกควบคุมโดยโปรตีน ข้อมูลเกี่ยวกับความผิดปกติของรหัสพันธุกรรมอาจสามารถตรวจพบด้วยการศึกษาโปรตีน เพราะฉะนั้นเพื่อศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนทั้งหมดทำให้ช่วยบอกว่ามีความผิดปกติในเซลล์นั้น⁽²⁵⁾

ส่วนคำว่า โปรตีโอมิกส์ (Proteomics) เป็นการศึกษาโปรตีนในแง่ต่างๆ ทั้งเชิงปริมาณ และคุณภาพ รวมถึงจำแนกกระบวนการต่างๆ ที่มีโปรตีนเกี่ยวข้อง เช่น การเกิดโรค ซึ่งการเกิดโรคเป็นการแสดงออกอย่างหนึ่งของโปรตีน นอกจากนี้โปรตีนยังเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการออกฤทธิ์ของยา การเกิดมะเร็ง (tumorigenesis) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางจีโนมิกส์และโปรตีโอมิกส์⁽⁶⁾ การเข้าใจพยาธิชีววิทยาและกลไกของการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยและการรักษา โดยอาจเป็นไปตามโปรตีนที่มีความสำคัญในพยาธิสภาพต่างๆ ของมะเร็งปอด

วิธีการดังกล่าวทำให้ค้นพบโปรตีนที่บ่งชี้มะเร็งหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการตรวจวิเคราะห์ แต่การตรวจหาตัวบ่งชี้มะเร็งที่ละตัวต้องทำหลายขั้นตอนและเสียเวลามาก จึงได้มีการนำเอาเทคโนโลยีการแยกโปรตีน มาใช้ควบคู่กับโปรแกรมการวิเคราะห์ขั้นตอนวิธีด้วยคอมพิวเตอร์ เพื่อค้นหาแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ (proteomics pattern) ในคนไข้มะเร็งที่แตกต่างจากคนปกติทั่วไป

การศึกษาของ Petricoin และคณะ⁽²⁶⁾, Jinong และคณะ⁽²⁷⁾, Adam และคณะ⁽²⁸⁾ ได้ตรวจหาเซลล์มะเร็งด้วยวิธีวิเคราะห์โปรตีนหลายๆตัว เพื่อหาแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ที่ใช้บ่งชี้มะเร็งรังไข่, มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งเต้านม ซึ่งข้อมูลจากนักวิจัยกลุ่มนี้แสดงให้เห็นว่าแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์นั้น สามารถให้คำทำนายการเกิดเซลล์มะเร็งได้สูงกว่าตัวบ่งชี้มะเร็ง (tumor marker) เพียงตัวเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพื่อคัดกรองคนไข้มะเร็งออกจากคนไข้ปกติ โดยสรุปคือการวิเคราะห์โดยใช้แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ให้ความไวและความจำเพาะสูงกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยตัวบ่งชี้มะเร็งหรือโปรตีนเพียงตัวเดียว (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงความไวและความจำเพาะในการวิเคราะห์ด้วยตัวบ่งชี้ตามชนิดของมะเร็ง⁽²⁶⁻²⁸⁾

ตัวบ่งชี้	ชนิดของมะเร็ง	ความไว	ความจำเพาะ
PSA	ต่อมลูกหมาก	65%	35%
แบบแผนทางโปรตีน มิกส์	ต่อมลูกหมาก	83%	97%
CA 15-3	เต้านม	23%	69%
แบบแผนทางโปรตีน มิกส์	เต้านม	93%	91%
CA 125	รังไข่	35%	98%
แบบแผนทางโปรตีน มิกส์	รังไข่	100%	95%

มีการศึกษาของ Luisa M.Solis และคณะ⁽²⁹⁾ โดยประเมินลักษณะทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา 240 ชิ้น เพื่อดูว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะโรคทางคลินิกของผู้ป่วยหรือไม่อย่างไร โดยวัดเรื่องระยะเวลาปลอดโรค (recurrent free survival) และ ระยะเวลาการอยู่รอด (overall survival) รวมทั้งประเมินระดับการแสดงออกของตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุลที่บ่งบอกพยากรณ์โรค คือ thyroid transcription factor-1(TTF-1) จำนวน 218 คน และ panel ของ 5 proteins (refer as FILM signature index) จำนวน 185 คน ผลคือ ตามลักษณะทางพยาธิวิทยาจะแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) any solid (38%), 2) papillary but no solid (14%), 3) lepidic and acinar but no solid or papillary (30%) and 4) acinar only (18%) ผู้ป่วยในกลุ่มที่ 3 มีระยะเวลาปลอดโรคที่ดีกว่า กลุ่มที่ 1 (HR, 0.4510; P = 0.165) และ กลุ่มที่ 2 (HR, 0.4253; P = 0.425) solid pattern (กลุ่มที่ 1) มีอัตราการอยู่รอดที่น้อยกว่า non-solid pattern อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (all stage: HR; 1.665; P = 0.144; stage I และ II: HR, 2.157; P=0.008) ในกลุ่ม non-solid pattern ร่วมกับมีค่า TTF-1 สูง จะสัมพันธ์กับระยะเวลาปลอดโรคที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (HR, 0.994; P = 0.017) และ อัตราการอยู่รอดที่ดีกว่า (HR, 0.996; P = 0.0276) ในทุกระยะของโรคและ FILM signature index score สูง สัมพันธ์กับระยะเวลาปลอดโรคและอัตราการอยู่รอดที่แยกว่า ในทุกระยะของโรค (ระยะเวลาปลอดโรค: HR,1.343; P=0.192; อัตราการอยู่รอด: HR, 1.371; P=0.0156) และในระยะที่ 1 กับ ระยะที่ 2 (ระยะเวลาปลอดโรค: HR, 1.419; P=0.0095; อัตราการอยู่รอด: HR, 1.315; P=0.0422) โดยสรุปคือ การที่มี solid pattern จะเป็นตัวบ่งชี้ ในการบ่งบอกพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา การมี

TTF-1 ระดับสูง และ FILM signature index scored ต่ำ สัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ดีใน non-solid pattern

การศึกษาของ Kiyoshi Yanagisawa⁽³⁰⁾ เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปอด 79 ราย และชิ้นเนื้อปอดปกติ 14 ราย จากนั้นใช้เครื่องมือ Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-offlight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ในการแยกการแสดงออกของโปรตีนซึ่งจะได้ 1600 peaks ของโปรตีน แล้วใช้แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ เพื่อแยกก้อนมะเร็งปฐมภูมิออกจากก้อนมะเร็งที่แพร่กระจายมาจากที่อื่น และแบ่งตามต่อมน้ำเหลืองที่มีการกระจายไป เพื่อที่จะดูพยากรณ์โรค พบว่าแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ สามารถที่จะใช้แยกความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยที่มีพยากรณ์โรคแย่ (ค่ามัธยฐานการอยู่รอดที่ 6 เดือน, จำนวน 25 คน) และพยากรณ์โรคดี (ค่ามัธยฐานการอยู่รอดที่ 33 เดือน, จำนวน 41 คน, $p < 0.0001$) ในมะเร็งปอดที่ได้รับการผ่าตัด

จากการศึกษาที่กล่าวมาจะเห็นว่าแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ สามารถนำมาใช้เพื่อดูการพยากรณ์โรคได้ และในส่วนของชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ก็มีส่วนสำคัญในการบอกพยากรณ์โรคและเป็นแนวทางในการเลือกวิธีการรักษาต่อไปได้ และยังช่วยให้การวินิจฉัยมีความถูกต้องมากขึ้น เพราะฉะนั้นการศึกษานี้จึงต้องการทราบความสัมพันธ์ระหว่างแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์กับชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาด้านการวินิจฉัย, การรักษา และบอกพยากรณ์โรคต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาแบบ Descriptive study โดยศึกษาความแตกต่างของแบบแผนทางโปรตีนโอมิกส์ในเนื้อเยื่อระหว่างแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกประชากร และตัวอย่าง

ประชากรเป้าหมาย (Target Population) คือ

ผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study Population) คือ

เนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยและผ่าตัดปอดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าการศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่อายุตั้งแต่ 18 ปี ขึ้นไป ทั้งชายและหญิง
2. ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา โดยมีผลการตรวจทางพยาธิวิทยา ยืนยัน
3. เนื้อเยื่อมะเร็งปอด ได้รับการอ่านโดยพยาธิแพทย์คนเดียวกัน

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ไม่สามารถติดตามขึ้นเนื้อหรือขึ้นเนื้อไม่สามารถนำมาศึกษาเพิ่มเติมได้
2. ผลอ่านทางพยาธิวิทยาไม่ครบถ้วนสมบูรณ์ที่จะบอกชนิดย่อยของโรคได้
3. ประวัติเวชระเบียนไม่ครบถ้วนและไม่สามารถหาประวัติเพิ่มเติมได้
4. ได้ยาเคมีบำบัดมาก่อนได้รับการผ่าตัด
- 5.

3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

จากการทบทวนวรรณกรรม ยังไม่พบว่ามีการศึกษาที่คล้ายคลึงกัน จึงได้นำมาจากการศึกษาของ Tarek และคณะ⁽³¹⁾ ว่าสามารถแยกความแตกต่างของลักษณะทางพยาธิวิทยาตามชนิดย่อยของ

มะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา จากการศึกษาลักษณะโปรตีน cytokeratin (CK) 4 ตัว คือ CK7, CK8, CK18 และCK19 ซึ่งมี 21 isoform

กำหนดค่าความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล = 95%

$$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 1.28$$

$$\begin{aligned} \text{สูตร } n &= \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2} \\ &= \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \left[\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{n_1+n_2-2} \right]}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2} \end{aligned}$$

กำหนด

$$n_1 = n_{\text{tumor}}, \quad n_2 = n_{\text{normal}}$$

$$S_1 = SD_{\text{tumor}}, \quad S_2 = SD_{\text{normal}}$$

$$\bar{X}_1 = \bar{X}_{\text{tumor}}, \quad \bar{X} = \bar{X}_{\text{normal}}$$

จากการศึกษาของ Tarek และคณะ (31) นำมาแทนค่าในสูตร

ใช้โปรตีน เลขที่ 527

$$n = \frac{(1.96+1.28)^2 \left[\frac{(93-1)(0.102)^2 + (10-1)(0.06)^2}{93+10-2} \right]}{(0.103-0.044)^2}$$

$$n = \frac{(10.4976)(0.00979)}{(0.00348)}$$

$$n = 29.5 \sim 30 \text{ คน}$$

ดังนั้นขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ 30 คน

3.4 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย

การวินิจฉัยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาตามการจำแนกชนิดทางพยาธิวิทยาของ IASLC/ATS/ERS classifications ปี 2011

- Proteomics patterns คือ แบบแผนของโปรตีนที่แสดงออก ซึ่งมาจากการศึกษาโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา แล้ววิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรเมตรี แล้วนำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มโดยวิเคราะห์องค์ประกอบหลักหรือจัดกลุ่มโปรตีนแบบเป็นลำดับขั้น ซึ่งในการศึกษานี้เพื่อวิเคราะห์กลุ่มโปรตีนที่แสดงออกกว่ามีความแตกต่างกันอย่างไรในแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

- จัดกลุ่มโดยวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก หรือ Principal component analysis (PCA) เป็นวิธีที่ใช้เพื่อลดมุมมองหรือมิติ สำหรับแยกแยะข้อมูลกลุ่มโปรตีนเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา โดยใช้เครื่องมือที่บ่งบอกทิศทาง (vector) ซึ่งจะเป็นการแสดงออกของโปรตีนหลายมิติ โดยแยกตัวอย่างขั้นเนื้อ ตามโครงสร้างแต่ละกลุ่ม

- การจัดกลุ่มโปรตีนแบบเป็นลำดับขั้น หรือ Hierarchical clustering analysis เป็นวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลโดยการแบ่งกลุ่มโปรตีนแบบเป็นลำดับขั้นเพื่อช่วยลดขนาดข้อมูล ซึ่งจะมีการจัดลำดับกลุ่มโปรตีนที่มีคุณลักษณะคล้ายคลึงกันไว้ด้วยกัน การแบ่งกลุ่มจะมีการแบ่งย่อยลงไปซ้ำหลายครั้ง

- แมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry หรือ MS) คือเทคนิคในการวิเคราะห์ผลการวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ของอนุภาคที่มีประจุ ใช้เพื่อระบุมวลของอนุภาคส่วนประกอบของธาตุในสารประกอบตัวอย่างหรือในโมเลกุล และเพื่อแสดงถึงโครงสร้างทางเคมีของโมเลกุล เช่น เปปไทด์ และสารประกอบทางเคมีอื่นๆ โดยหลักการทำงานของแมสสเปกโตรเมตรีคือทำให้สารประกอบเคมีกลายเป็นประจุ (ionize) เพื่อสร้างโมเลกุลที่มีประจุขึ้นมาและวัดสัดส่วนมวลต่อประจุของสารนั้น

- Unsupervised method เป็นวิธีการจัดการข้อมูลโดยไม่มีภาระผลที่ต้องการหรือประเภทไว้ก่อน โดยจะพิจารณาวัตถุเป็นเซตของตัวแปรสุ่มซึ่งจะไม่มีการทำฉลากใดๆแล้วให้โปรแกรมคอมพิวเตอร์หาโครงสร้างของข้อมูลขาเข้าเอง ซึ่งการศึกษานี้เป็นการจัดกลุ่มของ protein expression

- Supervised method เป็นวิธีการจัดการข้อมูลโดยมีภาระผลที่ต้องการหรือประเภทไว้ก่อนแล้วเชื่อมโยงกับข้อมูลเพื่อค้นหาผลลัพธ์ ซึ่งการศึกษานี้ได้นำค่าของโปรตีนที่ได้มาทำ statistical analysis คือวิเคราะห์ระหว่าง solid-lepidic, solid-acinar, acinar-lepidic subtype โดยใช้ Student's t-test และ Mann-Whitney U test

3.5 การดำเนินการวิจัย

3.5.1 ชั้นเตรียมการ

1. ทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับโรคมะเร็งปอดชนิดต่อม การจัดแบ่งชนิดย่อยและการพยากรณ์โรค ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรักษาเมื่อแบ่งตามชนิดย่อยของมะเร็งปอด
2. เสนอโครงร่างงานวิจัย และขอความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรม

3.5.2 ขั้นตอนการคัดเลือกประชากรศึกษา

รวบรวมผู้ป่วยได้จำนวน 179 คน เกณฑ์การคัดเลือกเข้า คือ ผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 18 ปี ขึ้นไป ทั้งชายและหญิง ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอด จากรพ.จุฬาลงกรณ์ตั้งแต่ มกราคม พ.ศ. 2551- ธันวาคม พ.ศ. 2557 ที่ได้รับการผ่าตัดปอด โดยมีผลชิ้นเนื้อยืนยันว่าเป็นมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ส่วน เกณฑ์การคัดออกคือ ผลพยาธิวิทยาไม่ได้วินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา, ผู้ป่วยที่ไม่สามารถติดตามชิ้นเนื้อหรือชิ้นเนื้อไม่สามารถนำมาศึกษาเพิ่มเติมได้หรือมีเฉพาะชิ้นเนื้อจากการตัดชิ้นเนื้อร่วมกับผลอ่านทางพยาธิวิทยาไม่ครบถ้วนสมบูรณ์ที่จะบอกชนิดย่อยของโรคได้ รวมถึงเนื้อเยื่อมีการปนเปื้อนเลือดหรือสารคัดหลั่งต่างๆ ที่จะทำให้การแปลผลแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์มีความคลาดเคลื่อนได้ และมีประวัติได้รับยาเคมีบำบัดก่อนการผ่าตัด หรือมีประวัติบันทึกทางเวชระเบียนไม่ครบถ้วน ซึ่งจากเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย ทำให้เหลือผู้ป่วยในการศึกษาจำนวน 64 คน แต่ข้อจำกัดเรื่องเวลาและอุปกรณ์ในการศึกษาวิจัย จึงทำให้มีผู้ป่วยเข้าในการศึกษาจริงเพียง 27 คน ส่วนข้อมูลพื้นฐาน ผลชิ้นเนื้อ และประวัติการรักษาของผู้ป่วยได้จากการทบทวนบันทึกในเวชระเบียน

3.5.3 ขั้นตอนการเตรียมและตรวจชิ้นเนื้อ

เตรียมตัวอย่างและสกัดโปรตีน

เนื้อเยื่อหลังผ่าตัด 1x1 เซนติเมตร ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเตรียมตัวอย่างและสกัดแยกโปรตีน โดยนำเนื้อเยื่อมาตัดด้วยเครื่อง cryostat ที่ 50 μm จำนวน 3 ชิ้น ใส่หลอดทดลอง 1.5 ml จากนั้นเติม 5% deoxycholate (bile acid) in 20 mM Triethylammonium bicarbonate (TEAB) 200 μl แล้ว sonicate 3 ครั้ง 30% ครั้งละ 5 วินาที และปั่นตกที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนเหนือตะกอนใส่หลอดทดลองใหม่

การวัดปริมาณโปรตีน ด้วยวิธี BCA Assay (Bicinchoninic Acid Assay)

1. เตรียมตัวอย่างมาตรฐาน โดยใช้ BSA (Bovine Serum Albumin) ดังนี้

	dH ₂ O (μl)	BSA (μl)	BCA (μg/ml)
A	0	300 จาก stock	2,000
B	125	375 จาก stock	1,500
C	325	325 จาก stock	1,000
D	175	175 จาก B	750
E	325	325 จาก C	500
F	325	325 จาก E	250
G	325	325 จาก F	125
H	400	100 จาก G	25
I	400	0	0

2. เตรียมสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา A:B = 50:1

3. ใส่ตัวอย่างมาตรฐาน A-I และตัวอย่างที่ใช้ศึกษา 25 μl ลงใน 96 well plate

4. ใส่สารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา 200 μl ในทุก well แล้ว ผสมโดยใช้ ปิเปตต์

5. ปิด well plate ด้วยกระดาษฟอยล์แล้วบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30

นาที

6. วัดการดูดกลืนแสง ที่ 562 นาโนเมตร

7. นำค่าที่ได้มาเขียนเส้นโค้งมาตรฐาน (standard curve) แล้วคำนวณปริมาณโปรตีน

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Protein purification)

1. เตรียมปริมาณโปรตีน 300 μg/μl โดยปรับปริมาตรด้วย 100 mM Triethylammonium bicarbonate (TEAB) ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 μl

2. เติม 10 μl ของ 200 mM TCEP (Tris[2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride) บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3. เตรียม iodoacetamide (9mg) ด้วย 132 μl ของ 100 mM TEAB ให้เป็น 375 mM iodoacetamide ในที่มีด

4. เติม 100 μl ของ 375 mM iodoacetamide ลงในตัวอย่างที่ศึกษา แล้วบ่มอุณหภูมิห้อง ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที

5. เติม 6 เท่าของ pre-chilled acetone (-20 องศาเซลเซียส) และแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส ค้างคืน เพื่อตกตะกอนโปรตีน

6.ปั่นตกที่ 8,000 ×g (times gravity) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเท ส่วนเหนือตะกอนทิ้ง แล้วตากตะกอนให้แห้ง 2-3 นาที จะได้ตะกอนสีขาว

การย่อยโปรตีน (Protein digestion)

1. เติม 200 µl ของ 100 mM TEAB แล้ว ผสมด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
2. เตรียมทร립ซิน โดยเติม 20 µl ของ trypsin storage solution ลงใน 20 µg ของทร립ซิน บ่ม 5 นาที
3. เติม 6 µl ของทร립ซิน ลงใน ตัวอย่างที่ศึกษา บ่ม 16 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส
4. หยุดปฏิกิริยาของทร립ซินโดยวางบนน้ำแข็ง

การหาปริมาณเปปไทด์

1. เตรียม peptide standard concentrations

100 mM TEAB (µl)	Peptide Standard (µl)	Final STD concentration for Peptide (µg/ml)
A	0	30
B	15	15
C	15	15
D	15	15
E	15	15
F	15	15
G	15	15
H	15	15
Blank	15	0

2. ปิเปตต์ 10 µl ของตัวอย่างมาตรฐาน และตัวอย่างที่ศึกษาลงใน fluorescence-compatible microplate

3. เติม 70 µl Fluorometric Peptide Assay Buffer ในแต่ละ well plate
4. เติม 20 µl Fluorometric Peptide Reagent ในแต่ละ well plate
5. บ่มที่อุณหภูมิต่ำ 5 นาที

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงแบบฟลูออเรสเซนส์ โดยใช้ค่าความยาวคลื่นช่วงกระตุ้น (Excitation wavelength or Ex) at 390 นาโนเมตร, ความยาวคลื่นที่คายพลังงาน (Emission wavelength or Em) at 475 นาโนเมตร

7. นำค่าที่ได้มาสร้างเส้นโค้งมาตรฐานแล้วคำนวณค่าปริมาณเปปไทด์ ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างที่ศึกษา

ติดฉลากเปปไทด์ (Peptide labeling)

1. อุ้่นสารติดฉลาก (Tandem mass tags หรือ TMT Label Reagent) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 256 μ l anhydrous acetonitrile ลงในแต่ละหลอดของสารติดฉลาก 5 mg ผสมให้เข้ากัน

2. เติม 13 μ l ของสารติดฉลาก ลงในตัวอย่างที่ศึกษา

3. บ่มนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

4. เติม 8 μ l 5% hydroxylamine ในแต่ละตัวอย่างที่ศึกษา และบ่มนาน 15 นาที

5. รวมตัวอย่างที่ศึกษาเข้าด้วยกันเป็นหลอดเดียว และเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

TMT10 plex Isobaric Label Reagent set:

- TMT10-126 Label Reagent, 1 x 5 mg
- TMT10-127N Label Reagent, 1 x 5 mg
- TMT10-127C Label Reagent, 1 x 5 mg
- TMT10-128N Label Reagent, 1 x 5 mg
- TMT10-128C Label Reagent, 1 x 5 mg
- TMT10-129N Label Reagent, 1 x 5 mg
- TMT10-129C Label Reagent, 1 x 5 mg
- TMT10-130N Label Reagent, 1 x 5 mg
- TMT10-130C Label Reagent, 1 x 5 mg
- TMT10-131 Label Reagent, 1 x 5 mg

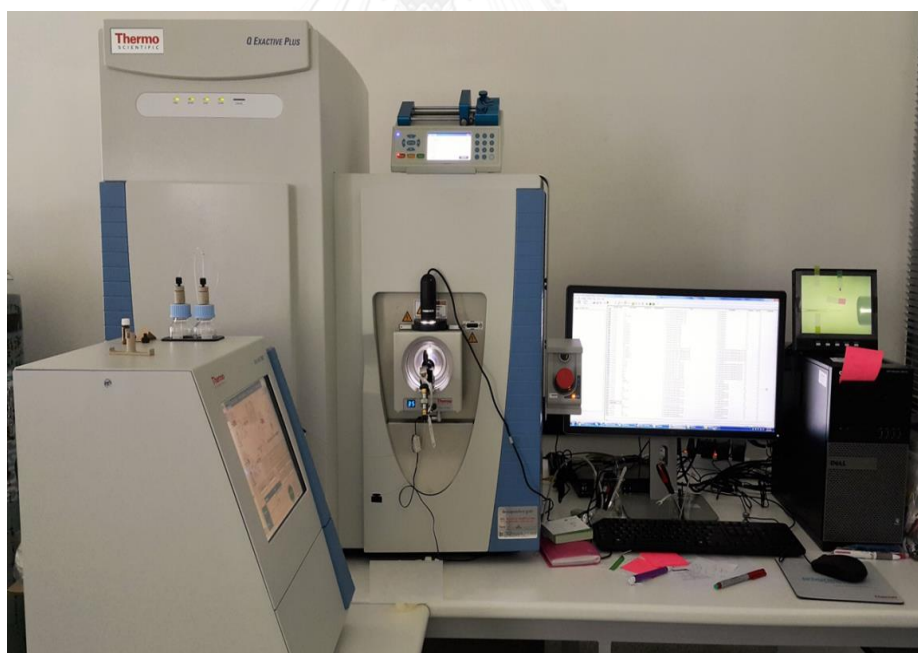
ทำความสะอาดตัวอย่างที่ศึกษา (Clean-up sample)

1. เติม 100% acetonitrile 1 มิลลิลิตร ลงใน Detergent Removal Spin Columns เพื่อเปิดใช้งานคอลัมน์

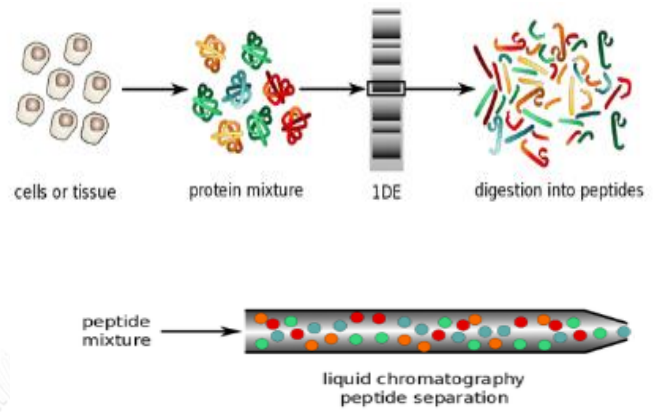
2. เติม 0.1% formic acid 1 มิลลิลิตร เพื่อล้าง acetonitrile

3. ใส่ตัวอย่างที่ศึกษาลงไปแล้วกดให้ ไหลช้าๆ 1หยดต่อ 3วินาที แล้วเก็บตัวอย่างที่ศึกษาลงใน หลอดสำหรับปั่นตก1.5 มิลลิลิตร

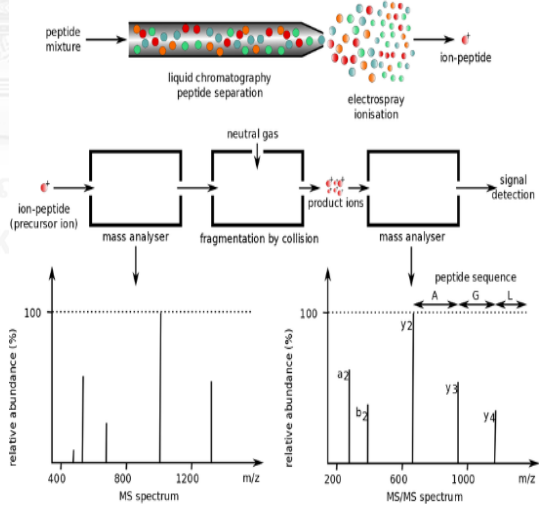
4. ล้างด้วย 0.1% formic acid 3 ครั้ง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร
 5. เติม 50% acetonitrile+0.1% formic acid 1 มิลลิลิตร เพื่อชะล้างเปปไทด์ที่อาจหลงเหลืออยู่ใน คอลัมน์ ออกมาเพื่อไว้ตรวจสอบ
 6. เก็บ sample ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส
- เตรียมเข้าเครื่องแมสสเปคโตรเมทรี (Mass spectrometry)
1. นำตัวอย่างที่ศึกษาไปเข้าเครื่องเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย (SpeedVac) 2 ชั่วโมง เพื่อระเหย acetonitrile ออกให้หมด
 2. เติม 0.1% formic acid 300 μ l เพื่อทำให้ความเข้มข้นของเปปไทด์เป็น 1 μ g/ μ l
 3. เจือจางตัวอย่างที่ศึกษาให้มีความเข้มข้น 10 ng/ μ l
 4. ปิเปตต์ 15 μ l ของตัวอย่างที่ศึกษาใส่ในจานทดลอง (plate)
 5. นำจานทดลองที่ได้เข้าเครื่องแมสสเปคโตรเมทรี (รูปที่ 6)
 6. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ (รูปที่ 7, 8)



ภาพที่ 6 แสดงเครื่องแมสสเปคโตรเมทรี (Mass spectrometry)

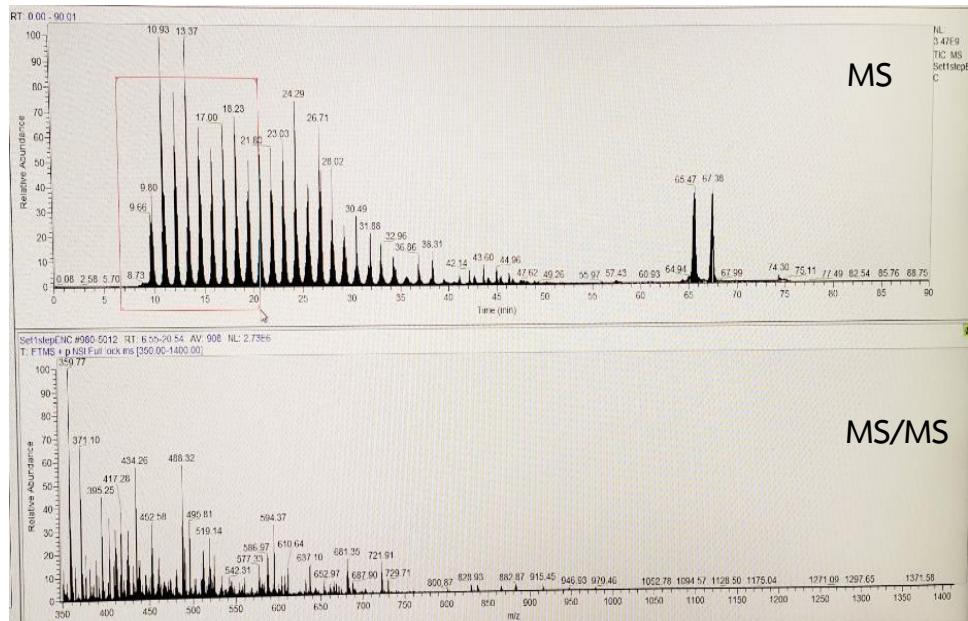


เครื่องลิควิดโครมาโตกราฟี (Liquid Chromatography) ใช้ในการสกัดแยกโปรตีนและเปปไทด์ ในงานศึกษานี้ใช้เป็นรุ่น The Thermo Scientific™ EASY- nLC™ 1000 เมื่อได้เปปไทด์แล้วจึงสเปรย์ลงบนแมสสเปคโตรมิเตอร์



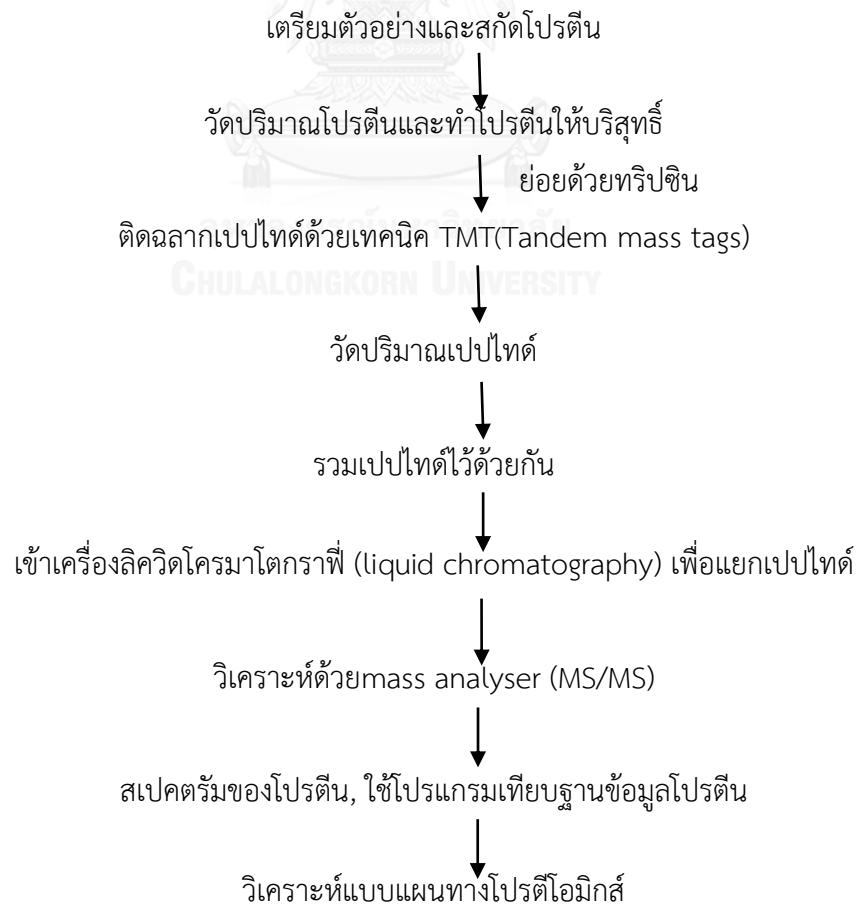
วิเคราะห์โปรตีนด้วยโปรแกรม proteome discoverer analysis version 2.1

ภาพที่ 7 แสดงขั้นตอนการสกัดและวิเคราะห์โปรตีน



ภาพที่ 8 แสดงโปรตีนสเปกตรัมที่บันทึกหลังจากผ่านขั้นตอน mass spectrometry

แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาโปรตีน



3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. เก็บรวบรวมรายชื่อผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งปอดชนิดต่อมซึ่งเข้ารับการผ่าตัดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2557
2. เก็บข้อมูลจากประวัติเวชระเบียนและฐานข้อมูลของโรงพยาบาล โดยผู้ดำเนินการวิจัยบันทึกลงในแบบบันทึก (case record form) ได้แก่ ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยระยะของโรค, ประวัติการรักษา ประวัติการกลับเป็นซ้ำของโรค, จำนวนอวัยวะที่มีการกระจาย และสถานภาพการมีชีวิต
3. เก็บข้อมูลวันเสียชีวิตตรวจสอบจากทะเบียนราษฎร
4. ข้อมูลทั้งหมดของผู้เข้ารับการศึกษจะถูกบันทึกลงในแบบบันทึก โดยปกปิดชื่อ-สกุล และจัดเก็บ

เข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์โดยใช้ record number

5. ขึ้นเพื่อนำมาเตรียมตัวอย่างและสไลด์เพื่อเข้าเครื่องแมสสเปคโตรเมทรี จากนั้นตรวจแบบแผน

ทางโปรตีโอมิกส์ และบันทึกค่าที่ตรวจได้ลงในแบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

- ข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) แสดงเป็นร้อยละ (percentage), ค่ามัธยฐาน (median) และพิสัย (range)
- ขึ้นเนื้อที่ศึกษา 27 ตัวอย่าง จะต้องมาเทียบกับตัวอย่างรวม (pooled samples) ซึ่งมาจากการรวบรวม 64 ตัวอย่าง เพื่อหาว่าโปรตีนตัวใดเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากการหาอัตราส่วน (ratio) แล้วคัดเลือกเฉพาะโปรตีนที่พบในทั้ง 27 ตัวอย่างและไม่มีค่าที่สูญหาย (missing value)
- โปรตีนที่ถูกคัดเลือกมา วิเคราะห์ด้วย Shapiro-Wilk test เพื่อดูว่าข้อมูลโปรตีนมีการแจกแจงปกติ (normal distribution) จากนั้นใช้ Student's t-test หาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม solid-lepidic, solid-acinar, acinar-lepidic subtype ส่วนถ้าข้อมูลไม่ใช้การแจกแจงปกติ จะใช้ Mann-Whitney U test แล้วจึงหาโปรตีนที่ significant ($p\text{-value} < 0.05$)
- Hierarchical clustering analysis วิเคราะห์ด้วย software Cluster 3.0 and software TreeView ส่วน Principal component analysis (PCA) วิเคราะห์ด้วย Weka software
- การศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับแบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ วิเคราะห์โดยใช้ Chi-square and Fisher-exact test ในการหาความสัมพันธ์เชิงคุณภาพ ใช้ logistic regression เพื่อหาความสัมพันธ์ของ แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์กับชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา, การกลับเป็นซ้ำของโรค หรือ การเสียชีวิต

- อัตราการอยู่รอด (Overall survival) (OS) และ ระยะเวลาปลอดโรค (disease free survival) วิเคราะห์โดย Kaplan-Meier method และ log-rank test
- วิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดด้วยด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0

3.8 การนำเสนอข้อมูล

ตาราง (Table), แผนภาพ (Diagram) และแผนภูมิ (Graph)

3.9 ปัญหาทางจริยธรรม

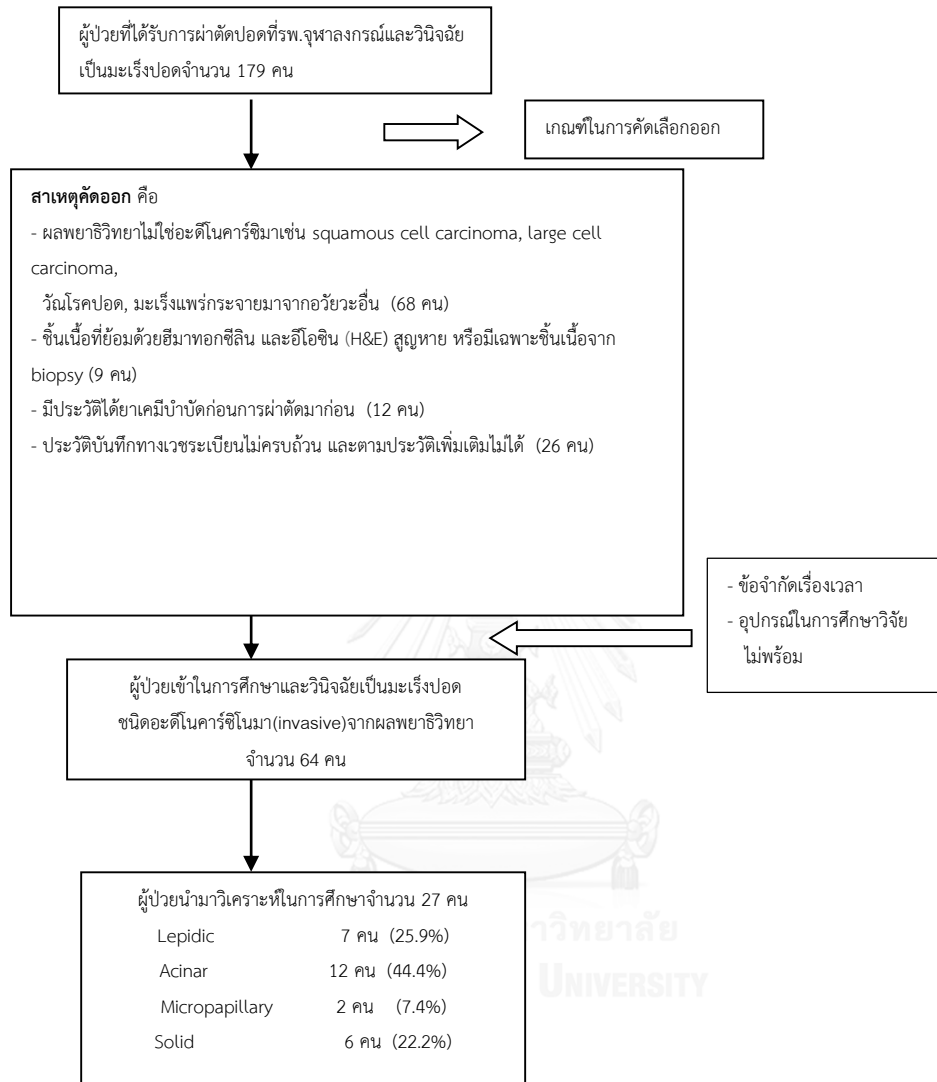
- หลักความเคารพในบุคคล (respect for person) คือ ไม่มีการเปิดเผยชื่อ หรือเลขที่โรงพยาบาลของผู้ป่วย รวมถึงรักษาความลับของผู้ป่วยเป็นสำคัญ ข้อมูลทั้งหมดในการศึกษาไม่สามารถย้อนกลับไปสู่การระบุตัวผู้ป่วยได้
- หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence) เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาขึ้นเนื่อมะเร็งไม่มีความเสี่ยงแก่ผู้ป่วย
- หลักความยุติธรรม (Justice) คือมีเกณฑ์การคัดเลือกและออกชัดเจน

บทที่ 4 ผลการศึกษา

1. ประชากรที่นำมาศึกษา

เก็บรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดจากประวัติและเวชระเบียน ที่เข้ารับการรักษาและผ่าตัดปอดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตั้งแต่เดือน มกราคม 2551 ถึง ธันวาคม 2557 และเป็นผู้ป่วยที่มีชิ้นเนื้อเก็บรักษาไว้ จึงทำให้ได้จำนวนผู้ป่วยมาทั้งหมด 179 คน โดยมีผู้ป่วยที่ตรงกับเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้า (Inclusion criteria) และคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria) ในงานวิจัยนี้ทั้งหมด 64 คน





ภาพที่ 9 แสดงการรวบรวมจำนวนผู้ป่วยในโครงการวิจัย

แต่เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องเวลาที่ใช้ในงานวิจัย ร่วมกับอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลไม่พร้อม ต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อนนานและมีค่าใช้จ่ายสูง เพื่อให้งานวิจัยแล้วเสร็จตามเวลาที่กำหนด จึงทำให้ได้จำนวนผู้ป่วยที่นำมาวิเคราะห์เพียง 27 คน (รูปที่ 9)

2. ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

จากข้อมูลพื้นฐาน พบว่าอายุเฉลี่ย 65 ปี เพศชาย 55.6% เพศหญิง 44.4% ส่วนใหญ่ ECOG =1 (74.1%), ระยะที่ 1 59.2%, ได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด 74.1% และ ได้รับการรักษาเสริมฉายแสง 88.9%, มีกลุ่มที่โรคกลับเป็นซ้ำ 33.3%, ชนิดย่อยตามความเด่น แบ่งเป็น lepidic 25.9% acinar 44.4% papillary 7.4% solid 22.2% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (n=27)

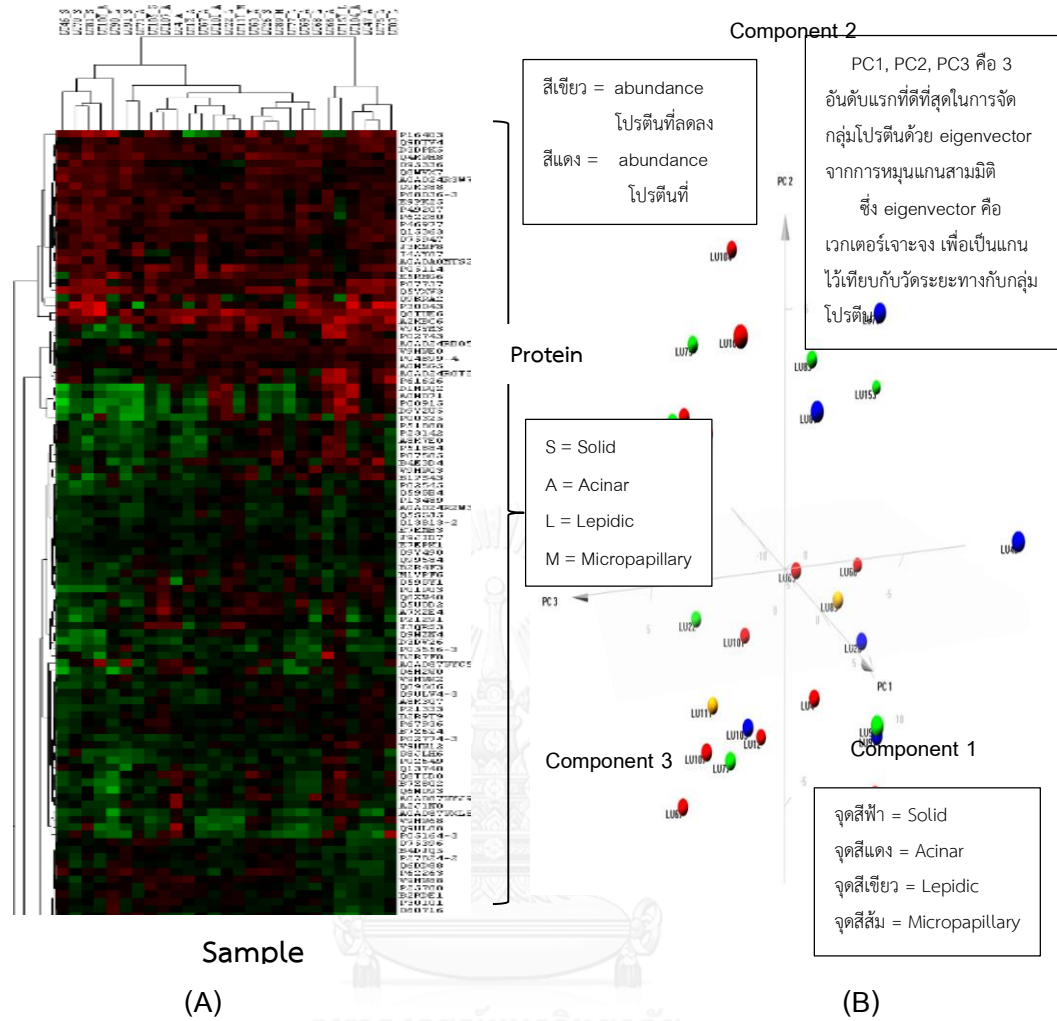
ลักษณะ	n = 27
อายุ (ปี) ค่ามัธยฐาน (พิสัย)	65 (47-83)
เพศ	
ชาย	15 (55.6%)
หญิง	12 (44.4%)
ECOG	
0	6 (22.2%)
1	20 (74.1%)
≥ 2	1 (3.7%)

ระยะที่	
1A	12 (44.4%)
1B	4 (14.8%)
2A	3 (11.1%)
2B	1 (3.7%)
3A	6 (22.2%)
4	1 (3.7%)
ลักษณะ	n = 27
T- stage	
T1	11 (37.7%)
T2	15 (55.5%)
T3	1 (2.7%)
N – stage	
N0	19 (70.4%)
N1	2 (7.4%)
N2	6 (22.2%)
ได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด	
ไม่ได้	20 (74.1%)
ได้	7 (25.9%)
ได้รับการรักษาเสริมฉายแสง	
ไม่ได้	24 (88.9%)
ได้	3 (11.1%)
แบบแผนการกลับเป็นซ้ำ	
ไม่มี	18 (66.7%)
เฉพาะที่	2 (7.4%)
แพร่กระจาย	7 (25.9%)

จำนวนอวัยวะที่แพร่กระจาย	
0	19 (70.4%)
1	5 (18.5%)
≥ 2	3 (11.1%)
ชนิดย่อยที่เด่น	
Lepidic	7 (25.9%)
Acinar	12 (44.4%)
Micropapillary	2 (7.4%)
Solid	6 (22.2%)

3. จัดกลุ่มโปรตีนเพื่อนำมาวิเคราะห์

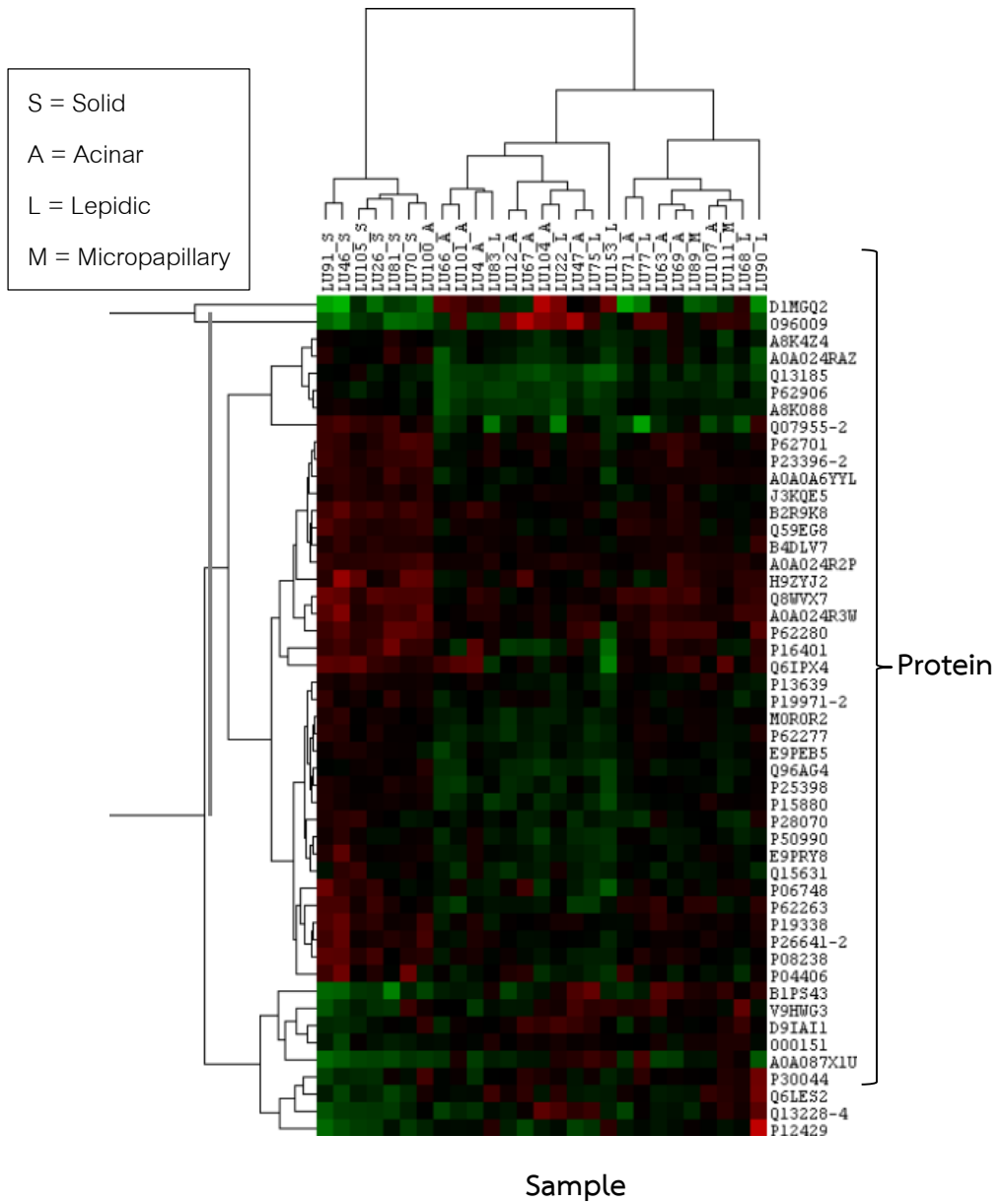
หลังจากเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อและนำเข้าเครื่องแมสสเปคโตรเมทรี จากนั้นจะได้โปรตีนออกมาประมาณ 2,900 ตัว แล้วจึงนำไปเทียบกับ ตัวอย่างชิ้นเนื้อรวม 64 ตัวอย่าง เพื่อหาโปรตีนที่มีการเพิ่มขึ้น หรือลดลงในระดับสูง และมีการซ้อนทับกันใน 27 ตัวอย่างโดยไม่มีค่าสูญหาย (missing value) ดังนั้นจะได้โปรตีน 445 ตัว จากนั้นจึงนำโปรตีนจำนวน 445 ตัว มาวิเคราะห์ด้วย Shapiro-Wilk test เพื่อดูว่าข้อมูลโปรตีนมีการแจกแจงปกติ (normal distribution) หรือไม่ ถ้าข้อมูลแจกแจงปกติจึงวิเคราะห์ต่อด้วย Student's t-test โดยแบ่งเป็นกลุ่ม solid เทียบกับ lepidic, solid เทียบกับ acinar, lepidic เทียบกับ acinar แต่ถ้าข้อมูลไม่ใช่การแจกแจงปกติ จะใช้การวิเคราะห์ด้วย Mann-Whitney U test จากนั้นเลือกโปรตีนที่มีค่า p-value < 0.05 ซึ่งได้เป็นโปรตีนจำนวน 49 ตัว จากโปรตีน 49 ตัว นำมาวิเคราะห์แบบ unsupervised ด้วยการจัดกลุ่มแบบเป็นลำดับชั้น (Hierarchical clustering analysis) และจัดกลุ่มโดยวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis หรือ PCA) พบว่าไม่สามารถจัดกลุ่มเข้าด้วยกันได้ (รูปที่ 10A, 10B)

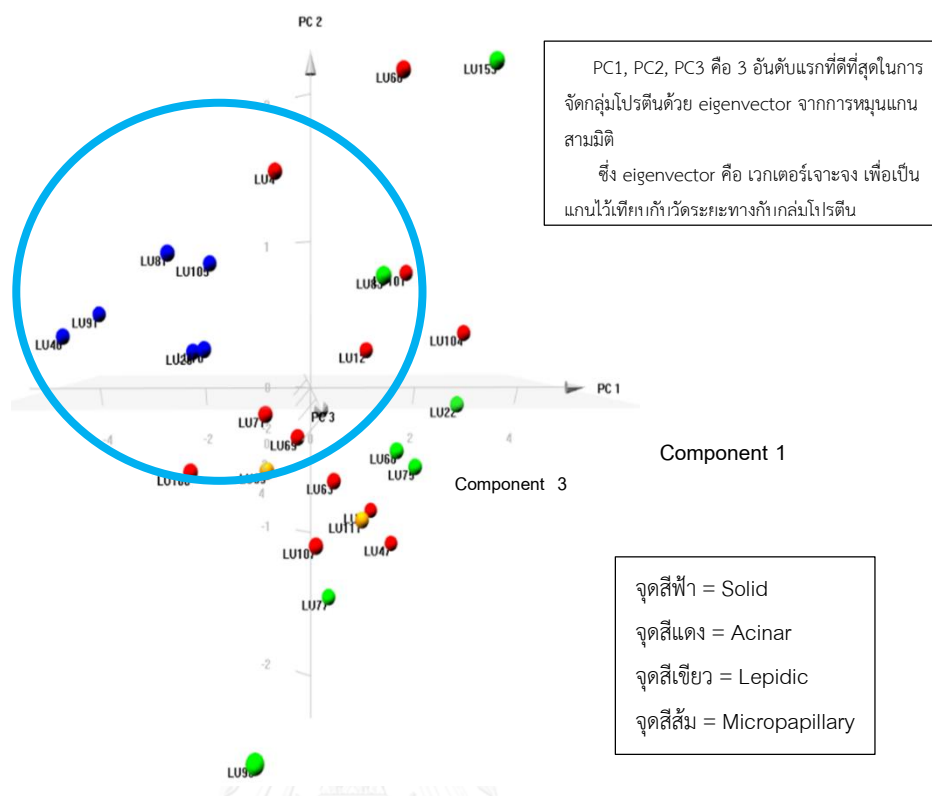


ภาพที่ 10 แสดงการจัดกลุ่มโปรตีนแบบเป็นลำดับขั้น (Hierarchical clustering analysis) (A) และ จัดกลุ่มโดยวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) (B) วิเคราะห์ด้วยวิธี unsupervised solid predominant แยกออกจากชนิดย่อยอื่นๆ (รูปที่ 11,12 ตามลำดับ)



สีเขียว = abundance
โปรตีนที่ลดลง
สีแดง = abundance
โปรตีนที่เพิ่มขึ้น





ภาพที่ 12 แสดงการจัดกลุ่มโดยวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) วิเคราะห์ด้วยวิธี supervised โดยพบ solid predominant แยกออกจากชนิดย่อยอื่นๆ

เนื้อเยื่อ 27 ตัวอย่างนำมาจัดกลุ่มแบบเป็นลำดับขั้น (Hierarchical clustering analysis) ตามการแสดงออกของโปรตีน (รูปที่ 11) จากนั้นจัดกลุ่มด้วยวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) (รูปที่ 12) จะพบว่าสามารถจัดเป็นกลุ่มหรือแบบแผนที่ใกล้เคียงกันได้ดังที่แสดงในวงกลมสีฟ้า ซึ่งเมื่อนำข้อมูลของแต่ละตัวอย่างที่จัดเป็นกลุ่มในวงกลมสีฟ้ามาพิจารณา (รูปที่ 12) พบว่าเป็นชนิดย่อย solid predominant ทั้งหมด แต่จะมีเพียง 1 ตัวอย่างที่เป็นชนิดย่อย acinar predominant จึงเรียกรวมกลุ่มที่จัดได้ในวงกลมสีฟ้า (รูปที่ 12) ว่า solid pattern ส่วนเนื้อเยื่อตัวอย่างอื่นที่ไม่สามารถจัดได้เป็นกลุ่มหรือแบบแผนเดียวกันได้เรียกว่าเป็น non-solid pattern

ตารางที่ 5 โปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลงใน solid predominant เมื่อเทียบกับ non-solid predominant

รหัส หมายเลข	ชื่อโปรตีน	ค่าเปปไทด์ใน solid predominant	ค่าเปปไทด์ใน non-solid predominant	การทำงาน
P08238	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1)	0.60724	0.009882	เกี่ยวข้องกับ signaling pathway เช่น EGFR, HER-2
E9PEB5	Far upstream element- binding protein 1 (FUBP1)	0.18235	-0.14341	ช่วยเรื่องการเคลื่อนไหวของไม โครทิวบูล
P19338	Nucleolin (NCL)	0.541861	0.137754	เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือด ใหม่ของเนื้องอก
P19971-2	Thymidine phosphorylase (TYMP)	0.265362	-0.06374	เปลี่ยน Thymidine ไปเป็น thymine, ทำหน้าที่เหมือน platelet derived endothelial cell growth factor
P23396-2	Isoform 2 of 40S ribosomal protein S3 (RPS3)	0.52855	0.163398	การเติมฟอสเฟตของ RPS3 ป้อง การการตายของเซลล์
P13639	Elongation factor 2 (eEF2)	0.247326	-0.06806	eEF2มีการแสดงออกสูง จะมี พยากรณ์โรคที่ไม่ดี, กลไกการ เกิดไม่ชัดเจน
Q59EG8	Proteasome 26S	0.534784	0.139994	ทำให้กระบวนการUbiquitin- proteasome-dependent proteolysis ทำงานลดลงเช่น การใช้ cisplatin และ ifosphamide
P06748	Nucleophosmin (NPM1)	0.454128	-0.04125	มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ในโรคมะเร็ง, กลไกยังไม่ ทราบชัดเจน
P12429	Annexin A3 (ANXA3)	-0.72894	-0.01236	ส่งเสริมการสร้างเส้น เลือดใหม่, อาจจะ กระตุ้นการสร้าง VEGF and bFGF

รหัส หมายเลข	ชื่อโปรตีน	ค่าเปปไทด์ใน solid predominant	ค่าเปปไทด์ใน non-solid predominant	การทำงาน
Q6LES2	Annexin A4 (ANXA4)	-0.50767	0.154889	ส่งเสริมการเติบโตของเนื้องอก และเกิดการติดต่อเคมีบำบัด
P04406	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH)	0.603415	-0.10824	มีส่วนสำคัญในกระบวนการเมตา บอลิซึมของกลูโคส

โปรตีน 49 ตัว ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลดังที่กล่าวมาเบื้องต้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบค่าระหว่างชนิดย่อยกลุ่ม solid predominant กับ non-solid predominant (ตารางที่ 5) พบโปรตีนที่เพิ่มขึ้นและลดลง โดยมีข้อมูลว่าอาจจะเป็ปัจจัยที่ใช้ทำนายหรือพยากรณ์โรคได้แก่ Heat shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1), Far upstream element-binding protein 1 (FUBP1), Nucleolin (NCL), Thymidine phosphorylase (TYMP), Isoform 2 of 40S ribosomal protein S3 (RPS3), Elongation factor 2 (eEF2), Proteasome 26S, Nucleophosmin (NPM1), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) โดยโปรตีนเหล่านี้พบว่ามีระดับเพิ่มขึ้นในชนิดย่อยกลุ่ม solid predominant ส่วนโปรตีนที่มีการลดลงในชนิดย่อยกลุ่ม solid predominant ได้แก่ Annexin A3 (ANXA3), Annexin A4 (ANXA4)

ตารางที่ 6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับแบบแผนทางโปรตีนโอมิกส์

ปัจจัย	Solid pattern	Non-solid pattern	P-Value
เพศ			
ชาย	7 (100%)	8 (40%)	0.006
หญิง	0 (0%)	12 (60%)	
อายุ (ปี)			
≤ 60	4 (57.1%)	5 (25%)	0.175
> 60	3 (42.8%)	15 (75%)	
ระยะที่			
1	2 (28.5%)	14 (70%)	0.084
2-4	5 (71.5%)	6 (30%)	
ขนาดก้อนเนื้องอก (ซม.)			
≤ 3 ซม.	2 (28.5%)	9 (45%)	0.662
> 3 ซม.	5 (71.5%)	11 (55%)	
การกระจายไปต่อมน้ำเหลือง			
ไม่มี	3 (42.8%)	16 (80%)	0.145
มี	4 (57.1%)	4 (20%)	
ได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด			
ได้	4 (57.1%)	3 (15%)	0.029
ไม่ได้	3 (42.8%)	17 (85%)	
ได้รับการรักษาเสริมฉายแสง			
ได้	2 (28.5%)	1 (5%)	0.088
ไม่ได้	5 (71.4%)	19 (95%)	
การกลับเป็นซ้ำของโรค			
มี	5 (71.4%)	4 (20%)	0.012
ไม่มี	2 (28.5%)	16 (80%)	
การเสียชีวิต			
มี	6 (85.7%)	10 (50%)	0.09
ไม่มี	1 (14.2%)	10 (50%)	

ปัจจัยทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับกลุ่ม solid pattern ซึ่งวิเคราะห์ด้วย Chi-square และ Fisher exact test คือ เพศ, การได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด, และการกลับเป็นซ้ำของโรค โดยพบว่าเพศชายเกี่ยวข้องกับ solid pattern อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.006$), การได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัดเกี่ยวข้องกับ solid pattern อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.029$), การกลับเป็นซ้ำของโรคสัมพันธ์กับ solid pattern อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.012$) ส่วนปัจจัยอื่นๆ เช่น ระยะของโรคพบว่า ถ้าระยะของโรคมามาก คือ ระยะที่ 2-4, การได้รับการรักษาเสริมฉายแสง และการเสียชีวิต

มีแนวโน้มจะสัมพันธ์กับ solid pattern แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.084$, 0.088 , 0.09 ตามลำดับ) (ตารางที่ 6)

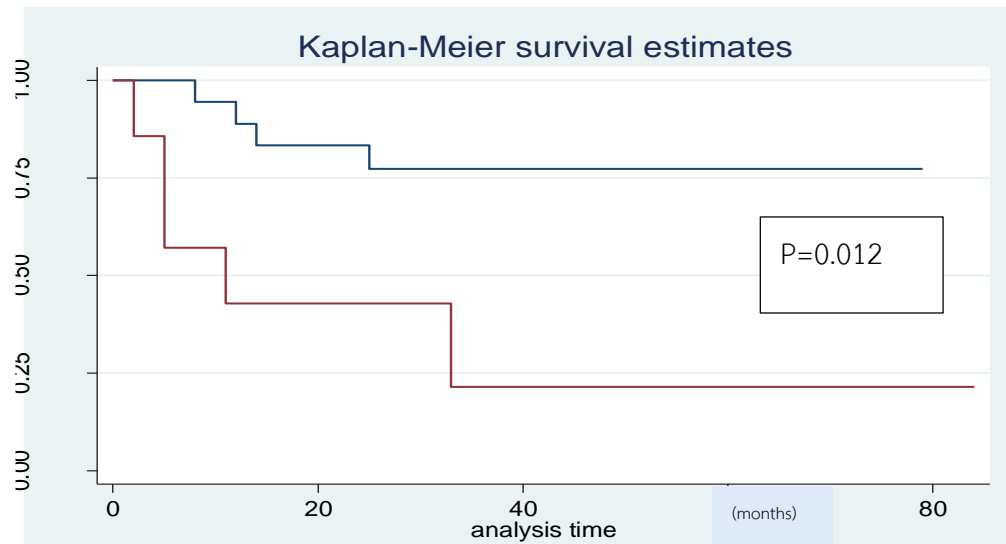
ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง solid pattern กับการกลับเป็นซ้ำของโรค

ตัวแปร	Solid pattern (คน)	Non-solid pattern (คน)	P-value
จำนวนรวมผู้ป่วย	5 (55.6%)	4 (44.4%)	
ระยะที่			0.21
1	1 (20%)	2 (50%)	
2	0 (0%)	1 (25%)	
3	4 (80%)	1 (25%)	
รูปแบบการกลับเป็นซ้ำ			1.0
เฉพาะที่	1 (20%)	1 (25%)	
แพร่กระจาย	4 (80%)	3 (75%)	
ตำแหน่งการกลับเป็นซ้ำ			0.52
ตำแหน่งเดียว	4 (80%)	2 (50%)	
หลายตำแหน่ง	1 (20%)	2 (50%)	
กระจายไปสมอง			0.44
มี	1 (20%)	1 (25%)	
ไม่มี	4 (80%)	3 (75%)	
กระจายไปปอด			1.0
มี	4 (80%)	3 (75%)	
ไม่มี	1 (20%)	1 (25%)	
กระจายไปตับ			1.0
มี	0 (0%)	1 (25%)	
ไม่มี	5 (100%)	3 (75%)	

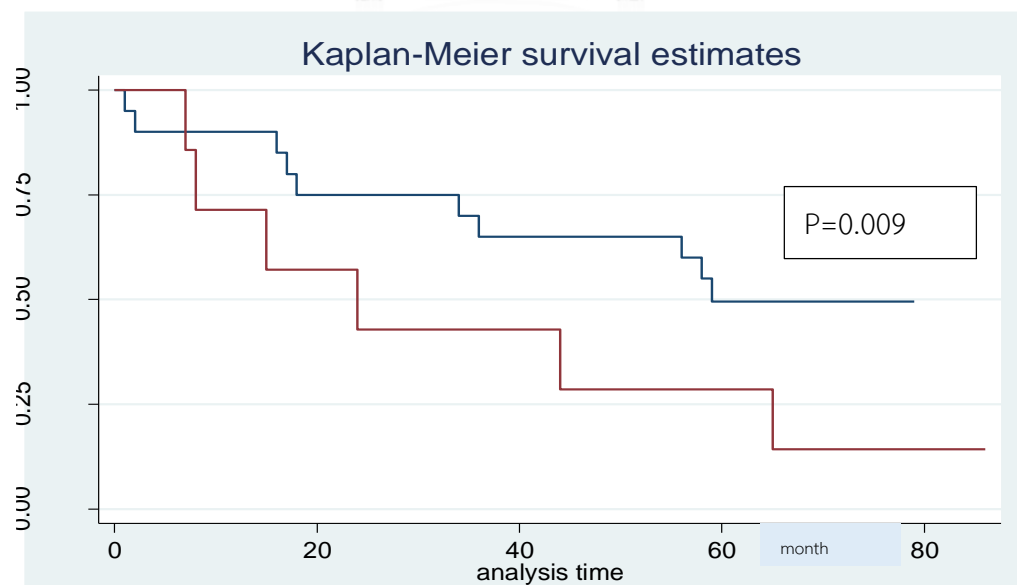
ตัวแปร	Solid pattern (คน)	Non-solid pattern (คน)	P-value
กระจายไปกระดูก			0.44
มี	0 (0%)	1 (25%)	
ไม่มี	5 (100%)	3 (75%)	
กระจายไปต่อมหมวกไต			NA
มี	0 (0%)	0 (0%)	
ไม่มี	0 (0%)	0 (0%)	
กระจายไปต่อมน้ำเหลือง			1.0
มี	1 (20%)	1 (25%)	
ไม่มี	4 (80%)	3 (75%)	
ระยะเวลาปลอดโรค (เดือน)			0.20
≤ 12	4 (80%)	1 (25%)	
> 12	1 (20%)	3 (75%)	
ระยะเวลาปลอดโรค (เดือน)			1.0
≤ 24	4 (80%)	3 (75%)	
> 24	1 (20%)	1 (25%)	

จากตารางที่ 7 ในจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 27 คน พบว่าโรคกลับเป็นซ้ำจำนวน 9 คน มี solid pattern 5 คน คิดเป็น 55% ระยะของโรคส่วนใหญ่เป็นระยะที่ 3 คือ 55% และในกลุ่ม solid pattern มีระยะของโรคเป็นระยะที่ 3 คิดเป็น 80% วิเคราะห์ระยะของโรคพบว่าไม่แตกต่างกันในการกลับเป็นซ้ำของโรคระหว่าง solid pattern และ non-solid pattern ($P=0.21$) ส่วนรูปแบบการกลับเป็นซ้ำที่เฉพาะที่และแพร่กระจายไม่แตกต่างกันระหว่าง solid pattern และ non-solid pattern ($P=1$) การกลับเป็นซ้ำที่ตำแหน่งเดียวหรือหลายตำแหน่งไม่แตกต่างกันระหว่าง solid pattern และ non-solid pattern ($P=0.52$) การแพร่กระจายไปยังอวัยวะได้แก่ สมอง, ปอด, ตับ, กระดูก, ต่อมหมวกไต, ต่อม้ำเหลือง ไม่แตกต่างกันระหว่าง solid pattern และ non-solid pattern ($P=0.44, 1.0, 1.0, 0.44, NA, 1.0$ ตามลำดับ) วิเคราะห์ระยะปลอดโรคพบว่าไม่แตกต่างกันระหว่าง

2 กลุ่ม ที่ 12 เดือน และ 24 เดือน ($P=0.2, 1.0$ ตามลำดับ) แต่มีแนวโน้มว่าsolid pattern จะสัมพันธ์กับระยะปลอดโรคที่ ≤ 12 เดือน



แผนภูมิที่ 6 แสดงระยะเวลาปลอดโรค (disease free survival) เปรียบเทียบระหว่าง solid และ non-solid pattern



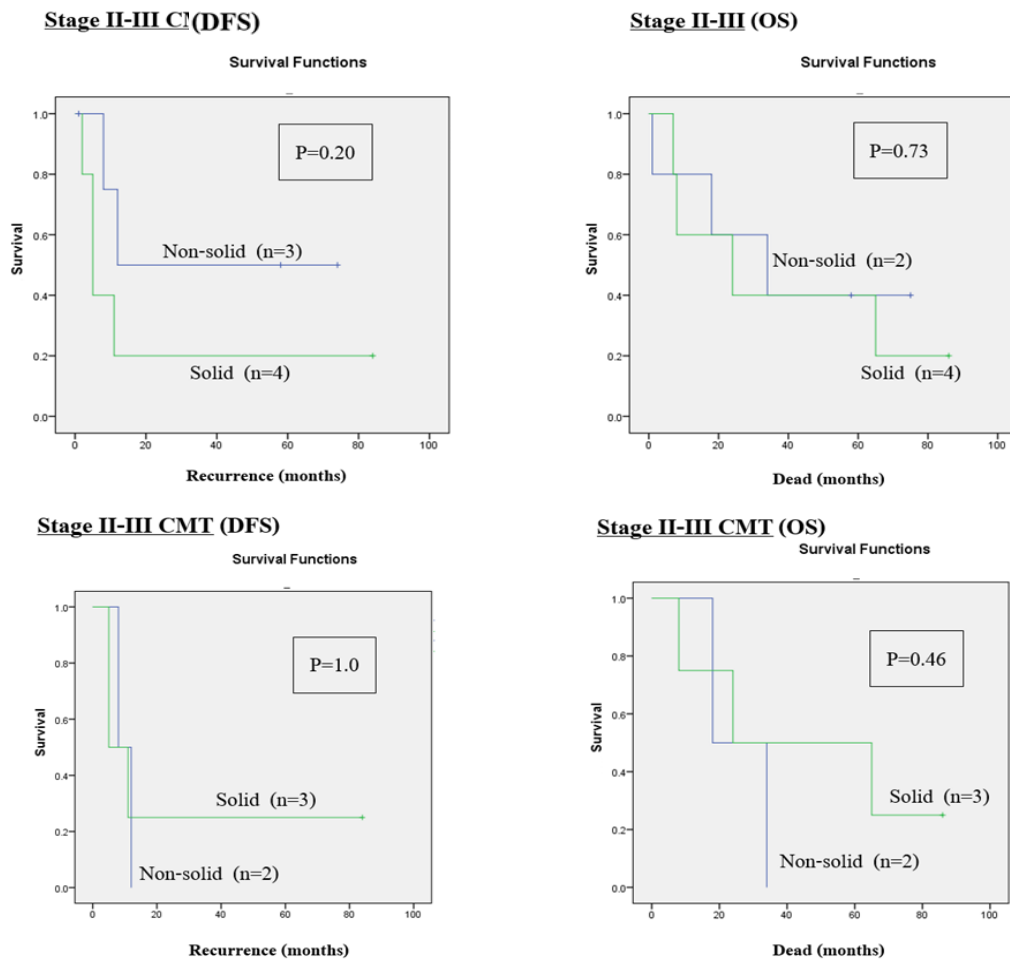
แผนภูมิที่ 7 แสดงระยะเวลาการอยู่รอด (overall survival) เปรียบเทียบระหว่าง solid และ non-solid pattern

ตารางที่ 8 ระยะเวลาปลอดโรคและระยะเวลาการอยู่รอดแบ่งตามแบบแผนทางโปรตีโอมิิกส์

สถานะ	ค่ามัธยฐาน (เดือน)	P – value	95% confidence interval
ระยะเวลาปลอดโรค Solid pattern (DFS)	11	0.012	1.46-21.07
Non –solid pattern(DFS)	Not reached		
ระยะเวลาการอยู่รอด Solid pattern (OS)	24	0.09	0.85-6.59
Non –solid pattern (OS)	59		

จากการวิเคราะห์ระยะเวลาปลอดโรค (disease free survival) พบว่า กลุ่ม solid pattern มีระยะเวลาปลอดโรค อยู่ที่ 11 เดือน เทียบกับกลุ่ม non-solid pattern คือ not reached โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.012)

ส่วนการวิเคราะห์ระยะเวลาการอยู่รอด (overall survival) พบว่า กลุ่ม solid pattern มีระยะเวลาการอยู่รอดเป็น 24 เดือน เทียบกับ กลุ่ม non-solid pattern เป็น 59 เดือน ซึ่ง non-solid pattern มีระยะเวลาการอยู่รอดที่ดีกว่า แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 13, 14 และตารางที่ 8)



แผนภูมิที่ 8 แสดงมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาระยะที่ 2-3 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม solid pattern และกลุ่ม non-solid pattern ตามระยะเวลาปลอดโรค (A) และระยะเวลาการอยู่รอด (B), มะเร็งปอดระยะที่ 2-3 ที่ได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด ตามระยะเวลาปลอดโรค (C) และระยะเวลาการอยู่รอด (D)

มะเร็งปอดระยะที่ 2-3 เมื่อวิเคราะห์ระยะเวลาปลอดโรค (DFS) และระยะเวลาการอยู่รอด (OS) พบว่า ในกลุ่ม solid pattern มีแนวโน้มแย่กว่า กลุ่ม non-solid pattern แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.2, P=0.73 ตามลำดับ) (รูปที่ 15A, 15B) ส่วนมะเร็งปอดระยะที่ 2-3 ที่ได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด พบว่า ระยะเวลาปลอดโรคและระยะเวลาการอยู่รอด ในกลุ่ม solid pattern ไม่พบความแตกต่างกันเมื่อเทียบกับ กลุ่ม non-solid pattern (P=1.0, P=0.46 ตามลำดับ) (รูปที่ 15C, 15D)

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

การจำแนกชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา มีความสำคัญในทางคลินิก แม้ว่าความแตกต่างของแต่ละชนิดย่อย จะแยกแยะได้โดยใช้การดูลักษณะทางพยาธิวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์ แต่พบว่าอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวินิจฉัยได้หลายประการเช่น จากการที่ต้องให้พยาธิแพทย์เป็นผู้วินิจฉัย โดยเป็นการประมาณตามชนิดย่อยที่เด่นซึ่งเห็นจากการส่องกล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้อาจต้องอาศัยประสบการณ์ร่วมด้วย ดังนั้นจึงอาจได้รับการวินิจฉัยแตกต่างกันไปในพยาธิแพทย์แต่ละคน หรือการที่ก้อนมะเร็งมีความหลากหลายของชนิดย่อยในก้อนเดียวกัน ซึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อนในแง่ของการตัดบริเวณใดบริเวณหนึ่งแล้วส่งย้อม โดยไม่สามารถบอกลักษณะทางพยาธิวิทยาได้ทั่วถึงทั้งก้อนเนื้องอก หรือการที่ต้องวินิจฉัยจากชนิดย่อยที่เด่น (predominant subtype) โดยไม่ได้มีเกณฑ์การแบ่งที่แน่นอน เพื่อมาใช้ในการกำหนดว่าก้อนมะเร็งนั้น มีชนิดย่อยชนิดใดปริมาณมากที่สุด อีกทั้งมะเร็งปอดในระยะต้นแม้ได้รับการผ่าตัดปอดแล้ว แต่พบว่าจำนวนหนึ่งมีการกลับเป็นซ้ำของโรค⁽²¹⁾ โดยถ้ามีเครื่องมือหรือสิ่งที่จะช่วยบ่งชี้การกลับเป็นซ้ำของโรคหรือแยกความรุนแรงของโรคได้ละเอียดมากขึ้นในมะเร็งปอดระยะต้น จะทำให้ช่วยในเรื่องการรักษา การพยากรณ์โรคและเฝ้าระวังติดตามการกลับมาของโรค ในการศึกษานี้จึงได้สนใจเกี่ยวกับการที่มีการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็ง แล้วนำมาวิเคราะห์แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ เพื่อใช้แยกความแตกต่างของแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

การจัดกลุ่มมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาแบบใหม่ จากเดิม ปี 2004 มาเป็น ปี 2011⁽³⁾ โดยแยกตามลักษณะทางพยาธิวิทยา, ลักษณะทางคลินิกและชีววิทยาเพื่อประโยชน์ในแง่การรักษา โดยชนิดย่อยแบบที่มีการลุกลาม (invasive subtype) แต่ละชนิดจะมีพยากรณ์โรคที่แตกต่างกัน ถ้าเป็น lepidic predominant adenocarcinoma จะมีพยากรณ์โรคที่ดี ส่วน micropapillary predominant และ solid predominant adenocarcinoma มีพยากรณ์โรคที่ไม่ดี⁽¹¹⁻¹⁵⁾

ในการศึกษานี้ จากผลการจัดกลุ่มตามลำดับชั้น (hierarchical clustering) และวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis หรือ PCA) พบว่าการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี unsupervised คือนำโปรตีนจำนวน 445 ตัวมาวิเคราะห์โดยไม่มีการระบุผลที่ต้องการหรือประเภทไว้ก่อน แล้วให้โปรแกรมคอมพิวเตอร์หาโครงสร้างของข้อมูลขาเข้าเอง ซึ่งวิธีนี้ไม่สามารถที่จะจัดกลุ่มโปรตีนเป็นแบบแผนเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างแต่ละชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา

มาได้ อาจเนื่องมาจากมีการแบ่งกลุ่มที่นำมาวิเคราะห์มากเกินไปหรือขนาดตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีจำนวนน้อยไป จึงนำมาวิเคราะห์โดยวิธี supervised ซึ่งเป็นวิธีการจัดการข้อมูลโดยมีการระบุผลที่ต้องการหรือประเภทไว้ก่อนแล้วเชื่อมโยงกับข้อมูลเพื่อค้นหาผลลัพธ์ที่ต้องการทราบ ซึ่งการศึกษานี้ได้นำค่าของโปรตีนที่ได้มาทำ statistical analysis คือวิเคราะห์ระหว่าง solid-lepidic, solid-acinar โดยใช้ Student's t-test แล้วจึงได้โปรตีนที่มีความสำคัญทางสถิติ 49 ตัว นำมาจัดกลุ่ม พบว่าสามารถจัดกลุ่มของโปรตีนที่มีค่าใกล้เคียงกันได้ โปรตีนที่สามารถจัดกลุ่มที่แสดงออกมาเป็นแบบแผนเดียวกันได้ คือกลุ่มที่มีพยาธิวิทยาเป็น solid predominant แต่พบว่ามี acinar predominant ปะปนเข้ามา 1 ตัวอย่าง โดยเมื่อทบทวนกลับไปพยาธิวิทยาของ acinar predominant ตัวอย่างนี้ (รูปที่ 12 รหัส LU4) พบว่ามีทั้งชนิดย่อยที่เป็น acinar และ solid ร่วมกัน และพบว่ามีระยะปลอดโรคเพียง 5 เดือน จึงเป็นไปได้ว่าแบบแผนทางโปรตีนโอมิกส์มีความแม่นยำในการบ่งบอกพยากรณ์ของโรค หรือสามารถจัดกลุ่มตามพยากรณ์โรคได้ดีกว่าการใช้ลักษณะทางพยาธิวิทยาจากการส่องกล้องจุลทรรศน์ ส่วนเมื่อวิเคราะห์ปัจจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าเพศเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ solid pattern อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบเป็นเพศชาย มากกว่าเพศหญิง จึงอาจเป็นไปได้ว่าเพศชายที่เป็นกลุ่ม solid pattern มีพยากรณ์โรคที่แย่มากกว่าเพศหญิง ส่วนระยะของโรค (stage) พบว่าระยะที่ 2-4 มีแนวโน้มว่าจะเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ solid pattern มากกว่าระยะที่ 1 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด และการรักษาเสริมฉายแสง พบว่าการได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด สัมพันธ์กับ solid pattern อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.029$) ส่วนการรักษาเสริมฉายแสง มีแนวโน้มจะสัมพันธ์กับ solid pattern แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.088$) จากข้อมูลดังกล่าวอาจจะเป็นไปได้ว่ากลุ่ม solid pattern มีพยากรณ์โรคที่แย่มากกว่ากลุ่ม non-solid pattern จึงทำให้ solid pattern พบมีระยะของโรคที่สูงกว่า และทำให้ได้รับการรักษาเสริมหลังผ่าตัดมากกว่ากลุ่ม non-solid pattern

สำหรับการกลับเป็นซ้ำของโรค (recurrence of disease) สัมพันธ์กับ solid pattern มากกว่ากลุ่ม non-solid pattern อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.012$) และ พบว่ากลุ่ม solid pattern มีแนวโน้มสัมพันธ์กับ การเสียชีวิต มากกว่า non-solid pattern แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.09$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าขนาดตัวอย่าง (sample size) ไม่เพียงพอที่จะตรวจพบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม solid pattern กับ non-solid pattern อีกข้อมูลที่วิเคราะห์ได้จากการจัดกลุ่มแบบเป็นลำดับชั้น (Hierarchical clustering analysis) ตามการแสดงออกของโปรตีนและการจัดกลุ่มด้วยวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis) พบว่าในกลุ่ม solid pattern มีผลลัพธ์ทางคลินิกที่แยกว่า คือ ระยะปลอดโรค (disease free survival) ในกลุ่ม solid pattern เป็น 11 เดือน เทียบกับ กลุ่ม non-solid pattern เป็น not reach โดยแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (95% CI 1.46-21.07, $P = 0.012$) อีกทั้งระยะเวลาการอยู่รอด (overall survival) ในกลุ่ม solid pattern เป็น 24 เดือน เทียบกับ กลุ่ม non-solid pattern เป็น 59 เดือน แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (95% CI 0.85-6.59, $P = 0.09$)

การกลับเป็นซ้ำของโรคเมื่อวิเคราะห์ในการศึกษานี้ทั้งแบบเฉพาะที่และแพร่กระจายพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง solid pattern กับ non-solid pattern ($P=1.0$) ส่วนตำแหน่งการกลับเป็นซ้ำทั้งแบบตำแหน่งเดียวหรือหลายตำแหน่ง พบว่า ไม่แตกต่างกันระหว่าง solid pattern กับ non-solid pattern ($P=0.52$) ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Ujiie และคณะ⁽²¹⁾ ที่พบว่า solid predominant subtype จะมีการกลับเป็นซ้ำของโรคแบบแพร่กระจายมากกว่าแบบเฉพาะที่ และแพร่กระจายไปหลายตำแหน่งมากกว่าตำแหน่งเดียว สำหรับตำแหน่งที่แพร่กระจายไปและสัมพันธ์กับ solid predominant subtype คือ สมอง, ตับ และต่อมหมวกไต ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่า solid pattern ไม่สัมพันธ์กับตำแหน่งที่กระจายไปได้แก่ สมอง, ปอด, ตับ, กระดูก, ต่อมหมวกไต และต่อมน้ำเหลือง ($P=0.44, 1.0, 1.0, 0.44, NA$ และ 1.0 ตามลำดับ) การวิเคราะห์ระยะปลอดโรคพบว่า ไม่แตกต่างกันระหว่าง solid pattern กับ non-solid pattern ที่ 12 เดือนและ 24 เดือน ($P=0.2, 1.0$ ตามลำดับ) แต่มีแนวโน้มว่า solid pattern จะสัมพันธ์กับระยะปลอดโรคที่ ≤ 12 เดือน ในขณะที่การศึกษาของ Ujiie และคณะ⁽²¹⁾ พบว่า solid predominant subtype สัมพันธ์กับการกลับเป็นซ้ำของโรคที่ ≤ 24 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะการศึกษาของ Ujiie และคณะ⁽²¹⁾ เป็นมะเร็งปอดระยะที่ 1 แต่ในการศึกษานี้เป็น ระยะที่ 1-3 คือระยะของโรคสูงกว่า จึงมีแนวโน้มว่าระยะปลอดโรคจะสั้นกว่า อีกทั้งขนาดตัวอย่างมีจำนวนน้อยในการศึกษานี้ซึ่งอาจทำให้ผลการวิเคราะห์ไม่ไปด้วยกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้

จากผลการศึกษาวิจัย มีโปรตีนที่น่าสนใจที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ซึ่งอาจจะศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ รวมทั้งใช้เป็นเครื่องมือสำหรับการทำนายหรือการพยากรณ์โรคต่อไป คือ Heat shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1)⁽³²⁾ พบว่า เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดเนื้องอกผ่านทางการส่งสัญญาณตามเส้นทาง (signaling pathways) เช่น epidermal growth factor receptor (EGFR), human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) โดยถ้า HSP90AB1 พบมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น จะสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา โปรตีนอีกตัวคือ Isoform 2 of 40S ribosomal protein S3 (RPS3)⁽³³⁾ โดยทำหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ, การเปลี่ยนแปลง, การพัฒนา, การตายของเซลล์, การถอดรหัสในเซลล์ ซึ่งเมื่อ RPS3 ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ทำให้เซลล์ไม่ตาย ส่งผลต่อการรักษามะเร็งปอดทำให้เกิดการต่อต้านการฉายรังสี (radioresistance) ขึ้นโปรตีนอื่นเช่น Annexin A3 (ANXA3)⁽³⁴⁾ พบว่า ANXA3 แสดงออกสูง เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการกลับมาของโรค, การ

แพร่กระจายของเนื้องอก, ระยะเวลาการอยู่รอดลดลงในมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา อันเป็นผลมาจาก ANXA3 สามารถส่งเสริมให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่(angiogenesis) ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นผ่านทาง vascular endothelial growth factor (VEGF) และ basic fibroblast growth factor (bFGF) ซึ่งอาจจะช่วยทำนายเรื่องการแพร่กระจายของเนื้องอกด้วย ต่อมาโปรตีนชื่อ Annexin A4 (ANXA4) (35) มีความสำคัญคือ ถ้า ANXA4 มีการเพิ่มขึ้นในมะเร็งปอด พบว่าเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมให้ที่โรคเป็นมากขึ้นและมีการดื้อต่อเคมีบำบัดเช่น paclitaxel ดังนั้น ANXA4 จึงอาจจะเป็เป้าหมายของการรักษาต่อไป ส่วนการที่มี Far upstream sequence element-binding protein-1 (FBP-1) แสดงออกเพิ่มขึ้น⁽³⁶⁾ เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวนៃไมโครทิวบูล ทำให้เพิ่มการเติบโตของมะเร็งและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง ซึ่ง FBP-1 อาจเป็นเป้าหมายในการรักษาต่อไป โปรตีนที่เป็นปัจจัยเกี่ยวกับการพยากรณ์โรค มีอีกหลายตัวเช่น Elongation factor 2 (eEF2), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Nucleophosmin (NPM1), Nucleolin เป็นโปรตีนที่เป็นตัวบ่งชี้ถึงการมีผลลัพธ์ที่ไม่ดีหลังการผ่าตัดรักษาในมะเร็งปอดระยะต้น⁽³⁷⁻⁴⁰⁾ อีกแง่มุมหนึ่งของการนำโปรตีนเหล่านี้มาใช้เพิ่มเติมนอกเหนือจากการเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำนายหรือพยากรณ์โรค นั่นคือ อาจจะนำมาใช้ตรวจเพื่อช่วยยืนยันผลชิ้นเนื้อว่าเข้าได้กับชนิดย่อยที่เป็น solid แม้ว่าลักษณะทางพยาธิวิทยาจะเป็น non-solid predominant โดยถ้าตรวจพบโปรตีนเหล่านี้ก็จะช่วยยืนยันว่าเข้าได้กับชนิดย่อยที่เป็น solid ทำให้บ่งบอกว่าเป็นพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ทั้งนี้โปรตีนดังที่กล่าวมาต้องได้รับการศึกษาต่อไป เพื่อให้นำมาใช้ได้จริงในอนาคต

จากการศึกษาของ Yang Zhang และคณะ⁽⁴¹⁾ พบว่ามะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 2-3 ในกลุ่ม solid predominant มี ระยะปลอดโรค และอัตราการอยู่รอด น้อยกว่ากลุ่ม non-solid predominant อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลในการศึกษานี้ที่กลุ่ม solid pattern ระยะที่ 2-3 มีแนวโน้มแย่กว่า แต่จากการศึกษาของ Yang Zhang และคณะ⁽⁴¹⁾ พบว่ามะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 2-3 ที่ได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัดในกลุ่ม solid predominant มี ระยะปลอดโรค และอัตราการอยู่รอด น้อยกว่ากลุ่ม non-solid predominant อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแตกต่างจากผลในการศึกษานี้ที่กลุ่ม solid pattern มีแนวโน้มดีกว่าเมื่อได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาแบบ cohort ของ Warth A และคณะ⁽¹⁹⁾ ที่พบว่าหลังการผ่าตัดมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา ระยะที่ 1-4 การให้การรักษาเสริมเคมีบำบัดมีแนวโน้มระยะปลอดโรคดีกว่าในกลุ่ม solid predominant แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นไปได้ว่าใน solid predominant มักมีการกลับเป็นซ้ำของโรคแบบกระจายไปในอวัยวะที่ไกลออกไป⁽²¹⁾ จึงทำให้ได้ประโยชน์จากการรักษาเสริมหลังการผ่าตัดด้วยการให้ยาเคมีบำบัด อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้มีขนาดตัวอย่างจำนวนน้อย จึงอาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม เป็นไป

ได้ว่า solid pattern อาจจะสามารถทำนาย (predictive) ประโยชน์ของการได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัดหรือพยากรณ์โรคได้ (prognosis)หลังให้การรักษาเสริมด้วยยาเคมีบำบัด ซึ่งควรมีการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อยืนยัน

5.2 สรุปผล

ชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาคือ solid predominant แยกความแตกต่างจาก non-solid predominant ได้ด้วยแบบแผนทางโปรตีนโอมิคส์ ส่วน solid pattern สัมพันธ์เพศชาย,ระยะปลอดโรค และการได้รับการรักษาเสริมเคมีบำบัด รวมทั้งมีแนวโน้มว่าจะสัมพันธ์กับอัตราการอยู่รอด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มโปรตีนที่พบความแตกต่างจากแบบแผนทางโปรตีนโอมิคส์ สามารถนำมาพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการวินิจฉัยโรคหรือศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นเป้าหมายในการรักษาต่อไปในอนาคต

5.3 ข้อดีของการศึกษานี้

- ค้นพบเครื่องมือใหม่ในการตรวจวินิจฉัยโรคในส่วนที่ยังไม่มีข้อกำหนดที่ชัดเจน เพื่อเพิ่มความถูกต้องในการวินิจฉัย เช่น ในชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาที่ตัดสินด้วยชนิดย่อยใดเด่นกว่ากัน

- เป็นการวิเคราะห์ถึงระดับโมเลกุล จึงมีความละเอียดกว่าการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางพยาธิวิทยาจากการส่องกล้องจุลทรรศน์

5.4 ข้อด้อยของการศึกษานี้

การมีข้อจำกัดเรื่องเวลา เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาในการเตรียมตัวอย่างที่ซับซ้อน ต้องมีการวางแผนและกำหนดวิธีเตรียมตัวอย่าง เพื่อคำนวณปริมาณตัวอย่างชิ้นเนื้อ ให้เพียงพอต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโตรเมทรี เพื่อให้มีจำนวนโปรตีนออกมาให้เพียงพอต่อการเข้าเครื่องแต่ละครั้ง เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างแต่ละครั้งมีค่าใช้จ่ายสูง และมีปริมาณชิ้นเนื้อตัวอย่างที่จำกัด รวมทั้งมีปัญหาเครื่องแมสสเปคโตรเมทรีชำรุด ต้องใช้เวลาแก้ไข ทำให้ล่าช้าในการศึกษา หรือเครื่องมือวัดปริมาณโปรตีนขาดแคลน รอสั่งซื้อ อีกข้อจำกัดคือก้อนมะเร็งมีความหลากหลายของชนิดย่อยภายในก้อนเดียว ทำให้การดูแลลักษณะทางพยาธิวิทยาจากครั้งแรกที่ย้อมด้วยฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน (H&E) อาจจะไม่ใชชนิดย่อยเดียวกันกับบริเวณของเนื้องอกที่ตัดเอามาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโตรเมทรี จึงแก้ไขด้วยการตัดและย้อมชิ้นเนื้อแช่แข็ง (fresh frozen tissue)บริเวณ

ใกล้เคียงกับที่จะเอาไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโตรเมทรี แต่กลับพบว่าคุณภาพไม่ดีหลังการย่อยชิ้นเนื้อแช่แข็ง และจำแนกชนิดย่อยทางพยาธิวิทยาได้ไม่ชัดเจน อาจเป็นผลจากการเก็บชิ้นเนื้อไว้เป็นเวลานาน ส่วนเรื่องระยะเวลาในการทำวิจัยมีจำกัด จึงนำชิ้นเนื้อมาวิเคราะห์ได้เพียง 27 ตัวอย่าง ซึ่งเดิมวางแผนว่าจะทำการวิเคราะห์ 64 ตัวอย่าง ดังนั้นจำนวนขนาดตัวอย่างในการศึกษานี้จึงมีขนาดน้อยเกินไป ทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างของระยะเวลาการอยู่รอดระหว่างกลุ่ม solid pattern กับ non- solid pattern ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรือไม่เพียงพอที่จะตรวจพบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ solid pattern ได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษานี้พบว่แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์สามารถแยกกลุ่มของ solid predominant ออกจากชนิดย่อยอื่นๆของมะเร็งปอดได้ ส่วนโปรตีนที่ค้นพบและนำมาใช้วิเคราะห์แบบแผนทางโปรตีโอมิกส์ (proteomic signatures) ของ solid predominant ในมะเร็งปอด จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาจำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้ความเชื่อมั่นสูงขึ้น นอกจากนี้ ทั้งนี้การตรวจสอบด้วยเครื่องแมสสเปคโตรเมทรีในการศึกษานี้เป็นการศึกษาโปรตีนโดยรวม (pooled protein) โดยยังไม่ได้ทำการแยกส่วนของโปรตีน (fractionation) ทางผู้วิจัยมีแผนที่จะทำการแยกส่วนโปรตีน ซึ่งจะสามารถตรวจสอบโปรตีนที่มีปริมาณน้อย แต่มีความแตกต่างในกลุ่มตัวอย่างได้ละเอียดมากขึ้น

5.5 ข้อเสนอแนะ

1. การจัดเตรียมความพร้อมของอุปกรณ์ รวมทั้งคำนวณระยะเวลาตามจำนวนตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อให้งานวิจัยแล้วเสร็จตามเวลาที่กำหนด
2. ลดความคลาดเคลื่อนในส่วนของการวิเคราะห์ชนิดย่อยของมะเร็งปอด อันเนื่องมาจากความหลากหลายในเนื้อเยื่อมะเร็งก้อนเดียวกัน จึงควรมีการตัดและย่อยเนื้อเยื่อหลังการผ่าตัดทันที ร่วม กับตัดชิ้นเนื้อมะเร็งบริเวณใกล้เคียงไว้วิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโตรเมทรี
3. ส่วนโปรตีนที่ค้นพบว่ามีความสำคัญกลุ่ม solid pattern อาจจะไปศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เพื่อประโยชน์ด้านการวินิจฉัย การรักษา หรือบอกพยากรณ์ของโรค

รายการอ้างอิง

1. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *European journal of cancer*. 2001;37 Suppl 8:S4-66.
2. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2007;2(8):694-705.
3. Zugazagoitia J, Enguita AB, Nunez JA, Iglesias L, Ponce S. The new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification from a clinical perspective: current concepts and future prospects. *Journal of thoracic disease*. 2014;6(Suppl 5):S526-36.
4. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respiratory research*. 2003;4:12.
5. Seike M, Kondo T, Fujii K, Okano T, Yamada T, Matsuno Y, et al. Proteomic signatures for histological types of lung cancer. *Proteomics*. 2005;5(11):2939-48.
6. Surati M, Robinson M, Nandi S, Faoro L, Demchuk C, Rolle CE, et al. Proteomic characterization of non-small cell lung cancer in a comprehensive translational thoracic oncology database. *Journal of clinical bioinformatics*. 2011;1(8):1-11.
7. Kerr KM. Classification of Lung Cancer: Proposals for Change? *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2012;136(10):1190-3.
8. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(8):992-1001.
9. Conde E, Angulo B, Izquierdo E, Paz-Ares L, Belda-Iniesta C, Hidalgo M, et al. Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2013;15(7):503-8.

10. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011;6(2):244-85.
11. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2011;24(5):653-64.
12. Hung JJ, Jeng WJ, Chou TY, Hsu WH, Wu KJ, Huang BS, et al. Prognostic value of the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/ European Respiratory Society lung adenocarcinoma classification on death and recurrence in completely resected stage I lung adenocarcinoma. *Annals of surgery*. 2013;258(6):1079-86.
13. Hung JJ, Yeh YC, Jeng WJ, Wu KJ, Huang BS, Wu YC, et al. Predictive value of the international association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification of lung adenocarcinoma in tumor recurrence and patient survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(22):2357-64.
14. Sica G, Yoshizawa A, Sima CS, Azzoli CG, Downey RJ, Rusch VW, et al. A grading system of lung adenocarcinomas based on histologic pattern is predictive of disease recurrence in stage I tumors. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(8):1155-62.
15. Riquet M, Foucault C, Berna P, Assouad J, Dujon A, Danel C. Prognostic value of histology in resected lung cancer with emphasis on the relevance of the adenocarcinoma subtyping. *The Annals of thoracic surgery*. 2006;81(6):1988-95.

16. Tsuta K, Kawago M, Inoue E, Yoshida A, Takahashi F, Sakurai H, et al. The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung cancer*. 2013;81(3):371-6.

17. Yanagawa N, Shiono S, Abiko M, Ogata SY, Sato T, Tamura G. New IASLC/ATS/ERS classification and invasive tumor size are predictive of disease recurrence in stage I lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2013;8(5):612-8.

18. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2011;6(9):1496-504.

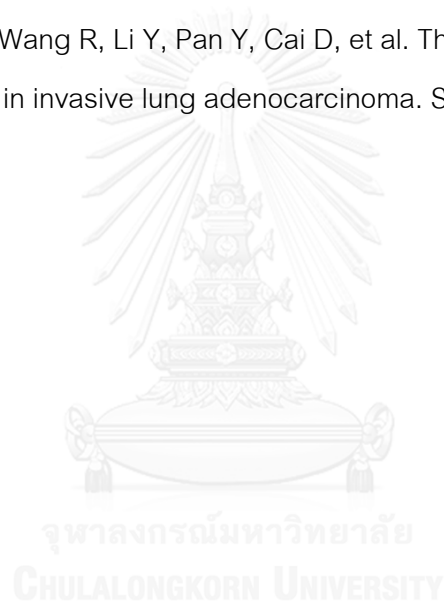
19. Warth A, Muley T, Meister M, Stenzinger A, Thomas M, Schirmacher P, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/ European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(13):1438-46.

20. Kadota K, Yeh YC, Sima CS, Rusch VW, Moreira AL, Adusumilli PS, et al. The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: a conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2014;27(5):690-700.

21. Ujiie H, Kadota K, Chaft JE, Buitrago D, Sima CS, Lee MC, et al. Solid Predominant Histologic Subtype in Resected Stage I Lung Adenocarcinoma Is an Independent Predictor of Early, Extrathoracic, Multisite Recurrence and of Poor Postrecurrence Survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(26):2877-84.
22. Nitadori J, Bograd AJ, Kadota K, Sima CS, Rizk NP, Morales EA, et al. Impact of micropapillary histologic subtype in selecting limited resection vs lobectomy for lung adenocarcinoma of 2cm or smaller. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(16):1212-20.
23. Mok T, Yang JJ, Lam KC. Treating patients with EGFR-sensitizing mutations: first line or second line--is there a difference? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(8):1081-8.
24. Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(8):1105-11.
25. Martin-Bernabe A, Cortes R, Lehmann SG, Seve M, Cascante M, Bourgoin-Voillard S. Quantitative proteomic approach to understand metabolic adaptation in non-small cell lung cancer. *Journal of proteome research*. 2014;13(11):4695-704.
26. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002;359(9306):572-7.
27. Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clinical chemistry*. 2002;48(8):1296-304.
28. Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer research*. 2002;62(13):3609-14.

29. Solis LM, Behrens C, Raso MG, Lin HY, Kadara H, Yuan P, et al. Histologic patterns and molecular characteristics of lung adenocarcinoma associated with clinical outcome. *Cancer*. 2012;118(11):2889-99.
30. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, Massion PP, Larsen PH, White BC, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 2003;362(9382):433-9.
31. Gharib TG, Chen G, Wang H, Huang CC, Prescott MS, Shedden K, et al. Proteomic analysis of cytokeratin isoforms uncovers association with survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia (New York, NY)*. 2002;4(5):440-8.
32. Wang M, Feng L, Li P, Han N, Gao Y, Xiao T. [Hsp90AB1 Protein is Overexpressed in Non-small Cell Lung Cancer Tissues and Associated with Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma Patients]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*. 2016;19(2):64-9.
33. Yang HJ, Youn H, Seong KM, Jin YW, Kim J, Youn B. Phosphorylation of ribosomal protein S3 and antiapoptotic TRAF2 protein mediates radioresistance in non-small cell lung cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(5):2965-75.
34. Liu YF, Xiao ZQ, Li MX, Li MY, Zhang PF, Li C, et al. Quantitative proteome analysis reveals annexin A3 as a novel biomarker in lung adenocarcinoma. *The Journal of pathology*. 2009;217(1):54-64.
35. Wei B, Guo C, Liu S, Sun MZ. Annexin A4 and cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015;447:72-8.
36. Singer S, Malz M, Herpel E, Warth A, Bissinger M, Keith M, et al. Coordinated expression of stathmin family members by far upstream sequence element-binding protein-1 increases motility in non-small cell lung cancer. *Cancer research*. 2009;69(6):2234-43.
37. Jeong EG, Lee SH, Yoo NJ, Lee SH. Absence of nucleophosmin 1 (NPM1) gene mutations in common solid cancers. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2007;115(4):341-6.

38. Puzone R, Savarino G, Salvi S, Dal Bello MG, Barletta G, Genova C, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene over expression correlates with poor prognosis in non small cell lung cancer patients. *Molecular cancer*. 2013;12(1):97.
39. Sun HG, Dong XJ, Lu T, Yang MF, Wang XM. Clinical value of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) in non-small cell lung cancer patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;14(11):6533-5.
40. Zhao H, Huang Y, Xue C, Chen Y, Hou X, Guo Y, et al. Prognostic significance of the combined score of endothelial expression of nucleolin and CD31 in surgically resected non-small cell lung cancer. *PloS one*. 2013;8(1):e54674.
41. Zhang Y, Li J, Wang R, Li Y, Pan Y, Cai D, et al. The prognostic and predictive value of solid subtype in invasive lung adenocarcinoma. *Scientific reports*. 2014;4:7163.



ภาคผนวก



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

11. Pattern of recurrence

Local

Regional

Distance metastasis

Organ involvement Brain

Lung

Liver

Adrenal

Bone

Lymph node

Other.....

12. Number organ metastasis.....

13. Metastatic treatment

15. Date of progression

16. Last follow up

17. Date of death

Molecular study

18. Proteomics pattern



ภาคผนวก ข

รูปที่ 13 แสดงปริมาณโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์ใน solid predominant adenocarcinoma

Protein Name	Subtype Samples	SOLID LU105 S	SOLID LU91 S	SOLID LU46 S	SOLID LU26 S	SOLID LU70 S	SOLID LU81 S	SOLID AVERAGE
		LU105 S	LU91 S	LU46 S	LU26 S	LU70 S	LU81 S	AVERAGE
		TMT1	TMT2	TMT2	TMT2	TMT3	TMT3	
Accessi	Abund	Abund	Abund	Abund	Abund	Abund	Abund	ces (Sca
Epididymi V9HWG3	-0.30401	-0.98564	-0.60603	-0.54793	0.70133	-0.61706	-0.39322	
cDNA FLJ7 A8K4Z4	-0.06341	0.16092	0.05242	-0.03801	0.09085	0.38736	0.09836	
Elongatio P13639	0.41359	0.32539	0.18777	0.22897	0.15575	0.17249	0.24733	
T-comple P50990	0.12961	0.20038	0.48233	-0.16165	0.0895	-0.16165	0.09642	
Heteroger A0A024R4	-0.01159	0.42438	-0.1078	-0.0145	0.16479	0.61164	0.17782	
Leucine-ri Q96AG4	0.12565	-0.02621	-0.06794	0.1865	0.06074	0.02715	0.05098	
40S ribosc M0R0R2	0.03422	0.34483	0.52105	0.20914	-0.00289	0.16607	0.21207	
40S ribosc P62701	0.14274	0.6526	0.54794	0.36289	0.88127	0.67356	0.5435	
Isoform 2 P23396-2	0.2762	0.70221	0.51501	0.49365	0.60312	0.58111	0.52855	
Alpha-2 gl D1MGQ2	-0.45799	-1.87832	-2.12029	-1.2969	-0.79586	-0.6529	-1.20038	
Myosin he B1PS43	-0.61927	-1.1976	-1.12973	-0.57777	-0.34924	-1.53116	-0.90079	
Chromobc Q13185	0.23634	-0.05589	-0.02034	-0.32554	-0.25498	-0.03949	-0.07665	
60S ribosc P62906	-0.43245	0.14405	-0.13765	-0.13606	-0.35476	0.01578	-0.15018	
40S ribosc P62277	0.01721	0.50386	0.39726	0.338	0.07587	0.07313	0.23422	
Histone H P16401	0.45312	0.58111	0.77821	0.71282	0.62012	1.31904	0.74407	
cDNA, FLI B2R9K8	0.5724	0.71721	1.06626	0.69243	0.73725	0.46989	0.70924	
Proteason Q59EG8	0.45838	0.94261	0.63227	0.32077	0.45523	0.39944	0.53478	
40S ribosc A0A024R2	0.45418	0.60597	0.42653	0.50589	0.64155	0.53406	0.52803	
cDNA FLJ6 B4DLV7	0.30217	0.33571	0.61918	0.45733	0.35502	0.34369	0.40218	
Ribosoma Q8WVX7	0.41792	1.26963	1.12035	1.00216	0.8528	0.86315	0.921	
40S ribosc P62263	0.20789	0.82701	0.82944	0.67717	0.01436	0.29396	0.47497	
cDNA FLJ7 A8K088	0.08134	0.13488	0.24123	0.04124	-0.23616	-0.01159	0.04182	
Far upstre E9PEB5	0.29866	0.12697	0.32654	0.14405	0.09221	0.10568	0.18235	
Nucleophi P06748	0.38957	1.25942	0.6107	0.59837	-0.16327	0.02998	0.45413	
GTP-bindi J3KQE5	0.37072	0.24853	0.50284	0.25701	0.1865	0.38736	0.3255	
Protein RF A0A0A6Y1	0.37184	0.4957	0.54597	0.21412	0.40708	0.73466	0.46156	
Isoform A Q07955-2	0.57046	0.66539	0.83996	0.45523	0.08542	0.69421	0.55178	
Proteason P28070	0.56657	0.32884	0.48543	0.08542	-0.26361	0.0115	0.20236	
Peroxi-red P30044	-0.47995	-0.76366	-0.40928	-0.52699	-0.16165	0.15834	-0.36387	
40S ribosc P15880	0.08134	0.37629	0.21164	0.123	0.10568	0.17377	0.17862	
40S ribosc P25398	0.05242	0.36513	0.24732	0.04824	0.18777	0.32769	0.20476	
Napsin-A Q96009	-0.62371	-1.1488	-1.45799	-0.47794	-1.18115	-1.2863	-1.02932	
Isoform 2 P19971-2	0.21909	0.58592	0.09221	-0.02621	0.13619	0.58496	0.26536	
Epididymi D9IAI1	-0.39593	-0.45206	-0.51046	-0.1488	-0.0514	0.04124	-0.2529	
Translin C Q15631	0.66448	-0.18606	0.51602	-0.09234	0.21909	-0.08773	0.17224	
Tryptase E A0A087X1	-0.81604	-1.23447	-1.02915	-0.77596	-0.59946	-0.86775	-0.88714	
Thioredox H9ZYJ2	1.07861	0.45523	1.79286	0.13356	1.15121	0.39287	0.83406	
40S ribosc P62280	0.48852	0.68616	0.97453	0.52607	1.09963	1.10568	0.81343	
Isoform 4 Q13228-4	-0.64837	-0.96016	-0.66887	-0.60384	-0.33279	-0.67807	-0.64868	
Nucleolin P19338	0.38626	0.87578	1.14666	0.50792	0.18269	0.15186	0.54186	
Annexin (Q6LES2	-0.30579	-0.31473	-0.77103	-0.40163	-0.47193	-0.78091	-0.50767	
PDZ and L O00151	0.06488	-0.28104	-0.77103	-0.18935	-0.26882	-0.3474	-0.29879	
Eukaryoti A0A024R3	0.34596	0.98841	1.50995	0.50284	0.68527	0.76808	0.80009	
40S ribosc Q6IPX4	1.13553	1.06419	0.9855	0.61164	0.2762	0.4957	0.76146	
Heat choc P08238	0.43189	1.06005	1.01578	0.75446	0.37407	0.0072	0.60724	
Elongatio E9PRY8	0.23879	0.36737	1.06557	0.05797	0.12168	0.10165	0.3255	
Isoform 2 P26641-2	0.123	0.72857	1.13225	0.25459	0.28451	0.419	0.49032	
Glycerald P04406	0.03703	0.72421	1.29337	0.36737	1.24245	-0.04394	0.60342	
Annexin AP12429	-0.71549	-1.23786	-0.90239	-0.66658	-0.662	-0.18935	-0.72894	

แสดง

ปริมาณโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์ใน solid predominant adenocarcinoma

แสดงปริมาณโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์ใน solid predominant adenocarcinoma

ตารางแถวที่ 1 คือ ชื่อโปรตีน

ตารางแถวที่ 2 คือ รหัสโปรตีน

ตารางแถวที่ 3-8 คือ ปริมาณโปรตีน ($m/z = \text{mass-to-charge}$)

ตารางแถวสุดท้าย คือ ปริมาณเฉลี่ยของโปรตีนแต่ละตัวจากแถวที่ 3-8

TMT = Tandem mass tag (สารติดฉลาก) แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ TMT1, TMT2, TMT3

แต่ละกลุ่มใหญ่ ใช้ติดฉลากได้ 10 ตัวอย่างขึ้นเนื้อ จึงแบ่งติดฉลาก 9 ตัวอย่างขึ้นเนื้อ และ 1ตัวอย่าง

ของpooled sample

รูปที่ 14 แสดงปริมาณโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์ใน acinar predominant adenocarcinoma



Protein Name	Subtype Samples	LEPIDIC LU22 L	LEPIDIC LU153 L	LEPIDIC LU77 L	LEPIDIC LU90 L	LEPIDIC LU75 L	LEPIDIC LU68 L	LEPIDIC LU83 L	LEPIDIC AVERAGE
		TMT1	TMT2	TMT2	TMT2	TMT3	TMT3	TMT3	
Accession	Abundance	Abundance	Abundance	Abundance	Abundance	Abundance	Abundance	Abundance	Scores (Scale)
Epididymis V9HWG3	0.23389	0.55582	0.46048	-0.1976	0.50182	1.14143	-0.13289	0.36613	
cDNA FLJ7 A8K4Z4	-0.24298	-0.46594	-0.18115	-0.28279	-0.31115	0.01863	-0.14561	-0.23014	
Elongation P13639	-0.35661	-0.57347	-0.03949	-0.29867	-0.30045	-0.21257	0.06901	-0.2446	
T-complex P50990	-0.16165	-0.56064	0.06626	-0.23447	-0.49818	-0.39025	-0.31833	-0.29961	
Heterogeneous A0A024R7	-0.44222	-0.67577	0.1177	-0.99137	-0.21927	-0.14083	-0.18935	-0.36302	
Leucine-ribo Q96AG4	-0.39403	-0.75877	0.12961	0.06488	-0.55004	-0.226	-0.14083	-0.26788	
40S ribosomal M0R0R2	-0.3474	-0.25154	0.20163	0.0635	-0.39593	0.07587	-0.28455	-0.13406	
40S ribosomal P62701	-0.17299	-0.51457	0.09085	0.29514	0.38294	-0.12501	0.38847	0.04926	
Isoform 2 P23396-2	-0.04097	-0.29513	0.22651	0.07587	0.23266	0.13225	0.40272	0.10484	
Alpha-2-globulin D1MGQ2	1.44467	1.30393	-1.45799	-1.64386	0.25338	0.49262	0.67536	0.15259	
Myosin heavy B1P543	0.26903	-0.39783	-0.30045	0.50386	1.1865	0.07313	0.24853	0.22611	
Chromobacterium Q13185	-0.67807	-1.12343	-0.13448	-0.80844	-1.02327	-0.32916	-0.53324	-0.66144	
60S ribosomal P62906	-0.77103	-0.5649	-0.09851	-0.45799	-0.7442	-0.05289	-0.72977	-0.48847	
40S ribosomal P62277	-0.12186	-0.36773	0.2762	0.39835	-0.51251	-0.1665	-0.33279	-0.11812	
Histone H4 P16401	-0.31294	-1.26882	0.08542	0.4844	-0.26361	-0.3419	0.21661	-0.20012	
cDNA, FLJ1 B2R9K8	0.07861	-0.32193	0.338	0.06212	0.32308	-0.10936	0.3774	0.10685	
Proteasome Q59EG8	-0.20756	0.01578	0.40272	0.27739	-0.07248	-0.09851	0.18903	0.07234	
40S ribosomal A0A024R7	0.40926	0.09085	0.22404	0.1776	0.27023	0.39067	0.35502	0.27395	
cDNA FLJ6 B4DLV7	-0.02767	-0.18771	0.15834	0.64893	0.13488	-0.15843	0.16607	0.10491	
Ribosomes Q8WVX7	0.03703	0.2762	0.64062	0.6248	0.11503	0.48749	0.40381	0.36928	
40S ribosomal P62263	0.0635	-0.18606	0.33457	0.50691	-0.6529	-0.1156	-0.21257	-0.03745	
cDNA FLJ7 A8K088	-0.90779	-0.5187	0.03422	-0.32193	-0.57777	-0.3419	-0.54162	-0.45364	
Far upstream E9PEB5	-0.07552	-0.29513	0.18142	0.12565	-0.3603	-0.0604	-0.18606	-0.09576	
Nucleophosmin P06748	-0.04246	-1.074	0.26784	-0.07097	-0.53742	0.25338	-0.32916	-0.21897	
GTP-binding J3KQE5	0.16221	-0.11092	-0.0862	-0.14242	0.08542	-0.04692	-0.27056	-0.05848	
Protein RFA0A0A6Y1	-0.06643	-0.7442	0.15834	0.23511	0.05658	0.1776	-0.11092	-0.04199	
Isoform A Q07955-2	-1.50226	-0.54162	-1.9105	0.61447	-0.06945	-0.97143	-1.38082	-0.82309	
Proteasome P28070	0.06074	-0.39783	-0.5649	0.31962	-0.19429	-0.50226	-0.17462	-0.20765	
Peroxisomal P30044	0.14405	-0.40163	0.53007	1.30276	0.16607	0.28688	-0.01304	0.28788	
40S ribosomal P15880	-0.28104	-0.86512	-0.15843	0.12565	-0.43051	0.04963	-0.65517	-0.31643	
40S ribosomal P25398	-0.49208	-0.76857	0.02715	0.08814	-0.18115	-0.04097	-0.03801	-0.20078	
Napsin-A O96009	1.31557	-0.40354	0.95159	-0.88897	0.69064	0.53804	-0.6529	0.22149	
Isoform 2 P19971-2	-0.31115	-0.46793	0.15316	-0.1504	0.03984	-0.46196	-0.18279	-0.19732	
Epididymis D9IAI1	0.77905	0.02574	0.13356	0.05102	0.44148	0.65718	-0.01596	0.29601	
Translin CQ15631	0.24001	-0.35845	-0.06492	-0.49411	-0.44418	-0.1488	-0.34008	-0.23008	
Tryptase I A0A087X1	0.34255	0.47508	0.82212	-1.0499	0.68167	0.11103	-0.33825	0.14915	
Thioredoxin H9ZYJ2	-0.02034	-0.19429	-0.42469	0.51702	0.48954	0.51803	-0.12029	0.10928	
40S ribosomal P62280	0.10836	-0.85988	0.30918	0.99639	0.71194	-0.04097	0.22651	0.20736	
Isoform 4 Q13228-4	0.83269	-0.32916	0.06626	1.05658	0.67084	0.23266	-0.12343	0.34378	
Nucleolin P19338	0.24489	-0.09234	0.18903	0.33342	-0.02915	0.03562	-0.31653	0.05214	
Annexin I Q6LES2	0.48027	-0.28806	0.05381	1.35502	-0.32013	0.29042	0.69688	0.32403	
PDZ and LIM O00151	0.24489	0.04824	0.00288	-0.09851	0.17632	0.34483	0.34483	0.15193	
Eukaryotic A0A024R7	-0.08773	0.05102	0.2916	0.69421	0.39616	0.71984	0.38847	0.35051	
40S ribosomal Q61PX4	0.16993	-1.52284	0.08406	0.54498	-0.19926	-0.05739	-0.58641	-0.22385	
Heat shock P08238	-0.0604	-0.35661	0.38073	0.02432	-0.35476	-0.24127	-0.06945	-0.09678	
Elongation E9PRY8	-0.20257	-0.57992	-0.04246	-0.00723	-0.41312	-0.16165	-0.06794	-0.2107	
Isoform 2 P26641-2	0.01863	-0.4344	-0.00723	0.24732	-0.06794	-0.03209	0.22033	-0.00791	
Glyceraldehyde P04406	-0.26361	-0.59074	-0.11092	0.14796	-0.39214	-0.52077	0.02148	-0.24411	
Annexin A P12429	-0.12816	0.50792	-0.1047	2.2765	-0.58857	-0.08467	0.43936	0.3311	

ตารางแถวที่ 1 คือ ชื่อโปรตีน, ตารางแถวที่ 2 คือ รหัสโปรตีน

ตารางแถวที่ 3-7 คือ ปริมาณโปรตีน (m/z = mass-to-charge)

ตารางแถวสุดท้าย คือ ปริมาณเฉลี่ยของโปรตีนแต่ละตัวจากแถวที่ 3-7

TMT = Tandem mass tag (สารติดฉลาก) แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ TMT1, TMT2, TMT3

แต่ละกลุ่มใหญ่ ใช้ติดฉลากได้ 10 ตัวอย่างขึ้นไป จึงแบ่งติดฉลาก 9 ตัวอย่างขึ้นไป และ 1 ตัวอย่างของ pooled sample

รูปที่ 16 แสดงปริมาณโปรตีนที่นำมาวิเคราะห์ใน micropapillary predominant adenocarcinoma

Protein Name	Subtype Samples	MICROPAP		MICROPAP AVERAGE
		LU111 M	LU89 M	
		TMT1	TMT2	
Accession	Abundance	Abundance	Abundance	Abundance (Scale)
Epididymi V9HWG3		-0.12343	0.17121	0.02389
cDNA FLJ7 A8K4Z4		-0.68733	-0.17788	-0.43261
Elongatio P13639		0.11636	-0.07552	0.02042
T-comple P50990		-0.14242	-0.20423	-0.17333
Heteroger A0A024Rf		-0.37333	-0.34373	-0.35853
Leucine-ri Q96AG4		-0.31833	-0.13289	-0.22561
40S ribosc M0R0R2		-0.17462	0.16479	-0.00492
40S ribosc P62701		0.10165	0.40599	0.25382
Isoform 2 P23396-2		0.06764	0.26664	0.16714
Alpha-2 gl D1MGQ2		-0.49614	-1.12343	-0.80979
Myosin h B1PS43		0.57628	0.35276	0.46452
Chromobc Q13185		-0.63039	-0.56704	-0.59872
60S ribosc P62906		-0.55004	-0.28455	-0.41729
40S ribosc P62277		-0.19429	0.19912	0.00241
Histone H P16401		-0.26882	0.25942	-0.0047
cDNA, FLJ B2R9K8		-0.06492	0.28096	0.10802
Proteaso Q59EG8		0.15445	0.2857	0.22008
40S ribosc A0A024R2		0.28688	0.38957	0.33822
cDNA FLJ6 B4DLV7		0.21164	0.30451	0.25807
Ribosoma Q8WVX7		0.05797	0.7966	0.42728
40S ribosc P62263		-0.29159	0.46467	0.08654
cDNA FLJ7 A8K088		-0.27579	-0.13765	-0.20672
Far upstre E9PEB5		-0.23107	-0.00433	-0.1177
Nucleoph P06748		0.21288	0.1137	0.16329
GTP-bindi J3KQE5		-0.0908	0.11503	0.01212
Protein Rf A0A0A6Y\		0.22651	0.20789	0.2172
Isoform A Q07955-2		-0.39214	0.20414	-0.094
Proteaso P28070		-0.40736	-0.02474	-0.21605
Peroxi red P30044		0.38073	0.03844	0.20958
40S ribosc P15880		0.0827	0.0229	0.0528
40S ribosc P25398		-0.36401	-0.0604	-0.21221
Napsin-A O96009		0.62761	-0.18279	0.22241
Isoform 2 P19971-2		-0.12186	0.12565	0.00189
Epididymi D9IA11		0.28806	-0.05589	0.11609
Translin C Q15631		0.05797	-0.20923	-0.07563
Tryptase I A0A087X1		0.33113	-0.18935	0.07089
Thioredox H9ZYJ2		0.20914	0.53107	0.37011
40S ribosc P62280		0.08134	0.72596	0.40365
Isoform 4 Q13228-4		0.49365	-0.4344	0.02962
Nucleolin P19338		0.20038	0.18015	0.19026
Annexin (Q6LES2		0.44042	-0.21927	0.11058
PDZ and L O00151		0.35163	0.21164	0.28163
Eukaryoti A0A024R3		0.26303	0.39835	0.33069
40S ribosc Q6IPX4		1.01935	0.68975	0.85455
Heat choc P08238		-0.05739	0.21164	0.07712
Elongatio E9PRY8		0.12433	-0.0862	0.01906
Isoform 2 P26641-2		0.0895	0.04404	0.06677
Glycerald P04406		-0.1016	0.02148	-0.04006
Annexin A P12429		-0.20423	0.0827	-0.06077

ตารางแถวที่ 1 คือ ชื่อโปรตีน, ตารางแถวที่ 2 คือ รหัสโปรตีน

ตารางแถวที่ 3-4 คือ ปริมาณโปรตีน (m/z = mass-to-charge)

ตารางแถวสุดท้าย คือ ปริมาณเฉลี่ยของโปรตีนแต่ละตัวจากแถวที่ 3-4

TMT = Tandem mass tag (สารติดฉลาก) แบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ TMT1, TMT2, TMT3

แต่ละกลุ่มใหญ่ ใช้ติดฉลากได้ 10 ตัวอย่างขึ้นเนื้อ จึงแบ่งติดฉลาก 9 ตัวอย่างขึ้นเนื้อ และ 1ตัวอย่าง

ของpooled sample



รูปที่ 17 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนใน solid, acinar, lepidic, micropapillary

Protein Name	Subtype Samples	Shapiro	t-test/Mann whitney			
			SvsALN	SvsA	SvsL	A vs L
Epididymi	V9HWG3	0.99622	0.01058	0.04659	0.02271	0.24987
cDNA FLJ7	A8K4Z4	0.98941	0.00314	0.0196	0.00314	0.57361
Elongatio	P13639	0.98816	0.00335	0.01953	0.0003	0.01434
T-complex	P50990	0.93561	0.00837	0.04666	0.0095	0.39803
Heteroger	A0A024RA	0.88612	0.00794	0.03881	0.01438	0.48249
Leucine-ri	Q96AG4	0.86457	0.01627	0.02732	0.04015	0.95823
40S ribosc	MOR0R2	0.85907	0.00226	0.00417	0.01698	0.96937
40S ribosc	P62701	0.82863	0.01191	0.04074	0.01409	0.42427
Isoform 2	P23396-2	0.82594	0.00338	0.02493	0.00222	0.38331
Alpha-2 gl	D1MGQ2	0.82376	0.02276	0.03091	0.0369	0.74196
Myosin he	B1PS43	0.81062	0.00079	0.01047	0.00183	0.33598
Chromobc	Q13185	0.80282	0.00011	0.00033	0.0046	0.69655
60S ribosc	P62906	0.80099	0.00613	0.00903	0.04417	0.91536
40S ribosc	P62277	0.72096	0.00493	0.00308	0.04852	0.71132
Histone H	P16401	0.72043	0.00378	0.02112	0.00374	0.3156
cDNA, FLJ5	B2R9K8	0.67522	3.5E-05	0.00047	0.00077	0.31197
Proteasom	Q59EG8	0.63981	0.00109	0.00773	0.00337	0.66618
40S ribosc	A0A024R2	0.63646	0.00422	0.02118	0.00108	0.97273
cDNA FLJ6	B4DLV7	0.57897	0.00365	0.00059	0.03537	0.59269
Ribosoma	Q8WVX7	0.57325	0.00094	0.00463	0.00318	0.84126
40S ribosc	P62263	0.51553	0.00724	0.01327	0.02934	0.83092
cDNA FLJ7	A8K088	0.4866	0.00106	0.00334	0.0034	0.68015
Far upstre	E9PEB5	0.47525	0.001	0.00139	0.01133	0.27831
Nucleoph	P06748	0.46963	0.00702	0.01748	0.03055	0.42706
GTP-bindi	J3KQE5	0.44603	0.0032	0.03585	0.00029	0.2351
Protein RF	A0A0A6Y	0.44062	0.00133	0.00256	0.0071	0.70356
Isoform A	Q07955-2	0.39611	0.00107	0.00024	0.0038	0.07888
Proteasom	P28070	0.37003	0.00434	0.01235	0.03968	0.66875
Peroxired	P30044	0.36598	0.00802	0.02075	0.024	0.28908
40S ribosc	P15880	0.26098	0.00705	0.00969	0.00823	0.35127
40S ribosc	P25398	0.25938	0.00209	0.00496	0.01395	0.95743
Napsin-A	O96009	0.24873	0.00104	0.00216	0.00744	0.43409
Isoform 2	P19971-2	0.20991	0.00489	0.02947	0.00644	0.06167
Epididymi	D9IAI1	0.15924	0.01003	0.04656	0.00555	0.40545
Translin C	Q15631	0.15907	0.00501	0.01561	0.03742	0.82748
Tryptase	A0A087X1	0.15866	0.00312	0.00831	0.00354	0.0453
Thioredox	H9ZYJ2	0.12912	0.00729	0.0358	0.02619	0.47472
40S ribosc	P62280	0.12592	0.01727	0.02021	0.04301	0.41093
Isoform 4	Q13228-4	0.12415	0.00581	0.03231	0.00108	0.08616
Nucleolin	P19338	0.11587	0.00471	0.03479	0.01709	0.35475
Annexin (Q6LES2	0.09588	0.00188	0.00171	0.00771	0.17006
PDZ and L	O00151	0.06638	0.00017	0.00363	0.00401	0.13709
Eukaryotic	A0A024R3	0.05868	0.00382	0.01599	0.04415	0.99592
40S ribosc	Q6IPX4	0.048	0.01815	0.04148	0.00466	0.04175
Heat shoc	P08238	0.04183	0.00201	0.0097	0.00816	0.24275
Elongatio	E9PRY8	0.02289	0.00201	0.01347	0.00117	0.37099
Isoform 2	P26641-2	0.01258	0.00262	0.02446	0.00466	0.51097
Glyceralde	P04406	0.01091	0.00428	0.02446	0.00816	0.2298
Annexin A	P12429	7.00E-05	0.00336	0.032	0.00233	0.03634

ตารางแถวที่ 1 คือ ซื่อโปรตีน, ตารางแถวที่ 2 คือ รหัสโปรตีน

ตารางแถวที่ 3-6 คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนใน solid, acinar, lepidic, micropapillary predominant adenocarcinoma ตามลำดับ

ตารางแถวที่ 7 (กรอบสีแดง) คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนใน solid predominant adenocarcinoma เมื่อเทียบกับ non-solid predominant adenocarcinoma



รายการอ้างอิง





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	นางสาวเบญญาพัชร เอี่ยมธนะสินชัย	
วันเดือนปีเกิด	18 เมษายน พ.ศ. 2524 จังหวัดสุรินทร์	
	ประวัติการศึกษาและการทำงาน	
	พ.ศ. 2548	แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล
	พ.ศ. 2548-2549	แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลสุรินทร์
	พ.ศ. 2550-2551	แพทย์ใช้ทุนปีที่ 2-3 โรงพยาบาลสนม จังหวัดสุรินทร์
ราชพยาบาล	พ.ศ. 2551-2554	แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริ
สุรินทร์	พ.ศ. 2554-2557	อายุรแพทย์ โรงพยาบาลสังขะ จังหวัด
มะเร็งวิทยา	พ.ศ. 2557-ปัจจุบัน	แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาวิชาอายุรศาสตร์
มหาวิทยาลัย		ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
		ปริญญาและประกาศนียบัตร
	พ.ศ. 2548	แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล
การแพทย์คลินิก)	พ.ศ. 2554	ประกาศนียบัตรบัณฑิตชั้นสูง(วิทยาศาสตร์
วิชาชีพเวชกรรม	พ.ศ. 2554	วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบ
		สาขาอายุรศาสตร์
		สมาชิกสมาคมวิชาชีพ
		สมาชิกแพทยสภา

