

การศึกษาอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน Isocitrate dehydrogenase  
ชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2  
ในผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับในประเทศไทย



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 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE STUDY OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE 1 AND 2 MUTATIONS IN THAI PATIENTS  
WITH INTRAHEPATIC CHOLANGIOCARCINOMA AND EXTRAHEPATIC  
CHOLANGIOCARCINOMA

Mr. Bhuritatt Sutthiprapa



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 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน Isocitrate dehydrogenase ชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับในประเทศไทย

โดย

นายภูริทัตต์ สุทธิประภา

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ นายแพทย์สีบพงศ์ ธนสารวิมล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ นายแพทย์อนพัช สรรพาวัตร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมบัติ ตรีประเสริฐสุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ นายแพทย์สีบพงศ์ ธนสารวิมล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ นายแพทย์อนพัช สรรพาวัตร)

.....กรรมการ

(อาจารย์ แพทย์หญิงพัชญา บุญชยาอนันต์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ พันโท นายแพทย์ไฉยรัฐ ประสงค์สุข)

ภูริทัตต์ สุทธิประภา : การศึกษาอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน Isocitrate dehydrogenase ชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับในประเทศไทย (THE STUDY OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE 1 AND 2 MUTATIONS IN THAI PATIENTS WITH INTRAHEPATIC CHOLANGIOCARCINOMA AND EXTRAHEPATIC CHOLANGIOCARCINOMA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. นพ.สืบพงศ์ ธนสารวิมล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. นพ.อนพัช สรรพาวัต, 66 หน้า.

ที่มา โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคมะเร็งที่พบมากในประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับโอพิสธอร์คิสทริเวอริณี การกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* เป็นสาเหตุให้เกิดการสร้างดีเอ็นเอผิดปกตินำไปสู่การเกิดมะเร็ง การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นกับ *IDH1* พบได้บ่อยในมะเร็งสมองชนิด Glioma มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด AML การศึกษาก่อนหน้ารายงานการพบการกลายพันธุ์ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับเป็นจำนวนร้อยละ 20 และพบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับโอพิสธอร์คิสทริเวอริณีร้อยละ 2-3

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาถึงอัตราการกลายพันธุ์ของยีน *IDH* และความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีภูมิสำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย

วิธีการศึกษา ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างปี พ.ศ.2552-2557 มาเก็บข้อมูลลักษณะพื้นฐานโดยทั่วไปจำแนกชนิดของมะเร็งท่อน้ำดีออกเป็นมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับด้วยภาพทางรังสีวิทยา แล้วนำชิ้นเนื้อพาราฟินมาสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง จากนั้นไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Pyrosequencing (Q96 ID) โดย *IDH1* เลือกที่ตำแหน่ง R132 และ *IDH2* เลือกที่ตำแหน่ง R172

ผลการศึกษา ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 50 ราย พบการกลายพันธุ์ *IDH1/2* จากตัวอย่างทั้งสิ้น 18 ราย คิดเป็นร้อยละ 36 โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* เพียง 1 ราย และการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* จำนวน 17 ราย โดยมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง R172G จำนวน 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 88 เมื่อแยกตามตำแหน่งการเกิดมะเร็ง มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับมีการกลายพันธุ์ 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 40.7 และมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับมีการกลายพันธุ์ 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 30.4  $p=0.323$  การกลายพันธุ์จากกลุ่มตัวอย่างที่มีภูมิสำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีจำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 52.9 และภูมิสำเนาอื่นของประเทศไทยจำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 28.1 ของประชากรอื่นที่มีภูมิสำเนาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ  $p=0.054$  โดยกลุ่มตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตโดยรวมมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p=0.032$

สรุปผลการศึกษา อัตราการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* พบได้สูงในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับโดยจากการศึกษาพบว่าตำแหน่ง R172G เป็นตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์มากที่สุดอย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่มีความแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้าควรได้รับการยืนยันผลการศึกษาต่อไป

|            |             |                            |       |
|------------|-------------|----------------------------|-------|
| ภาควิชา    | อายุรศาสตร์ | ลายมือชื่อนิสิต            | ..... |
| สาขาวิชา   | อายุรศาสตร์ | ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก | ..... |
| ปีการศึกษา | 2559        | ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม | ..... |

# # 5874059430 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: INTRAHEPATIC CHOLANGIOCARCINOMA, EXTRAHEPATIC

BHURITATT SUTTHIPRAPA: THE STUDY OF ISOCITRATE DEHYDROGENASE 1 AND 2 MUTATIONS IN THAI PATIENTS WITH INTRAHEPATIC CHOLANGIOCARCINOMA AND EXTRAHEPATIC CHOLANGIOCARCINOMA. ADVISOR: SUEBPONG TANASANVIMON, M.D., CO-ADVISOR: ANAPAT SANPAVAT, M.D., 66 pp.

Background: Mutation of Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 gene is common in glioma, AML and chondrosarcoma. Previous studies showed 20% prevalence in intrahepatic cholangiocarcinoma (CCA) but 2-3% in *Opisthorchis viverrini* associated CCA. We conducted this study to explore *IDH1/2* mutations in Thai patients with CCA.

Patients and Methods: We collected 50 surgical samples from tumor diagnosed CCA at King Chulalongkorn Memorial Hospital between 2008-2013. were enrolled. After DNA extraction by QIAamp DNA FFPE Tissue kit. The analysis of *IDH1* mutation at hotspot R132 and *IDH2* mutation at hotspot R172 were performed by pyrosequencing (Q961D). We analysed the association between the outcome of mutation in *IDH1/2* and clinicopathology by Independent T-test, Chi-square test, Fisher's exact test and Kaplan Meier method.

Results: *IDH1/2* mutations were detected in 18 (36%) samples. *IDH1* was found in only one samples. Among 17 *IDH2* mutation detected samples, *IDH* mutation R172G was found in 15 (88%) samples. There were 11 (40.7%) and 7 (30.4%) *IDH1/2* mutations in intrahepatic and extrahepatic CCA, respectively,  $p=0.323$ . There were 9 (52.9%) and 9 (28.1%) *IDH1/2* mutations in patients from Northeast and other regions, respectively,  $p=0.054$ . Patients with *IDH2* mutation had significantly longer overall survival,  $p=0.032$ .

Conclusions: *IDH2* mutation was high prevalent in Thai patients with CCA including both intrahepatic and extrahepatic CCA. R172G was particularly predominant in our analysis. These findings were still needed verification.

Department: Medicine

Field of Study: Medicine

Academic Year: 2016

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สามารถลุล่วงสำเร็จตามความมุ่งหมาย สาขาวิชามะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาจารย์ นายแพทย์ สืบพงศ์ ธารสารวิมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาจารย์ นายแพทย์ อนพัช สรรพาวัตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมและให้ความอนุเคราะห์ใช้ชิ้นเนื้อ

รองศาสตราจารย์ ดร.ทพ.นครินทร์ กิตกัจจกร ให้คำปรึกษาเลือกตำแหน่งชิ้นเนื้อมะเร็ง

เจ้าหน้าที่ตัดแบ่งชิ้นเนื้อจาก paraffin blocks ผู้ช่วยนักวิจัย หน่วยมะเร็งวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวศิริพร ขุนศรี นางสาวประภัสสร รัตนะชโยโต นางสาวฉัษมา พรหมมา ช่วยสกัดชิ้นเนื้อและทำการตรวจ PCR และ Pyrosequencing ให้คำปรึกษาทางด้านสถิติและการบันทึกวิทยานิพนธ์ออนไลน์ ให้คำปรึกษาด้านภาษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนีวรรณ ตั้งภักดี ดร.หทัยนันท์ ตาลเจริญ ดร.สุภาพร สรสิทธิ์รัตน์ นางสาวอารี อิ่มสมบัติ นิสิตปริญญาเอกสาขาวิชาวิทยาการวิจัย คณะครุศาสตร์ และนางสาวนิชากร อุปพงศ์

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่สนับสนุนการเรียนมาโดยตลอด

## สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....  | จ    |
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ฉ    |
| สารบัญ.....  | ช    |
| สารบัญตาราง.....   | 1    |
| สารบัญรูปภาพ.....  | 2    |
| สารบัญแผนภูมิ.....   | 3    |
| บทที่ 1 บทนำ.....  | 1    |
| 1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale).....   | 1    |
| 1.2 คำถามของการวิจัย (Research question).....  | 3    |
| 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....  | 3    |
| 1.4 สมมติฐาน (Hypothesis).....   | 3    |
| 1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework).....   | 4    |
| 1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption).....   | 4    |
| 1.7 คำสำคัญ (Key word).....  | 4    |
| 1.8 การให้นิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definition).....                                       | 4    |
| 1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย (limitation).....   | 5    |
| 1.10 อุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to solve the problems)..... | 6    |
| 1.11 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical considerations).....  | 6    |
| 1.12 ผลประโยชน์ ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected benefits and application).....                            | 7    |
| บทที่ 2 วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....  | 8    |
| 2.1 ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดี.....  | 8    |

|  |    |
|--|----|
| 2.2 พยาธิกำเนิดของการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี .....   | 8  |
| 2.3 ชนิดของมะเร็งท่อน้ำดี .....  | 9  |
| 2.4 การวินิจฉัย .....  | 9  |
| 2.5 ลักษณะทางชีวภาพของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ<br>(Biology of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinoma) <sup>(27)</sup> ..... | 14 |
| 2.6 ความสำคัญของเอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase-1 (NADP+) ในกระบวนการการ<br>ก่อมะเร็ง <sup>(30)</sup> .....   | 17 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....  | 23 |
| 3.1 รูปแบบวิธีการวิจัย.....  | 23 |
| 3.2 หลักเกณฑ์การคัดเลือกประชากรและตัวอย่าง (Inclusion criteria).....   | 23 |
| 3.3 กลุ่มตัวอย่างงานวิจัย.....   | 24 |
| 3.4 เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion criteria) .....   | 25 |
| 3.5 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....  | 25 |
| 3.6 ขั้นตอนการวิจัย.....   | 26 |
| 3.7 การเก็บข้อมูลการวิจัย (Data collection).....   | 39 |
| 3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลการวิจัย (Data analysis).....  | 39 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย.....  | 41 |
| 4.1 ลักษณะพื้นฐานประชากรที่ศึกษา (Baseline characteristics).....   | 41 |
| 4.2 การกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2.....  | 44 |
| 4.3 ลักษณะพยาธิสภาพทางคลินิกของผู้ป่วยเมื่อจำแนกตามการกลายพันธุ์ของยีน <i>IDH1</i> และ<br><i>IDH2</i> .....  | 44 |
| 4.3 ลักษณะพยาธิสภาพทางคลินิกของผู้ป่วยเมื่อจำแนกตามการกลายพันธุ์ของยีน <i>IDH1</i> และ<br><i>IDH2</i> .....  | 46 |
| 4.4 การกลายพันธุ์ของยีน <i>IDH1/2</i> กับการพยากรณ์โรค .....   | 47 |



|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| บทที่ 5 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ..... | 52 |
| ข้อจำกัดของการศึกษา.....            | 54 |
| ข้อเสนอแนะในการศึกษา .....          | 54 |
| รายการอ้างอิง.....                  | 55 |
| ภาคผนวก .....                       | 59 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....    | 66 |



## สารบัญตาราง

|  |    |
|--|----|
| ตารางที่ 1 การวินิจฉัยแยกชนิดมะเร็งรังท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งรังท่อน้ำดีภายนอกตับ .....        | 12 |
| ตารางที่ 2 แสดงการจำแนกชนิดของมะเร็งรังท่อน้ำดี .....  | 12 |
| ตารางที่ 3 ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งรังท่อน้ำดี .....                                    | 13 |
| ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่.....                              | 36 |
| ตารางที่ 5 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่.....                                  | 37 |
| ตารางที่ 6 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบสที่ใช้ในการทำ Pyrosequencing .....              | 38 |
| ตารางที่ 7 แสดงลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยมะเร็งรังท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งรังท่อน้ำดีภายนอกตับ..   | 42 |
| ตารางที่ 8 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน IDH1 และ IDH2 ในขั้นตอนการทำ<br>Pyrosequencing.....    | 44 |
| ตารางที่ 9 ลักษณะพยาธิสภาพคลินิกของผู้ป่วยเมื่อจำแนกตามการกลายพันธุ์ของยีน IDH1 และ<br>IDH2..... | 45 |
| ตารางที่ 10 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลตัวแปรที่ส่งผลต่อการรอดชีพโดยรวม .....                         | 47 |
| ตารางที่ 11 แสดงอัตราการกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2 เปรียบเทียบในการศึกษา.....                       | 52 |

## สารบัญรูปภาพ

|   |    |
|---|----|
| รูปภาพที่ 1 แสดงกระบวนการเปลี่ยนแปลง เอนไซม์ IDH1/2 ในกระบวนการการก่อมะเร็ง ..... | 18 |
| รูปภาพที่ 2 แสดงสไลด์ย้อมสีเนื้อเยื่อที่ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ .....             | 28 |
| รูปภาพที่ 3 ขั้นตอนการเลือกบริเวณที่ต้องการศึกษา .....                            | 28 |
| รูปภาพที่ 4 แสดงสไลด์ที่มีการวางเลือกบริเวณที่สนใจ .....                          | 29 |
| รูปภาพที่ 5 แสดงสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อรอการไปสกัดดีเอ็นเอ .....                     | 29 |
| รูปภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ .....                                      | 31 |
| รูปภาพที่ 7 แสดงสารสกัดดีเอ็นเอภายหลังการdeparaffin และการย่อยชิ้นเนื้อ .....     | 31 |
| รูปภาพที่ 8 แสดงสารสกัดดีเอ็นเอ .....   | 32 |
| รูปภาพที่ 9 แสดงสารสกัดดีเอ็นเอ .....   | 32 |
| รูปภาพที่ 10 แสดงขั้นตอนการเติมbuffer ในกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ .....               | 33 |
| รูปภาพที่ 11 แสดงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยการปั่นเหวี่ยงสกัด .....                | 33 |
| รูปภาพที่ 12 แสดงการเตรียมการวัดค่าการดูดกลืนแสง .....                            | 34 |
| รูปภาพที่ 13 แสดงตัวอย่างการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง nanodrop .....          | 35 |
| รูปภาพที่ 14 ระยะเวลาการรอดชีพโดยรวมในการกลายพันธุ์ของยีน IDH2 .....              | 48 |
| รูปภาพที่ 15 ระยะเวลาการรอดชีพโดยรวมในการกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2 .....            | 49 |
| รูปภาพที่ 16 แสดงอัตราส่วนร้อยละตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีน IDH2 .....          | 49 |
| รูปภาพที่ 17 A.ภาพแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ IDH1 .....                          | 50 |
| รูปภาพที่ 18 B.ภาพแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ IDH1 .....                          | 50 |
| รูปภาพที่ 19 A.ภาพแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ IDH2 .....                          | 50 |
| รูปภาพที่ 20 B.ภาพแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ IDH2 .....                          | 51 |

## สารบัญแผนภูมิ

|   |   |
|---|---|
| แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดในการวิจัย ..... | 4 |
|---|---|



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

โรคมะเร็งของท่อน้ำดีคือมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังท่อน้ำดี (bile duct epithelium)<sup>(1)</sup> ซึ่งสามารถแบ่งออกตามตำแหน่งทางกายวิภาคได้เป็นได้แก่ ท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic bile duct or Peripheral type cholangiocarcinoma) และท่อน้ำดีภายนอกตับ (extrahepatic bile duct) แต่ไม่รวมถึงเยื่อบุผนังท่อน้ำดีและ Papilla of Vater<sup>(2)</sup> นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งมะเร็งตามตำแหน่งของระบบท่อน้ำดีเป็นมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดบริเวณท่อน้ำดีขนาดเล็กภายในตับ (intrahepatic or peripheral cholangiocarcinoma) มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดบริเวณท่อน้ำดีขนาดใหญ่ที่ขั้วตับ (proximal or hilar cholangiocarcinoma) และมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดบริเวณท่อน้ำดีรวมส่วนล่าง (middle and distal cholangiocarcinoma) ตามลำดับ<sup>(3)</sup> โดยตำแหน่งบริเวณขั้วตับ (hilar) พบได้ครึ่งหนึ่งของมะเร็งท่อน้ำดีทั้งหมด ส่วนบริเวณท่อน้ำดีรวมส่วนล่าง (distal extrahepatic) พบได้ประมาณร้อยละ 40 ส่วนมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (intrahepatic) พบได้ประมาณร้อยละ 10<sup>(4)</sup> สำหรับในประเทศไทยพบว่าเป็นชนิดท่อน้ำดีภายในตับ (intrahepatic duct cholangiocarcinoma) สูงถึงร้อยละ 40-60<sup>(5)</sup>

โรคมะเร็งท่อน้ำดีนับว่าเป็นปัญหาทางสุขภาพของประชากรแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงเอเชียตะวันออกและมีแนวโน้มสูงขึ้นในประเทศฝั่งตะวันออก<sup>(6)</sup> ในประเทศไทยพบมะเร็งท่อน้ำดีมากเป็นลำดับ 5 ของการวินิจฉัยโรคมะเร็งรายใหม่และมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงมากขึ้น<sup>(7)</sup> เมื่อพิจารณาอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นคน ภูมิลำเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อายุ 35-64 ปี โดยอุบัติการณ์เกิดในผู้ชาย 134.5 รายต่อประชากรหนึ่งแสนราย โดยมากกว่าผู้หญิงที่มีอุบัติการณ์เกิด 43 รายต่อประชากรแสนราย<sup>(2)</sup> คิดเป็นร้อยละ 71 ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับที่จังหวัดขอนแก่น<sup>(8)</sup> ประเทศทางฝั่งตะวันตก มีอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้น้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามมีข้อมูลในสหรัฐอเมริกา<sup>(9)</sup> รายงานอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีจากร้อยละ 0.13 ในปี พ.ศ. 2516 สูงเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.69 ต่อแสนประชากรในช่วง 24 ปี ให้หลังหรือร้อยละ 19 จากมะเร็งท่อน้ำดีและตับ<sup>(8)</sup>

อาการและอาการแสดงของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยมากขึ้นอยู่กับตำแหน่งพยาธิสภาพว่าเกิดที่ตำแหน่ง ซึ่งอาจจะไม่มีอาการแสดงของโรค (Asymptomatic) ไปจนถึงอาจมีอาการตาเหลืองตัวเหลืองมาก (Obstructive jaundice) เบื่ออาหาร (Anorexia) น้ำหนักลด (weight loss) ในกลุ่มมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ หรือ ปวดท้อง (Abdominal pain) ปวดไหล่ปวดหลัง (shoulder/back pain)

คลำได้ก้อนบริเวณชายโครงขวาหรือลิ้นปี่ (palpable mass at RUQ/EPG) ในกรณีสงสัยว่าเป็นมะเร็งน้ำดีภายในตับ<sup>(1,3)</sup>

การวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีต้องอาศัยการซักประวัติประกอบการตรวจร่างกายและเลือกใช้เครื่องมือทางรังสีวิทยาให้เหมาะสม (Imaging technique) การส่องกล้องตรวจภายในอวัยวะเพื่อการวินิจฉัยกรณีมีข้อบ่งชี้ (Endoscopic technique) และการตรวจทางพยาธิวิทยาของเซลล์ (Cytopathological examination)

การวินิจฉัยโดยใช้ผลทางห้องปฏิบัติการนั้นยังไม่มีเฉพาะต่อการวินิจฉัยโรค สามารถพบค่า serum total bilirubin, direct bilirubin เพิ่มขึ้นได้โดยค่า serum total bilirubin มักสูงเกิน 10 mg % ค่าการทำงานของเอนไซม์ตับ serum alkaline phosphatase (ALP) สามารถสูงขึ้นได้ตั้งแต่ 2-10 เท่า โดยค่าเอนไซม์ตับ AST หรือ ALT อาจจะปกติหรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยกรณีมีการอุดตันท่อน้ำดีเรื้อรัง<sup>(10, 11)</sup> การใช้ serum Tumor marker ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี มีการศึกษาใน serum CEA พบว่าค่า serum CEA ที่สูงขึ้น (CEA >5.2 ng/ml)<sup>(12, 13)</sup>

อย่างไรก็ตามการพยากรณ์โรคขณะแรกวินิจฉัยมักไม่ตึงและอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยยังต่ำในช่วง 1 ทศวรรษที่ผ่านมา มีการศึกษาด้านอณูชีววิทยา (Molecular biology) และพันธุศาสตร์ของมะเร็งวิทยา โดยการศึกษาในระดับ Genetic และ Epigenetics ที่มีผลต่อความไม่เสถียรของสารพันธุกรรม ซึ่งทำให้มีความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับเนื้องอกมะเร็งชนิดต่างๆรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดีความผิดปกติในระดับ Epigenetics กล่าวคือ การดัดแปลงจีโนมโดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของสาย DNA ที่ควบคุมการถอดรหัสของเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น การเมทิลเลชัน (Methylation) และการอะเซทิลเลชัน (Acetylation) เซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนของยีน โดยเฉพาะยีนมะเร็งจะทำให้มีการแสดงออกของยีนมากกว่าปกติ ก่อเกิดกระบวนการเมทิลเลชัน (Methylation) ของยีนต้านมะเร็งทำให้ยีนต้านมะเร็งมีการแสดงออกลดลง โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ การควบคุมการตายของเซลล์<sup>(14, 15)</sup>

มีการศึกษาที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของยีน (Epigenetics) ที่พบในมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ทำให้ความผิดปกติในวัฏจักรเครบส์ Krebs cycle เกิดเอนไซม์ชนิดใหม่ D2-hydroxyglutarate หรือ 2-HG. เอนไซม์ 2-HG จะไปยับยั้งกลไกการทำงานของเอนไซม์ตามปกติ ทำให้เกิดการสร้าง DNA hypermethylation และกระตุ้น VEGFR<sup>(16)</sup> ควบคุมกระบวนการแสดงออกของยีนตามปกติ นำไปสู่การเพิ่มจำนวนมะเร็งและการแพร่กระจายของมะเร็ง ผ่านทางหลายช่องทาง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นหนึ่งในทฤษฎีที่เชื่อว่าก่อให้เกิดมะเร็ง<sup>(17)</sup>

เนื่องจากการศึกษาที่มีก่อนหน้าเป็นการศึกษาในประเทศแถบตะวันตก ประเทศในแถบตะวันออกและตะวันออกเฉียงใต้ยังมีน้อย และยังไม่มีการศึกษาใดที่ทำเฉพาะในคนไทยจึงเป็นความสนใจที่จะทำการศึกษานี้ขึ้น

## 1.2 คำถามของการวิจัย (Research question)

### คำถามหลัก (Primary research question)

อัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2 ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับของคนไทย เป็นเท่าใด

### คำถามรอง (Secondary research question)

ลักษณะพยาธิวิทยาทางคลินิกรวมทั้งการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งทางเดินน้ำดีทั้งชนิดภายในและภายนอกตับ ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2 เป็นอย่างไร

## 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน IDH 1/2 ระหว่างมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับในผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างคนไทยที่เป็นคนไข้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

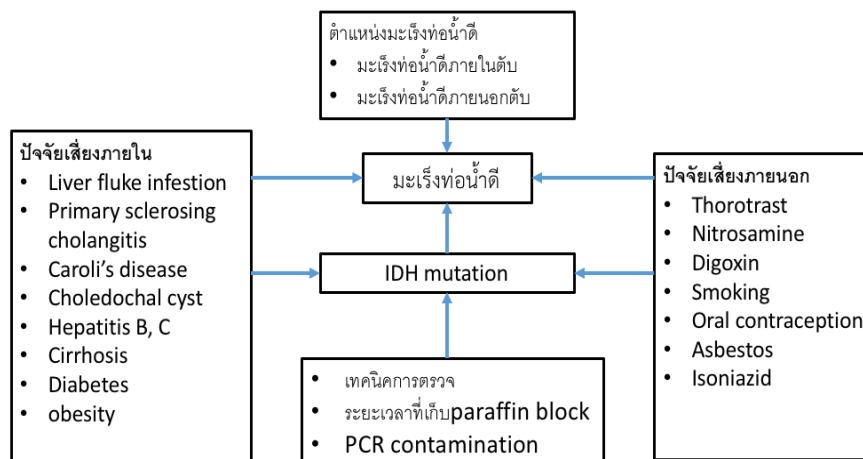
2. เพื่อศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิกของมะเร็งทางน้ำดีที่มีการกลายพันธุ์ของยีน IDH 1/2 ในผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างคนไทยที่เป็นคนไข้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

## 1.4 สมมติฐาน (Hypothesis)

$H_0$  : อัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2 ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับไม่แตกต่างกันในคนไทย

$H_1$  : อัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2 ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับมีความแตกต่างกันในคนไทย

## 1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย

## 1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma) ที่เป็นกลุ่มตัวอย่าง ประกอบด้วย ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma) และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับ (Extrahepatic cholangiocarcinoma) โดยต้องได้รับการตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดของ Intrahepatic หรือ Extrahepatic cholangiocarcinoma โดยยืนยันจากการวินิจฉัยจากภาพถ่ายทางรังสีวิทยา (radiographic information) จากรังสีแพทย์ และการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีทางพยาธิวิทยา (pathologic information) จากพยาธิแพทย์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

## 1.7 คำสำคัญ (Key word)

Biliary tract cancer, Intrahepatic Cholangiocarcinoma, Extrahepatic Cholangiocarcinoma, IDH1 IDH2, 2-Hydroxyglutarate (2HG)  
 มะเร็งท่อน้ำดี มะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ มะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับ ยีน IDH1 ยีน IDH2

## 1.8 การให้นิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definition)

1. มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ หมายถึง มะเร็งที่เกิดจากความผิดปกติของเยื่อบุทางเดินน้ำดี ที่มีพยาธิกำเนิดมาจากบริเวณท่อน้ำดี ลำดับที่ 2 (second order biliary ducts) ขั้วตับ (hilar) จนถึงท่อรวมทางเดินน้ำดีส่วนล่าง common bile duct และ distal bile duct โดยไม่รวมเยื่อบุถุงน้ำดี และ ampulla of Vater หมายรวมถึง

2. มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ หมายถึง มะเร็งที่เกิดจากความผิดปกติของเยื่อบุทางเดินน้ำดี ที่มี



พยาธิกำเนิดได้ต่อบริเวณท่อน้ำดี ลำดับที่ 2 (second order biliary ducts) เข้ามาภายในเนื้อตับ (peripheral)

3. ยีน Isocitrate dehydrogenase 1 และ ยีน Isocitrate dehydrogenase 2 หมายถึง หน่วยพันธุกรรมเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซม Chromosome segment หรือส่วนหนึ่งของสายดีเอ็นเอ DNA segment โดยยีนทำหน้าที่กำหนดลักษณะทางพันธุกรรมต่างๆของสิ่งมีชีวิต โดยยีน Isocitrate dehydrogenase 1 และยีน Isocitrate dehydrogenase 2 เมื่อถูกถอดรหัส transcription เป็น เอ็มอาร์เอ็นเอ mRNA จะแปลรหัส translation สร้างเอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) และเอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase 2 (*IDH2*) ซึ่งมีหน้าที่ ในขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน isocitrate เป็น alpha -ketoglutarate ในวัฏจักรเครบส์ Krebs Cycle โดยการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ CO<sub>2</sub> ออกจากหมู่ไฮดรอกซิล(hydroxyl group) จะใช้ Isocitrate dehydrogenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและขั้นตอนนี้มีการให้อิเล็กตรอนกับ NAD<sup>+</sup> กลายเป็น NADH

4. การกลายพันธุ์ของยีน Isocitrate dehydrogenase 1 และ ยีน Isocitrate dehydrogenase 2 หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของยีนทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ *IDH1* และ *IDH2* ที่ผิดปกติตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน alpha -ketoglutarate เป็น D2-hydroxyglutarate (2HG) กระตุ้นกระบวนการเกิดเนื้องอกมะเร็ง (Tumorigenesis) และขั้นตอนนี้มีการให้อิเล็กตรอนกับ NAD<sup>+</sup> กลายเป็น NADH

### 1.9 ข้อจำกัดในการวิจัย (limitation)

1. การตรวจดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการเก็บในพาราฟิน จะมีคุณภาพลดลงจากการเก็บไว้นานจนดีเอ็นเอเสื่อมสภาพ

2. ชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดหรือ การbiopsy ภายหลังจากการสกัดดีเอ็นเอ มีปริมาณน้อยไม่เพียงพอในการตรวจ PCRทำให้ไม่สามารถตรวจ Pyrosequencingได้

3. ข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลทางคลินิกเก็บข้อมูลจากเวชระเบียนอาจทำได้ไม่ครบถ้วน เนื่องจากเป็นการศึกษาแบบย้อนหลังเช่น ผู้เสียชีวิตบางรายเสียชีวิตขาดการติดต่อกับทางโรงพยาบาลเกิน 5 ปีเวชระเบียนจะถูกทำลายจะมีประวัติการรักษาบางส่วนที่เปิดทบทวนจากประวัติการรับเป็นผู้ป่วยในผ่านทางระบบคอมพิวเตอร์

4. คุณภาพของภาพถ่ายทางรังสีวิทยาเช่น CT scan หรือ MRI ณ ขณะวินิจฉัยมาจากหลายแห่ง ทำให้คุณภาพของภาพที่ได้อาจจะแตกต่างกันเป็นเหตุให้เกิดความสับสนในการวินิจฉัย

5. การบันทึกข้อมูลของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและชนิดภายนอกตับที่วินิจฉัยและมีประวัติการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์บางส่วนมีความผิดพลาด ตามรหัสการแยกโรค ICD10

ซึ่งการบันทึกการวินิจฉัยบางครั้งอาจจะอ้างอิงตามข้อมูลที่มี เช่น การวินิจฉัยโรคจากภาพถ่ายทางรังสี โดยไม่มีผลการตรวจชิ้นเนื้อยืนยันหรือมีเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่งหรือวินิจฉัยเป็นโรคมะเร็งชนิดอื่นกรณีที่ไม่สามารถแยกจากมะเร็งที่มีพยาธิกำเนิดบริเวณใกล้เคียงกันได้ขณะบันทึกการวินิจฉัยโรคมะเร็งร่อน้ำดี ดังนั้นเมื่อเรียกค้นข้อมูลเพื่อนำมาทำการวิจัยนี้ แม้ว่าจะมีการวินิจฉัยโรคมะเร็งร่อน้ำดีภายในตับและภายนอกตับหรืออวัยวะอื่นใกล้เคียงแล้ว แต่ตามข้อบ่งชี้การคัดเข้าทำการศึกษาผู้ป่วยจะต้องมีทั้งการตรวจผลชิ้นเนื้อและต้องมีภาพถ่ายทางรังสีประกอบการวินิจฉัย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีข้อจำกัดในจำนวนกลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้

### 1.10 อุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to solve the problems)

กรณีการวินิจฉัยแยกชนิดของมะเร็งร่อน้ำดีจากชนิดภายในตับและภายนอกตับอาจจะไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจนจากการอ่านจากภาพทางรังสี จะมีการปรึกษารังสีแพทย์เป็นรายไป กรณีถ้าไม่สามารถนำชิ้นเนื้อมาทำการตรวจเพิ่มเติมได้เนื่องจากชิ้นเนื้อขนาดเล็กและหรือชิ้นเนื้อที่เก็บไว้เสียคุณภาพภายหลังการสัคดีเอ็นเอจะคัดออกจากการวิจัย ข้อมูลประวัติหากไม่ครบถ้วนเนื่องด้วยความไม่สมบูรณ์ของเวชระเบียนจะทำการโทรสอบถามเช่น ภูมิลาเนา โรคประจำตัว หรือ สอบถามการเสียชีวิต

### 1.11 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical considerations)

ครอบคลุมหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ 3 ข้อ

1. **หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person)** คือ การศึกษาจากเวชระเบียนไม่มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้ป่วย ผู้วิจัยไม่มีการเปิดเผยรายชื่อหรือเลขที่โรงพยาบาลของผู้ป่วย รวมถึงการรักษาความลับของผู้ป่วยเป็นสิ่งสำคัญ ข้อมูลทั้งหมดในการศึกษาไม่สามารถย้อนกลับไประบุตัวผู้ป่วยได้

2. **หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/nonmaleficence)** ผู้ป่วยจะไม่ได้รับประโยชน์ใดในการศึกษา เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการศึกษาชิ้นเนื้อไม่มีความเสี่ยงแก่ผู้ป่วยโดยตรงแต่อาจจะมีความเสี่ยงเพียงเล็กน้อย คือความลับของผู้ป่วยอาจจะถูกเปิดเผย ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับผู้ป่วย

3. **หลักความยุติธรรม (Justice)** คือมีเกณฑ์การคัดเข้าและออกชัดเจน เมื่อพิจารณาถึงความเสี่ยงและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ผู้วิจัยจึงจะขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้ป่วย ทั้งนี้ผู้วิจัยจะขออนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

กลุ่มประชากรในงานวิจัยนี้ เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อจากการผ่าตัด หรือเก็บชิ้นเนื้อ จาก พาราฟิน

บล็อกของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งได้รับอนุญาตจากภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัย และทางงานวิจัยได้ดำเนินการ เพื่อที่จะขอ จริยธรรมในการวิจัย

### 1.12 ผลประโยชน์ ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected benefits and application)

1. สำหรับแพทย์ผู้รักษา แม้ว่าอาการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ในมะเร็งท่อน้ำดี ปัจจุบันไม่มียาเพื่อ รักษาจำเพาะต่อการเกิดโรค อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่มีการอ้างอิงมาก่อนหน้าพบว่า ผู้ป่วยการ กลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ดังกล่าวพบว่ามีอัตราการรอดชีพสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แพทย์ผู้ทำการตรวจรักษาสามารถอธิบายกลไกการเกิดโรคและการดำเนินโรคให้ผู้ป่วยได้ทราบ สามารถวางแผนการรักษาได้ร่วมกัน
2. สำหรับนักวิจัยสามารถนำลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิกไปเป็นฐานข้อมูลต่อยอดสำหรับคัดเลือก ผู้ป่วยที่เหมาะสมในการเข้าการศึกษาสำหรับการรักษาสำหรับยามุ่งเป้า (Targeted therapy) ต่อไปในอนาคต
3. สำหรับผู้ป่วย การศึกษาหากลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีเพื่อการรักษาจำเพาะนั้นในปัจจุบันมี การศึกษามากมาย การกลายพันธุ์ ของยีน *IDH1/2* ก็เป็นอีกแนวทางเพื่อการรักษาที่จำเพาะ โดยเฉพาะในปัจจุบันได้เริ่มมีการวิจัยยาด้าน *IDH* ในมะเร็งท่อน้ำดี

## บทที่ 2

### วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดี

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่มีความหลากหลายทางกลไกการเกิดความผิดปกติของพันธุกรรม (Heterogeneity) ที่ทำให้แสดงออกของลักษณะโรค(Phenotype)ในแบบเดียวกันหรือแตกต่างกันในโรคเดียว<sup>(18)</sup> มะเร็งท่อน้ำดีมีพยาธิกำเนิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดี (Cholangiocyte) ซึ่งรวมถึงท่อน้ำดีภายในและภายนอกตับ แต่ไม่รวมถึงเยื่อบุของถุงน้ำดีและ Papilla of vater แบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามตำแหน่งของเนื้องอกมะเร็งที่เกิดขึ้นได้แก่<sup>(3)</sup>

1. มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic or peripheral cholangiocarcinoma) จะเกิดภายในเนื้อตับใต้ต่อบริเวณท่อน้ำดี ลำดับที่ 2 (second order biliary ducts) เข้ามาภายในเนื้อตับ (peripheral)

2. มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (Extrahepatic cholangiocarcinoma) มีพยาธิกำเนิดมาจากบริเวณท่อน้ำดีลำดับที่ 2 (second order biliary ducts) ขั้วตับ (hilar) จนถึงท่อน้ำดีส่วนกลาง common bile duct และ distal bile duct

มะเร็งท่อน้ำดีปัญหาของประเทศไทยได้แก่การขาดการวินิจฉัยที่รวดเร็วและถูกต้องเที่ยงตรงนำไปสู่ปัญหาที่ผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีมักมาพบแพทย์ด้วยอาการในระยะที่ลุกลามของโรคไปยังอวัยวะอื่นมากแล้ว การขาดรักษาที่มีประสิทธิภาพนำไปสู่การพยากรณ์ไม่ดี แม้ว่าโรคมะเร็งท่อน้ำดีจะเป็นโรคที่พบได้มากที่ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แต่ประเทศในเอเชียก็พบว่าเริ่มมีอุบัติการณ์การเกิดที่เพิ่มขึ้น ในประเทศทางฝั่งตะวันตกเองแม้ว่าอุบัติการณ์การเกิดมีไม่มากแต่ก็มีแนวโน้มสูงมากขึ้นเช่นกัน<sup>(7,8,9)</sup> การที่มะเร็งท่อน้ำดีสามารถเกิดได้ในทุกภูมิภาคทั่วโลกจึงสนับสนุนข้อสันนิษฐานว่ามะเร็งท่อน้ำดีนั้นมีพยาธิกำเนิดที่หลากหลายรวมทั้งลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิกที่แตกต่างกันไปตามแหล่งกำเนิด ดังนั้นการศึกษาอ้างอิงหรือแปลผลการศึกษาที่มาจากต่างประเทศอาจจะมีข้อจำกัดในการเลือกนำมาใช้ในผู้ป่วยในประเทศไทย

#### 2.2 พยาธิกำเนิดของการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี

มะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับการอักเสบเรื้อรังของท่อน้ำดี<sup>(19, 20)</sup> ในสถานะที่มีการอักเสบ Cholangiocyte และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจะมีการหลั่งสาร Proinflammatory cytokine โดยส่วนใหญ่ที่หลั่งออกมาจะอยู่ในกลุ่มของ interleukin-6 , Tumor necrosis factors -alpha และinterferons สารเหล่านี้ไปกระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิด Cholangiocyte กระตุ้นให้มีการสร้าง

inducible form ของ nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งรูปแบบหนึ่งของ Nitric oxide มีผลทำให้เกิดการทำลายที่ดีเอ็นเอโดยตรง นอกจากการทำลายที่ดีเอ็นเอแล้ว iNOS ยังสามารถไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลำดับ DNA base ของเซลล์ต้นกำเนิด cholangiocyte ด้วย นอกจากนี้ iNOS ยังทำให้เกิดกระบวนการ nitrosylation ยับยั้งการซ่อมแซมดีเอ็นเอทำให้มีการเพิ่มมากขึ้นของดีเอ็นเอที่ผิดปกติ (damage DNA base) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดกระบวนการ mutagenesis<sup>(21, 22)</sup>

### 2.3 ชนิดของมะเร็งท่อน้ำดี

**มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ** (Intrahepatic or peripheral type cholangiocarcinoma) เป็นโรคที่มักถูกวินิจฉัยคลาดเคลื่อนว่าเป็นมะเร็งตับ Hepatocellular carcinoma เพราะสามารถตรวจพบตับโตและมีก้อนภายในตับได้ จะเกิดภายในเนื้อตับใต้ต่อบริเวณท่อน้ำดี ลำดับที่ 2 (second order biliary ducts) เข้ามาภายในเนื้อตับ (peripheral) **อาการและอาการแสดง** ผู้ป่วยมักมาด้วยอาการปวดแน่นท้อง ปวดใต้ชายโครงปวดหลังไหล่ มีไข้ เหนื่อยง่ายอ่อนเพลีย น้ำหนักลดคลื่นไส้ โดยอาการตาเหลืองตัวเหลืองพบได้น้อย

**มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ** (Extrahepatic Cholangiocarcinoma) มะเร็งท่อน้ำดีที่อยู่ภายนอกตับส่วนใหญ่จะอยู่ที่ท่อทางเดินน้ำดีที่ใกล้ๆ ตับ (Portal hepatis) ซึ่งมักจะเกิดในท่อน้ำดีตับข้างใดข้างหนึ่งหรือท่อน้ำดีตับร่วม (Right or left hepatic or Common hepatic bile duct) จากลักษณะทางกายวิภาคตามท่อทางเดินน้ำดีจนถึงทางเดินน้ำดีส่วนล่าง บางส่วนที่เป็นบริเวณที่ท่อน้ำดีเส้นเลือดดำและเส้นเลือดแดงที่มาเลี้ยงตับมาอยู่ชิดกันจะเรียกบริเวณนี้ว่าเป็นขั้วตับ (Hilar)<sup>(4)</sup> **อาการและอาการแสดง** ในระยะแรกผู้ป่วยมักอาจจะไม่มีอาการ แต่อาการที่จะนำผู้ป่วยมักมาพบแพทย์เมื่อมีอาการตาเหลืองตัวเหลือง ในระยะลุกลามจากก้อนมะเร็งมีขนาดโตขึ้นไปทำให้เกิดการอุดตันของท่อทางเดินน้ำดี

### 2.4 การวินิจฉัย

**มะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ** (Intrahepatic Cholangiocarcinoma)<sup>(23, 24)</sup> ภาพทางรังสีวิทยาขึ้นอยู่กับขนาดและสัดส่วนของพังผืดภายใน (fibrosis) เนื้อตายเฉพาะส่วน (necrosis) และการสร้างสารเยื่อเมือก (mucin)

**มะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับ** (Extrahepatic cholangiocarcinoma)<sup>(18)</sup> ประกอบด้วย perihilar และ distal CBD

**Perihilar cholangiocarcinoma** มะเร็งต้นกำเนิดมาจาก bile duct ลำดับที่ 2 (second order biliary ducts) ถึงเหนือ common bile duct และสิ้นสุดบริเวณที่ cystic duct origin. โดยมีการแยกจำเพาะ Klatskin's tumor ที่ใช้เรียกเนื้องอกมะเร็งท่อน้ำดีที่พบได้ บริเวณจุดเชื่อมทั้ง

hepatic duct ด้านซ้ายและด้านขวา และ common hepatic duct ส่วนต้นภายในระยะ 2 เซนติเมตร จาก bifurcation ของทางเดินน้ำดีส่วนล่าง (common bile duct)<sup>(25)</sup> Perihilar cholangiocarcinoma มักมีการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลืองบริเวณ Portocaval, Superior pancreaticoduodenal และ Posterior pancreaticoduodenal และแพร่กระจายไปอวัยวะข้างเคียงเช่น เนื้อตับ, Gastrohepatic และ Hepatoduodenal ligaments บางครั้งอาจเป็นสาเหตุของท่อทางเดินน้ำดีอุดตัน (chronic biliary obstruction) ซึ่งนำไปสู่การฝ่อเหี่ยวของเนื้อตับบางกลีบ การที่มี hepatic lobe atrophy ร่วมกับ biliary dilate ทำให้นึกถึงสาเหตุจาก hilar cholangiocarcinoma ได้มาก

**Distal common bile duct** เกิดใน common bile duct จุดกำเนิดจาก cystic duct และ ampulla of Vater โดยไม่มีการแพร่กระจายเข้าไปภายใน เมื่อเกิดในตำแหน่งส่วนปลายต่อ bile duct ที่อยู่ใกล้กับ ตับอ่อนบางครั้งแยกได้จากจาก มะเร็งตับอ่อน Head of pancreas

#### Ultrasound

มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic Cholangiocarcinoma) พบเป็นเนื้องอกที่มีความหนาแน่นของเนื้อเยื่อสูงกว่าเนื้อเยื่อรอบข้างและเปลี่ยนแปลงลักษณะไปตามก้อนเนื้องอก โครงสร้างภายในก้อนเนื้องอกมะเร็งพบได้ทั้งแบบละเอียดรวมเป็นเนื้อเดียวกัน (homogenous) แต่บางครั้งสามารถเห็นไม่เป็นเนื้อเดียวกันขึ้น (heterogenous) ขึ้นกับปริมาณของพังผืดภายใน การสร้างเยื่อเมือก (mucin) และ การจับตัวของแคลเซียม (calcification)

มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (Perihilar cholangiocarcinoma) สามารถแยกสาเหตุของการอุดตันท่อน้ำดีรวมถึงนิ่วในท่อน้ำดีและยังแสดงถึงกายวิภาคของท่อน้ำดีภายในตับส่วนที่การอุดตันส่วนต้น ความไวและความแม่นยำของอัลตราซาวด์ (sensitivity and accuracy) ในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับเท่ากับร้อยละ 89 และ ร้อยละ 80-95

มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Distal common bile duct cholangiocarcinoma) บอกระดับการอุดตันที่ส่วนปลายของ biliary duct และบอกการขยายขนาดของท่อน้ำดีส่วนต้น สามารถบอกการแพร่กระจายบริเวณข้างเคียงเช่นตับอ่อน ความลึกของการของแพร่กระจาย ตำแหน่งต่อมน้ำเหลืองที่แพร่กระจาย

#### CT (Computerized Tomography Scan)

มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma) มะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ สามารถเห็นขอบเขตของก้อนได้ทั้งแบบขอบเรียบชัดหรือแทรกเข้าไปในเนื้อตับ โดยทั้งสองแบบไม่มีพังผืดหุ้มรอบก้อนเหมือนในมะเร็งตับ ลักษณะโดยทั่วไปของเนื้องอกจะมีความใกล้เคียงเมื่อเทียบกับเนื้อตับปกติในภาวะ Unenhanced CT และมักจะ Hypoattenuated ขณะระยะ Arterial และ Portal venous แต่จะ enhancement เฉพาะในระยะ delay กรณีก้อนที่อยู่ส่วนปลายและกำลังอยู่

ช่วงเดบิตเร็วจะสามารถที่จะเห็น enhance rapidly หลัง contrast enhancement และกลับมาเป็น isodense หรือ hypodense ขณะอยู่ venous phase ส่วน fibrous tissue ภายในกลางก้อนเนื้อของมะเร็งจะไม่ enhance ระหว่าง early phase แต่จะมี hyperdense ระหว่าง delay phase ได้ถึง 20 นาทีหลังจากนั้น

พยากรณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีแบบ mass forming intrahepatic ที่มีขนาดเล็กอาจจะคล้ายกับมะเร็งตับได้ถ้าเป็นก้อนที่เลือดมาเลี้ยงมาก การพิจารณา delay phase ช่วยยืนยันในการวินิจฉัยได้

มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (perihilar cholangiocarcinoma) ลักษณะก้อนมะเร็งจะมีลักษณะคล้ายในมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับแต่จะแตกต่างที่ตำแหน่งการเกิด ความแม่นยำ (Accuracy) ของการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับเท่ากับร้อยละ 78.6-92.3 แต่วินิจฉัย regional lymphadenopathy ได้เพียงร้อยละ 54

#### **MRI (Magnetic Resonance Imaging) with MRCP**

มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma) และ มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (extrahepatic cholangiocarcinoma) ใน MRI ลักษณะของมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับจะแตกต่างกันไปในลักษณะการเจริญเติบโตและตำแหน่ง

มักจะเห็นขอบเขตไม่เรียบและแสดง signal intensity ขึ้นกับลักษณะความรุนแรงของพังผืด (fibrosis), เนื้อตายเฉพาะส่วน (necrosis), การมีเลือดออกภายใน (hemorrhage) และการสร้างเยื่อเมือก (mucin) ในเนื้อของมะเร็งนั้นมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับโดยทั่วไปจะแสดงลักษณะ hypointense หรือ isointense ใน T1 weighted (T1W) และจะแสดงลักษณะแบบ hyperintense ใน T2 weighted (T2W) แต่บางครั้งมะเร็งท่อน้ำดีสามารถ isointense กับเนื้อตับปกติได้ทั้งใน T1W T2W

MRI จะแสดงความหนาและการตีบตันของท่อน้ำดีในน้ำเดินน้ำดีที่ท่อน้ำดีส่วนต้นที่มีการขยายขนาดมีความแม่นยำ (Accuracy) ร้อยละ 66 ในการวินิจฉัยการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง มีความไว (sensitivity) ร้อยละ 78 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 91 สำหรับการแพร่กระจายไปเส้นเลือดดำ (portal vein) และ มีความไว (sensitivity) ร้อยละ 58-73 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 93 ในการวินิจฉัยการแพร่กระจายไปเส้นเลือดแดง (hepatic artery)

ตารางที่ 1 การวินิจฉัยแยกชนิดมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ

| Type                 | Intrahepatic   | Extrahepatic  |
|----------------------|--|---|
| Clinical             | Asymptomatic, Abdominal pain, Fatigue and Weight loss  | Jaundice, Fatigue, N/V, Loss of appetite and Weight loss  |
| Imaging              |  |   |
| (i) Origin           | Peripheral to secondary bifurcation of the left and right hepatic duct   | Secondary order of biliary tract to above of common bile duct and cystic duct origin  |
| (ii) Typical finding | Intrahepatic mass, Desmoplastic change, Mucin and Calcification change   | Hilar or Extrahepatic mass, Heterogeneous mass, Bile duct dilatation, Hepatic lobe atrophy with Biliary duct dilate   |
| Ultrasound           | Intrahepatic with hyperechoic mass, Homo or Heterogeneous mass and Calcification   | Mass at hilar or Extrahepatic mass  |
| CT                   | Hypovascular Intrahepatic mass in 3-Phase of CT Subcapsular retraction   | Hypovascular Extrahepatic mass in 3-phase CT, Bile duct dilatation, Regional lymphadenopathy and locally metastasis   |
| MRI/MRCP             | Intrahepatic mass, Irregular shape, Signal intensity depend on fibrosis necrosis and mucin, Hypo to Isointense on T1W and Hyperintense on T2W with liver parenchyma. | Extrahepatic mass, Signal intensity depend on fibrosis necrosis and mucin, Hypo to Isointense on T1W and Hyperintense on T2W with liver parenchyma and biliary duct dilated |
| Pathology            | Gross anatomy report (Location of biopsy)<br>Pathology confirm from CBD origin   | Gross anatomy report (Location of biopsy)<br>Pathology confirm from CBD origin  |

ตารางที่ 2 แสดงการจำแนกชนิดของมะเร็งท่อน้ำดี

| Anatomical location       | Macroscopic growth pattern                                      |
|---------------------------|---|
| Intrahepatic              | Mass forming<br>Periductal infiltrating<br>Intraductal<br>Mixed |
| Extrahepatic              | Mass forming (nodular)  |
| (i) Perihilar (ii) Distal | Periductal infiltrating (sclerosing)<br>Intraductal (papillary) |



ตารางที่ 3 ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี

| Definitively established risk factor                     | Intrahepatic | Extrahepatic |
|--|--------------|--------------|
| Liver Flukes   |              |              |
| (i) <i>Clonorchis Sinensis</i>                           |              |              |
| (ii) <i>Opisthorchis Viverrinii</i>                      |              |              |
| Primary Sclerosing Colangitis PSC                        |              |              |
| Choledochal cyst   |              |              |
| Toxins (Thorotrast, dioxins)                             |              |              |
| Pancreaticobiliary malfunction with bile duct dilatation |              | x            |
| Hepatolithiasis  | x            |              |
| Hepatitis C virus infectin                               | x            |              |

| Definitively established risk factor                     | Intrahepatic | Extrahepatic |
|--|--------------|--------------|
| Liver Flukes   |              |              |
| (i) <i>Clonorchis Sinensis</i>                           |              |              |
| (ii) <i>Opisthorchis Viverrinii</i>                      |              |              |
| Primary Sclerosing Colangitis PSC                        |              |              |
| Choledochal cyst   |              |              |
| Toxins (Thorotrast, dioxins)                             |              |              |
| Pancreaticobiliary malfunction with bile duct dilatation |              | x            |
| Hepatolithiasis  | x            |              |
| Hepatitis C virus infectin                               | x            |              |

X = Risk factors exclusive for intrahepatic CCA or extrahepatic CCA; others factors are common for both CCA types

| Probable established                           | Intrahepatic | Extrahepatic |
|--|--------------|--------------|
| Diabetes, Obesity, Alcohol, Tobacco<br>Smoking |              |              |
| Genetic Polymorphisms                          |              |              |
| Caroli's disease                               |              |              |
| Inflammatory bowel disease                     |              |              |
| Cholangitis and choledocolithiasis             |              |              |
| Surgical biliary enteric drainage              |              |              |
| Cholecystectomy                                |              | x            |
| Cholelithiasis                                 |              | x            |
| Hepatic Schistosomiasis                        | x            |              |
| Liver Cirrhosis                                | x            |              |
| Hepatitis B virus infection                    | x            |              |

X = Risk factors exclusive for intrahepatic CCA or extrahepatic CCA ; others factors are common for both CCA types

## 2.5 ลักษณะทางชีวภาพของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Biology of Intrahepatic and Extrahepatic Cholangiocarcinoma)<sup>(27)</sup>

ข้อมูลในปัจจุบันพบว่า Intrahepatic และ Extrahepatic มีลักษณะทางชีวภาพที่แตกต่างกัน หลายการศึกษาต่างพบว่ามี ความแตกต่างกันในเรื่อง Incidence , Mortality and Risk factors มี การศึกษาที่กล่าวถึง บทบาทของ Stem cell ในการก่อให้เกิดมะเร็ง โดยได้อธิบายถึงลักษณะทางชีวภาพของ Stem cell ที่มีส่วนในกระบวนการก่อมะเร็งเมื่อเซลล์ต้นกำเนิดของตับเปลี่ยนแปลงไปสู่ การพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็ง (Maturation arrest)

การเปลี่ยนแปลงนี้ สามารถทำให้เกิดเนื้องอกมะเร็งได้หลากหลายชนิดทั้ง มะเร็งตับ (Hepatocellular) และมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma) ซึ่งจะแตกต่างกันออกไป เซลล์ต้นกำเนิด (Stem cell) พบอยู่ในบริเวณ canal of Hering , Intrahepatic bile ductule ซึ่งสามารถ

เปลี่ยนแปลงไปเป็น Hepatocyte, Cholangiocyte หรือ เปลี่ยนเป็น Hepatocellular carcinoma (HCC) หรือ เกิดร่วมกันทั้งในท่อน้ำดีและตับ (Hepatobiliary carcinoma : HCC-CCA) ซึ่งมีลักษณะร่วมทั้งสองชนิด

นอกจากนี้ยังมีข้อมูลที่ว่า Stem cell สามารถพบอยู่ที่ Peribiliary glands (PBGs) โดยกระจายไปตามผนังของโครงสร้างท่อน้ำดี (Biliary tree) เริ่มพบได้ตั้งแต่ท่อน้ำดีภายในตับระดับ Segmental tree และพบหนาแน่นบริเวณ Extrahepatic biliary tree ที่ตำแหน่ง Cystic duct , Hilum และ Periampullary region ซึ่งเป็นบริเวณการเกิด Extrahepatic cholangiocarcinoma โดย Peribiliary glands (PBGs) ในตำแหน่ง Intrahepatic และ Extrahepatic ไม่สามารถแยกกันได้อย่างชัดเจน

ดังนั้น สาเหตุการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีจึงสันนิษฐานว่า Stem cell เป็นเซลล์ต้นกำเนิดก่อนที่จะพัฒนาเปลี่ยนไปของทั้งท่อน้ำดีทั้งหมดจนถึงท่อน้ำดีส่วนย่อยซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งได้อย่างมากมายจากทฤษฎีดังกล่าวจึงสันนิษฐานได้ว่า Intrahepatic cholangiocarcinoma กำเนิดจากเซลล์ที่แบ่งตัวผิดปกติ 2 แบบคือ มีต้นกำเนิดมาจาก Liver stem cell ที่อยู่บริเวณ Canal of Hering หรือ มีต้นกำเนิดมาจาก Stem cell ภายใน Peribiliary glands (PBGs) การค้นพบตำแหน่งของ Stem cell ที่แตกต่างกัน โน้มน้ำว่า Intrahepatic cholangiocarcinoma และ Extrahepatic cholangiocarcinoma เกิดจากลักษณะทางชีวภาพที่แตกต่างกัน สันนิษฐานข้อสันนิษฐานที่กล่าวว่ามีมะเร็งทั้ง 2 ตำแหน่งมีความแตกต่างกันทั้งใน Incidence , Mortality และ Risk factor<sup>(27)</sup> ในแง่ของการรายงานอุบัติการณ์การเกิดโรค ในการวินิจฉัยแยกชนิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีตั้งแต่แรกเริ่มนั้นทำได้ลำบาก มีการศึกษาที่กล่าวถึงการวินิจฉัยที่คลาดเคลื่อนของมะเร็งขั้วตับ (Hilar Cholangiocarcinoma: Klatskin Tumor) ซึ่งถูกจัดอยู่ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดนอกตับ (Extrahepatic Cholangiocarcinoma) ที่วินิจฉัยผิดว่าเป็น มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic Cholangiocarcinoma) ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีผลกระทบต่ออุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีทั้งชนิดภายในตับและชนิดนอกตับ กล่าวคือ<sup>(28)</sup> ตามการลงรหัสโรคของ International Classification of Disease for Oncology (ICD-O) แม้จะจัดให้ Hilar cholangiocarcinoma (Klatskin Tumor) เป็น Extrahepatic Cholangiocarcinoma แต่ใน second edition ICD-O-2 จัดให้ Histology code 8162/3 เป็น Klatskin ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Intrahepatic cholangiocarcinoma เป็นเหตุให้มีการอุบัติการณ์ การเกิด Intrahepatic Cholangiocarcinoma เพิ่มขึ้นในขณะเดียวกันก็มี อุบัติการณ์การเกิด Extrahepatic Cholangiocarcinoma ลดลงซึ่งผลกระทบต่อการศึกษาที่ผิดพลาดในตำแหน่งที่จำเพาะ ศึกษาเกี่ยวกับประชากรชาวสหรัฐอเมริกาในช่วงปี ค.ศ. 1992-2000 (พ.ศ. 2535-2543) ช่วงที่มีการใช้ ICD-O-2 พบว่ามีการวินิจฉัย Hilar Cholangiocarcinoma ด้วย code 8162/3 ซึ่งหมายถึงวินิจฉัยว่าเป็น

Intrahepatic Cholangiocarcinoma จำนวน 269 คน โดยเมื่อนำกลับมาสอบทวนย้อนหลังพบว่า โดยแท้ที่จริงแล้วนั้น ร้อยละ 91 หรือ จำนวน 246 คนเป็น Hilar cholangiocarcinoma ที่อยู่ในกลุ่ม Extrahepatic cholangiocarcinoma

สำหรับประเทศไทยนั้น<sup>(29)</sup> การวินิจฉัยมะเร็งตับและทางเดินน้ำดี ตามระบบ ICD-10 รหัส C 22 ; C 24 ตามที่มีข้อมูลการศึกษาการลงทะเบียนโรคมะเร็งในปี พ.ศ. 2553 เป็นข้อมูลผู้ป่วยระหว่างปี พ.ศ. 2532-2550 ในขณะนั้นการวินิจฉัยมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับได้รวมไว้ในกลุ่มศึกษาเดียวกัน เป็นที่น่าสังเกตว่า การวินิจฉัยโรคมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดี มีผู้ได้รับการตรวจทางพยาธิวิทยาหรือเซลล์วิทยาโดยแยกเป็นเพศชายและเพศหญิงแตกต่างกัน ในแต่ละทะเบียนโดยมีค่าอยู่ร้อยละ 5-6 แล้วแต่ทะเบียนโรค โดยชนิดของพยาธิวิทยาที่ตรวจได้มีการรายงานแยกออกเป็นเฉพาะ Hepatocellular carcinoma และ Cholangiocarcinoma และอื่นๆ โดยมีความแปรปรวนของอุบัติการณ์การเกิดของมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีสูง ทั้งนี้ เพราะเมื่อนำมารวมกับผู้ป่วยที่ไม่ได้ทำการตรวจทางพยาธิวิทยา ทำให้ไม่สามารถระบุจำนวนหรือแยกชนิดของผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวตามจริงได้ส่งผลให้ข้อมูลของมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและภายนอกตับที่มีในปัจจุบันไม่สะท้อนสถานการณ์ของผู้ป่วยตามจริง ส่งผลในแง่การวางแผนส่งเสริมสุขภาพลดความเสี่ยงและแนวทางการป้องกันในอนาคตไม่ตรงตามเป้าหมายโดยอ้างอิงบนพื้นฐานข้อมูลที่ทราบว่ามีลักษณะทางชีวภาพของทั้ง intrahepatic-Extrahepatic cholangiocarcinoma มีความแตกต่างกัน และเป็นสาเหตุให้การศึกษาในอนาคตที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งท่อน้ำดีมีความคลาดเคลื่อนของข้อมูลได้มีการพัฒนาการรักษาและการวินิจฉัย มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับอย่างต่อเนื่อง อาศัยวิวัฒนาการความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีขั้นสูงเพื่อหากลไกที่จำเพาะต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี โดยการวินิจฉัยจำแนกชนิดของมะเร็งท่อน้ำดีอย่างถูกต้องตั้งแต่แรกวินิจฉัยมีความจำเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลพัฒนารวดเร็วเป็นอย่างมากมีการทำ Whole exome sequencing เพื่อดูยีนที่จำเพาะต่อการเกิดโรคมะเร็ง มีได้ค้นพบยีนที่มีการกลายพันธุ์มากมายในมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งท่อน้ำดี หลายการศึกษาเริ่มมีข้อมูลสนับสนุนการค้นพบ ยีน IDH1/2 ที่มีการกลายพันธุ์ซึ่งเป็นสาเหตุก่อมะเร็งท่อน้ำดีร่วมกับมะเร็งชนิดอื่นๆ

IDH 1/2 มีความสำคัญในกระบวนการวัฏจักรเครปส์ การกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2 ส่งผลต่อกระบวนการ carcinogenesis โดยสามารถที่พบได้ในมะเร็งหลายชนิด

## 2.6 ความสำคัญของเอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase-1 (NADP+) ในกระบวนการการก่อมะเร็ง<sup>(30)</sup>

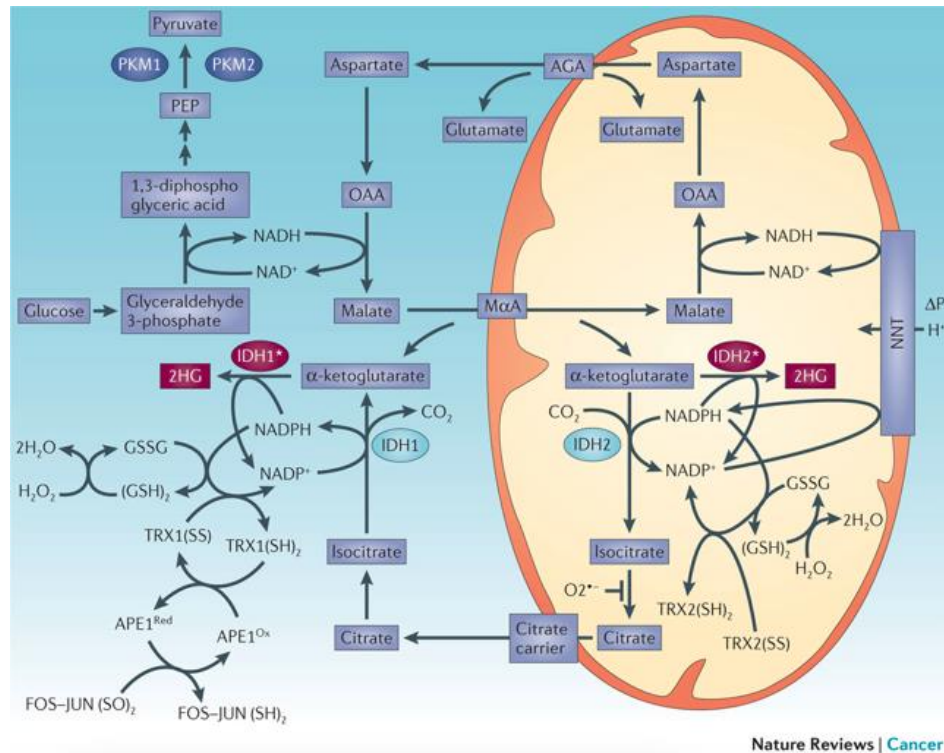
Isocitrate dehydrogenase-1 (NADP+) IDH เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างจากยีน *IDH* กลุ่มเอนไซม์ IDH มี 3 ชนิดได้แก่ IDH1 ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และเพอออกซิโซม (peroxisome) ส่วน IDH2 และ IDH3 ที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria)<sup>(31, 32)</sup> เอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทมากมายในกระบวนการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ รวมถึง mitochondrial oxidative phosphorylation, glutamine metabolism, lipogenesis, glucose sensing และ regulation of cellular status. โดยในที่นี้เราจะกล่าวถึงเฉพาะ IDH1 และ IDH2<sup>(33)</sup>

ในภาวะปกติเอนไซม์ IDH1 และ IDH2 ทำหน้าที่คล้ายคลึงกันคือจะเปลี่ยนแปลง isocitrate ในวัฏจักรเครบส์ (Krebs' cycle) ให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ โดยการเร่งปฏิกิริยากำจัดหมู่คาร์บอกซิล (COOH) ออกจาก NADPH+ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น CO<sub>2</sub> และ NADPH และเกิด enzyme ใหม่ชื่อ alpha-ketoglutarate ( $\alpha$ -KG) เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาต่อไปในวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) ต่อไป ต่อเมื่อมีการขัดขวางกระบวนการตามปกติกล่าวคือ เอนไซม์ IDH1 และ IDH2 มีความผิดปกติที่เกิดจากเมื่อมีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* และ *IDH2* จะสร้างเอนไซม์ที่ผิดปกติเมื่อเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Krebs' cycle) จากเดิมที่เคยได้ผลิตภัณฑ์เป็น ( $\alpha$ -KG) ภายหลังการเกิดเมตาบอลิซึมเกิดเอนไซม์ชนิดใหม่ที่ชื่อ R(-)-2-hydroxyglutarate หรือเรียกอีกชื่อว่า 2-HG. เอนไซม์ 2-HG จะไปยับยั้งเอนไซม์ Tet (Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase) และเอนไซม์  $\alpha$ -KG (ketoglutarate) ทำให้เกิดการสร้าง DNA ที่แตกต่างหลากหลายไปจากเดิมและรบกวนกระบวนการแสดงออกของยีนตามปกติซึ่งผลจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้พัฒนาไปสู่การเกิดมะเร็งซึ่งเชื่อว่า 2HG กระตุ้นการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติกระตุ้นการเกิดมะเร็งและการแพร่กระจายผ่านหลายกลไก<sup>(34, 35)</sup> การมี IDH mutation เพิ่มมากขึ้นก็ยิ่งทำให้  $\alpha$ -KG เปลี่ยนไปเป็น 2HG เพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน<sup>(36)</sup>

มีหลายสาเหตุที่ทำให้ยีน *IDH* มีการกลายพันธุ์ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นสาเหตุให้รบกวนการสร้าง Protein building block โดยกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine) ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งสำคัญในการสร้างโปรตีนนี้ ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเสียไป ส่งผลให้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจนได้เอนไซม์ดังกล่าวจะเกิดขึ้นในเฉพาะเนื้อเยื่อมะเร็งโดยไม่พบในเซลล์ปกติ

การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นกับ *IDH1* พบได้ในมะเร็งหลายชนิด รวมถึง specific brain tumor (Glioma and glioblastoma: 50-60%)<sup>(27,37)</sup> Intrahepatic bile duct cancers (Cholangiocarcinoma: 18-25%), Acute myeloid leukemia (AML: 5-10%) and Chondrosarcoma (5-10%).<sup>(27, 37)</sup>

นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ได้ถึงร้อยละ 7-23 ในมะเร็งท่อน้ำดี



รูปภาพที่ 1 แสดงกระบวนการเปลี่ยนแปลง เอนไซม์ IDH1/2 ในกระบวนการการก่อมะเร็ง

การศึกษาที่สนับสนุนข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ในมะเร็งท่อน้ำดีทั้งชนิดภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma) และ มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (Extrahepatic cholangiocarcinoma) รวมทั้งข้อมูลการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

1. การศึกษาของ Darrell R. และคณะ ในปี ค.ศ. 2012<sup>(37)</sup> เป็นการศึกษา cohort study เกี่ยวกับปริมาณของลักษณะสำคัญทางพันธุกรรม (genotype) ในการกลายพันธุ์ของยีน Isocitrate Dehydrogenase (*IDH1* and *IDH2*) ในผู้ป่วยมะเร็งทางเดินน้ำดี โดยการจำแนกผ่าน ฐานข้อมูลของโครงสร้างทางพันธุกรรมของเนื้องอกมะเร็งทางเดินอาหารในประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 287 คน คัดกรองผู้ป่วยออกตามชนิดของเนื้องอกมะเร็งในการศึกษาได้แก่ มะเร็งลำไส้ (Colorectal adenocarcinoma) 180 คน, มะเร็งตับอ่อน (Pancreatic carcinoma) 43 คน, มะเร็งกระเพาะและหลอดอาหาร (Gastroesophageal carcinoma) 32 คน, มะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) 16 คน, มะเร็งท่อน้ำดี (Biliary tract) 12 คน นำมาทดสอบ ตำแหน่งกลายพันธุ์จำเพาะในยีนมะเร็ง 15 ชนิด (130 site- specific mutations within 15 cancer genes)

โดยพบว่าเนื้องอกมะเร็งทางเดินอาหารทั่วไป ในการศึกษาเริ่มต้นพบการกลายพันธุ์ของ *IDH1* ในเนื้องอกมะเร็งทางเดินอาหารทั่วไปได้เพียงร้อยละ 2 แต่กลับพบการกลายพันธุ์ของ *IDH1* ในตัวอย่างของเฉพะมะเร็งท่อน้ำดี 3 ตัวอย่างจาก 12 ตัวอย่างโดยคิดเป็นถึงร้อยละ 25 ของมะเร็งท่อน้ำดี

มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยศึกษาเพิ่มเติมในโดยเฉพาะใน มะเร็งถุงน้ำดีและท่อน้ำดี 75 คน นำมาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่า มีการกลายพันธุ์ยีน *IDH1*, *IDH2* เฉพาะใน มะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายใน ตับ คิดเป็นร้อยละ 23 แต่ไม่พบใน มะเร็งทางเดินน้ำดีชนิดภายนอกตับและมะเร็งถุงน้ำดี ร้อยละ 0

เมื่อนำเนื้อเยื่อเพิ่มเติมมาวิเคราะห์ พบว่า การกลายพันธุ์ของ *IDH1* มีความสัมพันธ์กับ เพิ่มขึ้นอย่างมากของ 2- hydroxyglutarate (2HG) ในเนื้อเยื่อซึ่งก่อให้เกิด hypermethylate state of DNA และ histone ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น Oncogene activation และยับยั้งการทำงานของ Tumor suppressor genes กล่าวโดยสรุปในการศึกษาพบว่า การกลายพันธุ์ของ *IDH1* พบได้ ร้อยละ 23 ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่า *IDH1* มีการกลายพันธุ์มากกว่า *IDH2* และ ตำแหน่งของยีน *IDH1* ที่กรดอะมิโนอาร์จินีน ตำแหน่ง R132G R132C R132L *IDH2* ที่ตำแหน่ง R172W โดยการกลายพันธุ์นี้ พบเฉพาะในมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับเท่านั้น  $p=0.042$

## 2. การศึกษาของ Warapon C. และคณะในปี ค.ศ. 2013<sup>(38)</sup>

เป็นศึกษาเกี่ยวกับการแยกความแตกต่างของรูปแบบการกลายพันธุ์โดยการหาลำดับ พันธุกรรมของยีนในส่วนเอ็กซอนส์ (Exon) ที่ใช้ในการสร้างโปรตีน (Exome sequencing identifies) ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 209 คน จำแนกเป็นผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการเป็นพยาธิใบไม้ตับ 108 รายโดยเป็นตัวอย่างเป็นประชากรผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทยที่มีการตรวจทางห้องปฏิบัติการยืนยัน ELISA มีserum IgG against *O. viverrini* เปรียบเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่สัมพันธ์กับการเป็นพยาธิใบไม้ตับในประเทศที่ไม่มีการรายงาน การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีแบบที่สัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ตับได้แก่ประเทศสิงคโปร์และประเทศโรมาเนีย 101 ราย เมื่อเปรียบเทียบมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับที่สัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* (IHCC-relate OV) และไม่สัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* (IHCC-non related) พบว่า รูปแบบการกลายพันธุ์ของ *IDH1* และ *IDH2* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีการ พบว่าการกลายพันธุ์ของ *IDH1/2* จำนวน 15 คนจาก 209 คนคิดเป็นอุบัติการณ์การเกิดร้อยละ 7 โดย พบว่า *IDH1* พบการกลายพันธุ์มากกว่า *IDH2* และพบมะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ตับเพียง 3 รายพบได้น้อยกว่า มะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่สัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ตับที่พบได้ถึง 12 รายมีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อแยกวิเคราะห์เฉพาะคนไข้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้นการการกลายพันธุ์ของ *IDH1/2* สอดคล้องกับการศึกษาในประชากรทั้งหมดกล่าวคือพบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ใน มะเร็งท่อน้ำดีชนิดไม่สัมพันธ์กับพยาธิใบไม้มากกว่า เมื่อจำแนกออกเป็นตามตำแหน่งของมะเร็งท่อน้ำดีพบว่าจากการศึกษาครั้งนี้ มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับชนิดที่สัมพันธ์กับพยาธิใบไม้ตับเพิ่มมากขึ้นอย่างมี นัยสำคัญ  $p=0.09$  เมื่อพิจารณาดำแหน่งของการกลายพันธุ์ในยีน *IDH1* และ *IDH2* พบว่าการกลาย พันธุ์ที่พบได้บ่อยใน *IDH1* ที่ R132C R132G R132L R132S และใน *IDH2* ที่ R172L R172W โดย สรุปการศึกษานี้พบว่ากลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* เป็นหนึ่งกลไกความผิดปกติที่พบได้ในการเกิดมะเร็ง

ท่อน้ำดีโดยในผู้ป่วยที่ไม่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับและมักพบในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ

### 3. การศึกษาของ Kipp Br. และคณะ รายงานในปี ค.ศ.2011<sup>(39)</sup>

ที่สหรัฐอเมริกา เป็นการศึกษาแบบ descriptive ข้อมูลความถี่ของการกลายพันธุ์และลักษณะทางพยาธิวิทยาที่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน isocitrate dehydrogenase 1 และการกลายพันธุ์ของยีน isocitrate dehydrogenase 2 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 94 คน โดยศึกษาจากชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีนำมาตรวจหาลำดับเบสด้วยกระบวนการ pyrosequencing โดยมีการบันทึกลักษณะข้อมูลพื้นฐานข้อมูลลักษณะทาง histology รวมถึงระยะเวลาการดำเนินโรค จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยจำนวน 94คน เป็นมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ 67 คนเป็นมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ 27 คน ตำแหน่งที่นำมาศึกษาของยีน *IDH1* คือ R132 และยีน *IDH2* ที่ตำแหน่ง R140 และ R172 จากการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* จำนวน 21 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 22 โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* จำนวน 14 คน ในขณะที่พบการกลายพันธุ์ที่ *IDH2* เพียง 7 คนโดยพิจารณาจากตำแหน่งแล้วพบว่ามะเร็งน้ำดีภายในตับมีการกลายพันธุ์มากกว่ามะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p=0.03$  ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยใน *IDH1* ได้แก่ R132C R132S R132G ส่วนในยีน *IDH2* พบได้บ่อยที่ตำแหน่ง R172K R172M R172G ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ได้แก่ clear cell change และ poorly differentiation และพบว่าระยะเวลาการรอดชีพในการกลายพันธุ์ของยีนโดยเฉพาะ *IDH2* น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ กล่าวโดยสรุปในการศึกษานี้พบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* สามารถพบได้ในมะเร็งท่อน้ำดีโดยพบมากในมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* พบได้มากกว่า *IDH2*

### 4. การศึกษาของ Chaitanya R. และคณะ ในปี ค.ศ. 2014<sup>(40)</sup> ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา

เป็นการศึกษา แบบ descriptive ของข้อมูลการกลายพันธุ์ในมะเร็งท่อน้ำดีที่แสดงถึงพยากรณ์โรคและผลการรักษาในผู้ป่วย มะเร็งท่อน้ำดี 75 คน ในการศึกษาใช้ เทคโนโลยี Next generation sequencing (NGS) ในการระบุลักษณะของสารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Genetic differences) ในแต่ละสิ่งทดสอบและลักษณะทางโมเลกุลของกลุ่มตัวอย่างกลุ่มย่อยสำหรับการรักษาแบบมุ่งเป้า (Target therapeutics) ข้อมูลจากการทำ NGS จะนำมารวมกับข้อมูลทางคลินิก ในกลุ่มผู้ป่วยที่มี Targeted mutations ผลการทดสอบจะถูกส่งไปเข้าการศึกษาที่เหมาะสมต่อไป

ผลการศึกษาพบที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ การกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma) เมื่อเทียบกับมะเร็งท่อน้ำดีชนิดนอกตับ (Extrahepatic cholangiocarcinoma) โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* ในมะเร็งน้ำดีชนิดภายในตับถึงร้อยละ 18

### 5. การศึกษาของ Lipika G และคณะ<sup>(41)</sup>



ศึกษาเกี่ยวกับการพยากรณ์โรคและลักษณะของผู้ป่วยทางพยาธิวิทยาคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับระยะลุกลามที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH* เทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ยีน *IDH*

ผู้ป่วยทั้งหมด 104 คน พบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH* จำนวน 30 คน คิดเป็น ร้อยละ 28.8 การรอดชีวิตโดยรวมเฉลี่ย (MOS) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน 2 กลุ่ม อายุ เพศ แบบแผนการแพร่กระจายไม่มีความแตกต่างกันใน 2 กลุ่ม

โดยสรุปการศึกษาได้ตอบคำถามเกี่ยวกับการพยากรณ์และลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิกว่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งผู้วิจัยได้กล่าวถึงการที่ *IDH* mutation ขาดลักษณะการพยากรณ์โรค แต่อย่างไรก็ตามการศึกษายังเป็นการศึกษาแรกที่กลุ่มประชากรยังไม่มากพอจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มากขึ้นแต่สามารถพบการกลายพันธุ์ในอัตราสูง ยังเป็นประโยชน์ต่อการรักษาที่รักษาต่อไป

#### 6. การศึกษาของ Pu Wang และคณะรายงานในปี ค.ศ. 2013 <sup>(42)</sup>

เป็นการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *IDH 1/2* ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ โดยพบการกลายพันธุ์ ร้อยละ 10 การศึกษาการกลายพันธุ์ *IDH1/2* ใน Fudan ผู้ป่วยจำนวน 252 คน ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH* มีโอกาสการกลับเป็นซ้ำที่ 1 ปี 4 ปี และ 7 ปี อยู่ที่ร้อยละ 10.5, 45.3 and 45.3 ต่ำกว่าในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ *IDH* ที่อัตราการกลับเป็นซ้ำอยู่ที่ร้อยละ 41.7, 71.5 and 81.3 และมีการรอดชีวิต (Overall survival) ที่ยาวนานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ในกลุ่ม post hepatic resection) โดยสรุปจากการศึกษา พบว่าสามารถพบ *IDH1/2* ได้ในมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ Intrahepatic cholangiocarcinoma และในกลุ่มที่ผ่าตัดไปแล้วการพยากรณ์โรคที่ดีกว่า กล่าวคือการรอดชีวิตที่ยาวนานกว่าในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์

ในปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อทดสอบยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งท่อน้ำดีระยะลุกลามชนิดภายในตับ โดยใช้ยา Dasatinib (BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitor) ในผู้ป่วยที่มี *IDH1/2* mutation

Phase II Trial of Dasatinib in patients with Isocitrate Dehydrogenase (*IDH*)-mutant intrahepatic Cholangiocarcinoma (NCT02428855) ที่โรงพยาบาล Massachusetts General ประเทศสหรัฐอเมริกา โดย Primary outcome: Objective response rate (ORR) Secondary outcome : Progress free survival (PFS) Overall survival (OS) Number of Participant with Adverse event โดยเริ่มโครงการวิจัยใน เดือนเมษายน ปี พ.ศ. 2558 และยังมีการศึกษา Phase I ในการเลือกใช้ *IDH* mutation inhibitor (AGI-6780, AGI-5198) ที่อาจจะเป็นความหวังของการรักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

กล่าวโดยสรุปมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่พบมากในแถบเอเชียและในประเทศไทยพบมากในภาค

อีสานและภาคเหนือ การวินิจฉัยได้ในตั้งแต่ระยะแรกสามารถรักษาให้หายขาดได้ โดยอุบัติการณ์การเกิดโรคเพิ่มมากขึ้นพร้อมกับการพัฒนาทางการวินิจฉัยและการรักษามีความทันสมัยมากขึ้นตามไปด้วย

องค์ความรู้ในปัจจุบัน เราสามารถทราบถึงความผิดปกติของยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง และมีการศึกษาต่อยอดเพื่อหาวิธีที่จำเพาะที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งแต่ละชนิด เช่นเดียวกับมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งเป็นโรคที่มีความหลากหลายลักษณะการกลายพันธุ์และการแสดงออกของPhenotype ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดคือ สาเหตุการเกิด ความเสี่ยงของการเกิด ในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและชนิดภายนอกตับมีความแตกต่างกัน ซึ่งเป็นเหตุให้การนำเทคโนโลยีมาช่วยแยกความแตกต่างทางด้านโมเลกุล ในการศึกษา การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* โดยการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* มากถึงร้อยละ 10-23 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ และไม่พบการกลายพันธุ์เลยในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ ในขณะที่ในผู้ป่วยไทย มีรายงานเฉพาะในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เคยมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งพบความชุกน้อยมาก เพียงร้อยละ 3 อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยไทยจำนวนหนึ่งไม่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมาก่อน ร่วมกับผู้ป่วยที่เคยมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมักจะเป็นมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า หากพิจารณาเฉพาะผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ น่าจะมีความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* มากกว่ามะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับ

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 รูปแบบวิธีการวิจัย

การวิจัยนี้ เป็นการศึกษาวิจัยเชิงพรรณนาแบบ descriptive retrospective study โดยศึกษาอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีทั้งชนิดภายในตับ และชนิดนอกตับและอธิบายถึงลักษณะความผิดปกติทางพยาธิวิทยาคลินิกที่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ดังกล่าว

##### ประชากรเป้าหมาย (Target Population )

ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทั้งชนิดภายในตับและภายนอกตับ ( Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Extrahepatic Cholangiocarcinoma)

##### ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study Population)

ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและภายนอกตับ (Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Extrahepatic Cholangiocarcinoma) ที่ได้รับการวินิจฉัยที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงปี 2552-2557

#### 3.2 หลักเกณฑ์การคัดเลือกประชากรและตัวอย่าง (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่อายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป
2. ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีทั้งชนิดภายในตับและภายนอกตับ ( Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Extrahepatic Cholangiocarcinoma) ตามรหัสแยกโรค C22.0 C22.1 C24.0 และ C24.9
3. มีผลการตรวจทางพยาธิวิทยาว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีและมีการแปลผลภาพทางรังสีวิทยาที่วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ตามเกณฑ์ดังต่อไปนี้

เกณฑ์การวินิจฉัย มะเร็งน้ำดีภายในตับ หรือ ภายนอกตับ มีลักษณะดังต่อไปนี้

##### 1) การประเมินลักษณะทางรังสีวิทยา (Radiologic Evaluation)

การวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับและมะเร็งขั้วตับ<sup>(43)</sup> : ลักษณะทาง CT ของมะเร็งท่อน้ำดี ภายนอกตับ

1. มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเนื้อตับ
2. การสะสมของสารทึบรังสีในภาพถ่ายรังสี CT เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น (delayed image)
3. พบก้อนที่มีลักษณะความทึบเท่ากับหรือน้อยกว่าเนื้อตับที่ขั้วตับ

4. ไม่พบความเชื่อมต่อของท่อน้ำดีด้านซ้ายและด้านขวา

5. ท่อน้ำดีในตับมีลักษณะขยายคล้ายสร้อยลูกปัด ถ้าหากท่อน้ำดีส่วนขั้วเล็ก มักจะตรวจพบตำแหน่งที่อุดตันได้ มักจะพบความผิดปกติของเส้นเลือดดำ portal ร่วมกับ โดยให้ลักษณะเป็นการติดสารทึบรังสีที่เข้มขึ้น ในMRI ก็ให้ลักษณะของความผิดปกติของเส้นเลือดและเนื้อตับเช่นเดียวกับ CT

**การวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ<sup>(44)</sup> :** ลักษณะทาง CT ของมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ

1. พบลักษณะเนื้อตับผิดปกติได้แต่พบได้น้อยกว่ามะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับ
2. พบก้อนที่มีลักษณะกลมทึบสีน้อยและขอบเขตไม่เรียบไม่มีเปลือกหุ้ม
3. มักพบรอยแผลเป็นกลางก้อน (scar) หรือพบการจับกับหินปูนภายในก้อน (calcification)
4. ได้สารทึบรังสีตัวขอบของก้อนจะมีการเปลี่ยนแปลงติดสารทึบรังสีเข้มขึ้นก่อน
5. เปลือกหุ้มของตับพบว่าการดึงรั้ง (sub-capsular retraction)
6. มักพบกลีบของตับจะฝ่อเล็กลง (liver atrophy)
7. มักไม่พบความผิดปกติของเส้นเลือดเหมือนในมะเร็งชนิดภายนอกตับลักษณะทาง MRI ก้อนจะมีความดำในภาพ T1 และมีความขาวในภาพ T2 เมื่อเทียบกับตัวเนื้อตับและมักจะมีรอยแผลเป็นตรงกลางสีขาว ซึ่งลักษณะที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติที่สำคัญในมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับ

## 2) การประเมินลักษณะทางพยาธิวิทยา (Pathologic Evaluation)

### การวินิจฉัย

1. ผลรายงาน Gross anatomy ระบุตำแหน่งชิ้นเนื้อที่นำมาตรวจว่าเป็นชิ้นเนื้อที่ได้จากภายในเนื้องอกท่อน้ำดีภายนอกตับหรือบริเวณอื่นภายนอกตับโดยไม่นับรวม มะเร็งเยื่อถุงน้ำดีและ ampulla of vater
2. รายงานผลชิ้นเนื้อยืนยันว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีชนิด Cholangiocarcinoma origin
3. กรณีไม่แน่ชัดจะทำการปรึกษาพยาธิแพทย์ต่อไป

## 3.3 กลุ่มตัวอย่างงานวิจัย

เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อของเนื้องอกมะเร็งท่อน้ำดีทั้งชนิดภายในตับและชนิดภายนอกตับของผู้ป่วยที่ได้จากการผ่าตัด (operation: liver resection, hepatectomy, whipple's operation) หรือ ชิ้นเนื้อตัวอย่าง(Biopsy) เก็บไว้ในพาราฟินบล็อกด้วยเทคนิค Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) ที่ได้มาจากการตรวจทางพยาธิวิทยาของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทางผู้วิจัยได้รับอนุญาตให้นำมาใช้ในการทดลอง รวมจำนวน 50 ราย ภายหลังจากประเมินและวินิจฉัยผู้วิจัยได้แบ่งเนื้อเยื่อของเนื้องอกมะเร็งท่อน้ำดีออกเป็น 2 กลุ่มในการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างเนื้อเยื่อของเนื้องอกมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับของผู้ป่วย จำนวน 27 ตัวอย่าง

กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อของเนื้องอกมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายนอกตับของผู้ป่วย จำนวน 23 ตัวอย่าง

### 3.4 เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ไม่มีผลตรวจทางรังสีวิทยาที่สามารถวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีหรือไม่สามารถติดตามขึ้นเนื้อมาตรวจหรือชิ้นเนื้อไม่สามารถนำมาศึกษาเพิ่มเติมได้
2. ผู้ป่วยที่ประวัติเวชระเบียนไม่สมบูรณ์ไม่สามารถสืบค้นได้

### 3.5 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากการศึกษาอัตราการตรวจพบของการกลายพันธุ์ยีน *IDH1/2* ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและชนิดภายนอกตับการหาตัวอย่างเพื่อทดสอบสมมุติฐานด้วยค่าสัดส่วนหรืออุบัติการณ์ 2 กลุ่มที่เป็นอิสระจากกัน

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2}\sqrt{2\bar{P}(1-\bar{P})} + Z_{\beta}\sqrt{P_0(1-P_0) + P_1(1-P_1)})^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

โดย

$p_1$  : reported prevalence of *IDH1/2* mutation in intrahepatic CCA = 20 %

$p_2$  : reported prevalence of *IDH1/2* mutation in extrahepatic CCA = 0 %

$\bar{P}$  = ค่าเฉลี่ยของ  $P_0$  และ  $P_1$  ก็คือ  $P_0+P_1/2$

$Z_{\alpha/2}$  =ค่า  $Z$  ของ alpha error ในที่นี้  $Z_{\alpha/2}$  ที่ alpha =0.05 จะได้ 1.96

$Z_{\beta}$  =ค่า  $Z$  beta error ในที่นี้ค่า  $Z$  ที่ beta = 0.2 จะได้ 0.84

แทนค่าในสูตรที่เคยทำมาของ Darrell R. และคณะ ในปี 2012

จะได้  $N$  ประมาณ 33 คน / กลุ่ม ดังนั้นจะต้องศึกษาประชากรจากการสุ่มตัวอย่างทั้งหมดประมาณ 33 รายเป็นอย่างน้อย เก็บข้อมูลเพื่อประมาณ 10% จำนวนประชากรที่ต้องการทั้งหมดประมาณ 35 คนต่อกลุ่ม

ประเทศไทยเป็นประเทศที่พบอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้มากโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนืออย่างไรก็ตามการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่เป็นโรงพยาบาลตติยภูมิ มีการส่งต่อผู้ป่วยมารักษาจากหลายโรงพยาบาล มีการวินิจฉัยมาจากโรงพยาบาลต้นสังกัดก่อนหน้าโดยไม่มีชิ้นเนื้อตัวอย่างและหรือภาพถ่ายทางรังสีวิทยาแนบมาพร้อมการส่งตัว หรือ

เนื่องจากผู้ป่วยอาจจะสภาวะร่างกายไม่พร้อมต่อการผ่าตัด ดังนั้น การวินิจฉัยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีจึงอ้างอิงจากลักษณะทางภาพถ่ายทางรังสีวิทยาอาการและอาการแสดงเป็นหลักโดยไม่มีผลชิ้นเนื้อตัวอย่างจากข้อจำกัดดังกล่าวในการศึกษานี้เมื่อสืบค้นข้อมูลจากรหัสโรค C22.0 C22.1 C24.0 และ C24.9 มีผู้ป่วยวินิจฉัยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีภายนอกตับที่มีภาพถ่ายทางรังสีวิทยาที่วินิจฉัยยืนยันว่าเป็นมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีและมีชิ้นเนื้อตัวอย่างที่วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma in origin) และเพียงพอต่อการส่งตรวจเพิ่มเติมเป็นจำนวนทั้งสิ้นเพียง 50 ราย ซึ่งน้อยกว่าการคำนวณกลุ่มตัวอย่างงานวิจัย

### 3.6 ขั้นตอนการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) ผู้วิจัยคัดเลือกผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปทั้งเพศชายและเพศหญิงที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีทั้งชนิด intrahepatic และ extrahepatic cholangiocarcinoma จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2552-2557 นำข้อมูลมาจากรหัสแยกโรค ICD10 รหัสโรสดังนี้ C22.0 C22.1 C24.0 และ C24.9 โดยเลือกตัวอย่างที่มีทั้งการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาและการวินิจฉัยจากภาพถ่ายทางรังสีวินิจฉัยยืนยัน

2) ผู้วิจัยบันทึกข้อมูล เวชระเบียนของผู้ป่วยทั้งข้อมูลพื้นฐาน อาการ ผลการตรวจทางรังสีวินิจฉัย และประวัติการรักษา แล้วทำการจำแนกประเภทของ มะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีชนิดนอกตับและมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีชนิดในตับตามเกณฑ์วินิจฉัยที่กล่าวข้างต้น

การคำนวณระยะเวลารอดชีพโดยรวมโดยอาศัยขั้นตอนดังนี้ 2.1 บันทึกเวลาที่วินิจฉัยครั้งแรกจากเวชระเบียนโดยอ้างอิงจากภาพถ่ายทางรังสีหรือผลจากการตรวจทางพยาธิวิทยาที่ระบุว่าเป็นมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี 2.2 บันทึกเวลาเสียชีวิตที่ระบุตามเวชระเบียนในรูปแบบแฟ้มบันทึกหรือในระบบคอมพิวเตอร์โรงพยาบาล 2.3 กรณีที่ผู้ป่วยไม่มาตามนัดหรือไม่ทราบสถานะจะนับวันที่ 31 ธันวาคม 2559 เป็นวันสุดท้ายของการนัดติดตาม โดยนำรายชื่อผู้ป่วยไปตรวจสอบกับทะเบียนราษฎรเพื่อตรวจสอบสถานการณ์เสียชีวิตโดยระบุวันที่ได้ 2.4 ผู้ป่วยที่ไม่ขึ้นสถานะเสียชีวิตตามทะเบียนราษฎรไม่มีข้อมูลการมาตรวจตามนัดจะทำการโทรศัพท์สอบถามสถานะของผู้ป่วยต่อไป 2.5 นำมาคำนวณหาระยะเวลาการรอดชีพในผู้ป่วยแล้วบันทึกดังนี้คือยังมีชีวิตหรือเสียชีวิตถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2559

3) ผู้วิจัยส่งชิ้นเนื้อ Formalin-Fixed Paraffin- Embedded (FFPF) ของผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างให้เจ้าหน้าที่ปฏิบัติการทางห้องวิจัยเพื่อส่งตรวจดังรายการต่อไปนี้ คือ

## การตรวจหาการกลายพันธุ์ IDH1/2 ด้วยวิธีการ Pyrosequencing

มีกระบวนการดังต่อไปนี้

เตรียมชิ้นเนื้อพาราฟินจากภาควิชาพยาธิวิทยาเพื่อนำมาเข้ากระบวนการโดยตรวจสอบความถูกต้องของการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีโดยพยาธิแพทย์

### ขั้นที่ 1 การตัดชิ้นเนื้อ

ตัดชิ้นเนื้อจากพาราฟินบล็อกให้เป็นแผ่นเนื้อเยื่อบาง โดยใช้ microtome โดยทั่วไปจะตัดให้แผ่นเนื้อเยื่อมีความหนาประมาณ 10 ไมครอน แผ่นเนื้อเยื่อบางจะถูกนำมาลอยบนผิวหนังที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้รอยย่นที่อยู่บนเนื้อหายไป จากนั้นจึงนำแผ่นสไลด์มาซ้อนให้แผ่นเนื้อเยื่อติดอยู่บนแผ่นสไลด์ ตัดตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างละ 5 แผ่น

### ขั้นที่ 2 การย้อมสีเนื้อเยื่อ

เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อและปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ สีย้อมที่ใช้ คือ hematoxyline และ eosin (H&E) โดย hematoxylin จะทำปฏิกิริยากับโครมาติน และสารคัดหลั่งบางชนิด ทำให้เห็นเป็นสีม่วงหรือน้ำเงินหรือฟ้า ส่วน eosin จะทำปฏิกิริยากับไซโตพลาสซึม และสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ทำให้เห็นเป็นสีแดงชมพูหรือแสด ดังแสดงรูปภาพที่ 2

### ขั้นที่ 3 การเลือกบริเวณ

นำสไลด์ที่ผ่านการย้อม H&E แล้ว มาดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อเลือกวงบริเวณเนื้อเยื่อที่สนใจ จากนั้นนำสไลด์ที่วงเลือกบริเวณแล้วโดยพยาธิแพทย์มาทาบกับสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อที่ไม่ผ่านการย้อม H+E เทียบให้ชิ้นเนื้อของทั้ง 2 สไลด์ตรงกัน และวงบริเวณตามสไลด์ H+E ลงสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อที่ไม่ผ่านการย้อม จากนั้นขูดบริเวณที่เลือกบนสไลด์ที่ไม่ผ่านการย้อม H+E ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยทำทั้ง 3 แผ่นทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ อาจส่งผลต่อการศึกษาดังแสดงรูปภาพที่ 3, 4 และ 5



รูปภาพที่ 2 แสดงสไลด์ย้อมสีเนื้อเยื่อที่ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์



รูปภาพที่ 3 ขั้นตอนการเลือกบริเวณที่ต้องการศึกษา





รูปภาพที่ 4 แสดงสไลด์ที่มีการวงเลือกบริเวณที่สนใจ



รูปภาพที่ 5 แสดงสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อการไปสกัดดีเอ็นเอ

#### ขั้นที่ 4 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยใช้ QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Germany) ก่อนการสกัด ดีเอ็นเอจากตัวอย่างจะต้องทำการ Deparaffin เพื่อกำจัดพาราฟินออกจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ ขั้นตอนการ Deparaffin

1. เติม Xylene 1,000 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีตัวอย่างเนื้อเยื่ออยู่ภายในหลอด นำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส (ทำซ้ำข้อ 1-2 อีกครั้ง)
3. เติม 100% Ethanol 500 ไมโครลิตร นำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส (ทำซ้ำข้อ 3-4 อีกครั้ง)

ขั้นตอนการย่อยชิ้นเนื้อ

1. เติม Proteinase K 20 ไมโครลิตร ลงในส่วนใสชั้นล่าง ผสมให้เข้ากันโดยการ pipette ขึ้นลง
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

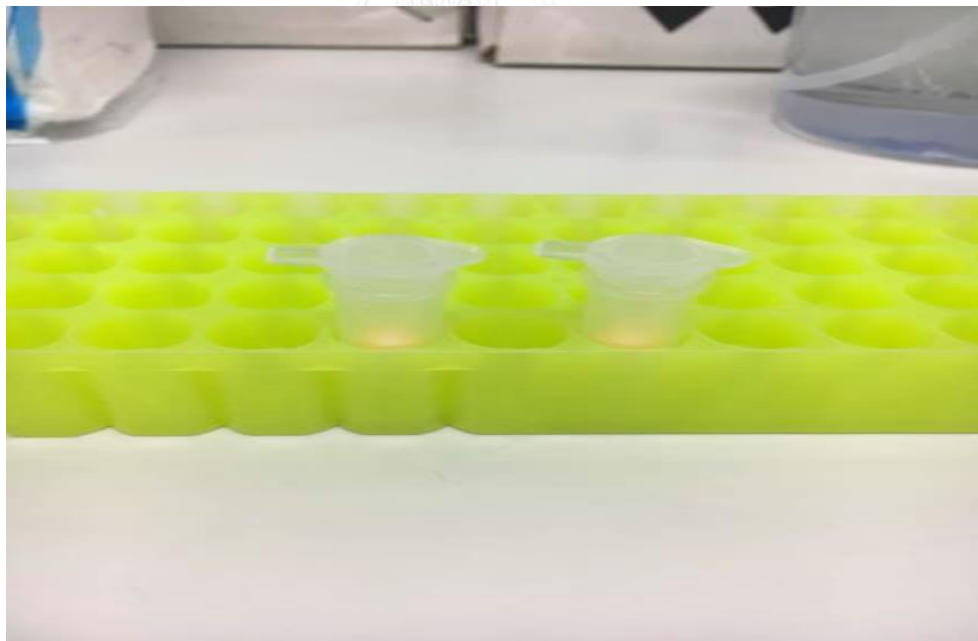
ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

1. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังแสดงรูปภาพที่ 6
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที
3. เติม Buffer AL 200 ไมโครลิตร และ 100% Ethanol 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ pipette ขึ้นลง
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 0,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที
5. ดูดสารละลายมาใส่ใน QIAampMinElute column ปิดฝา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทน้ำทิ้ง
6. เติม Buffer AW1 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำทิ้ง
7. เติม Buffer AW2500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทน้ำทิ้ง
8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ membrane แห้ง
9. ย้าย QIAampMinElute column ไปวางในหลอด 1.5 ไมโครลิตร ดังแสดงรูปภาพที่ 9
10. เติม Buffer ATE30 ไมโครลิตร โคนหยดไปที่บริเวณตรงกลางของ membrane ดังรูปที่

11. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ดังรูปภาพที่ 11



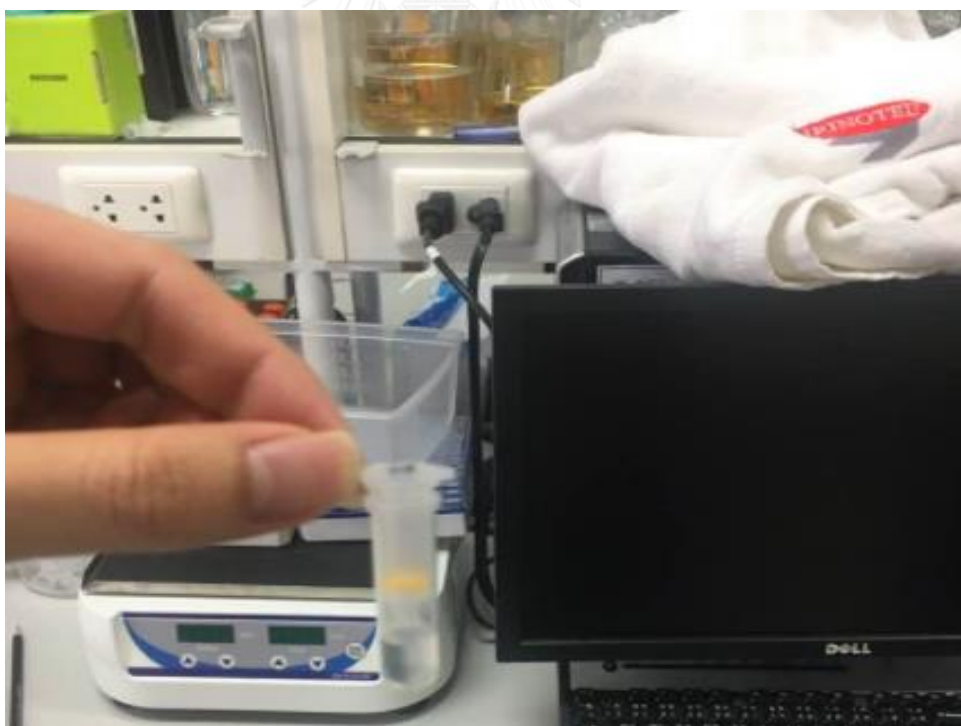
รูปภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ



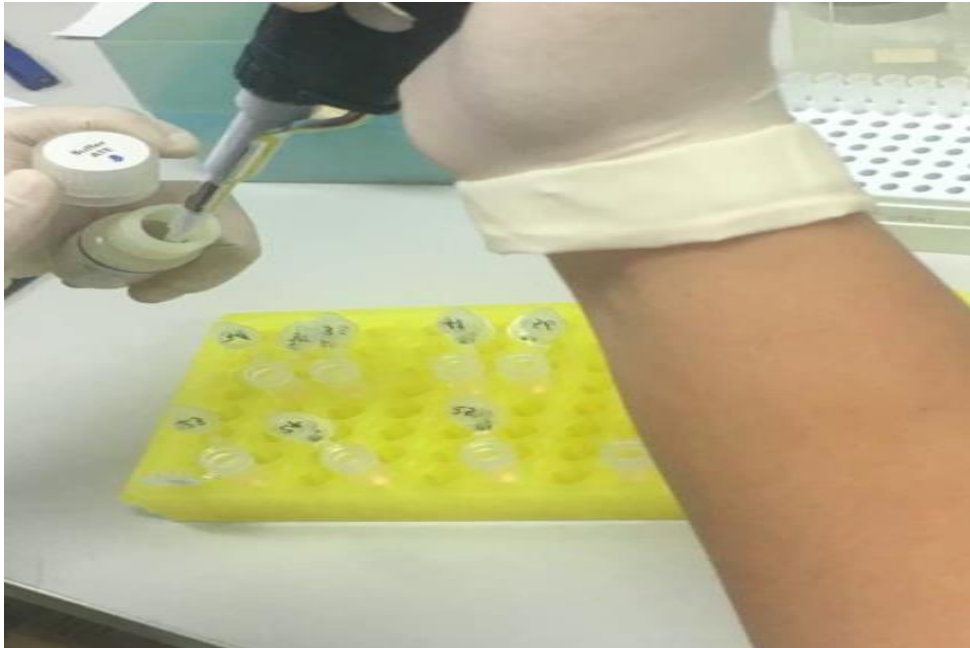
รูปภาพที่ 7 แสดงสารสกัดดีเอ็นเอภายหลังการdeparaffin และการย่อยชิ้นเนื้อ



รูปภาพที่ 8 แสดงสารสกัดดีเอ็นเอ



รูปภาพที่ 9 แสดงสารสกัดดีเอ็นเอ



รูปภาพที่ 10 แสดงขั้นตอนการเติมbuffer ในกระบวนการสกัดดีเอ็นเอ



รูปภาพที่ 11 แสดงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยการปั่นเหวี่ยงสกัด

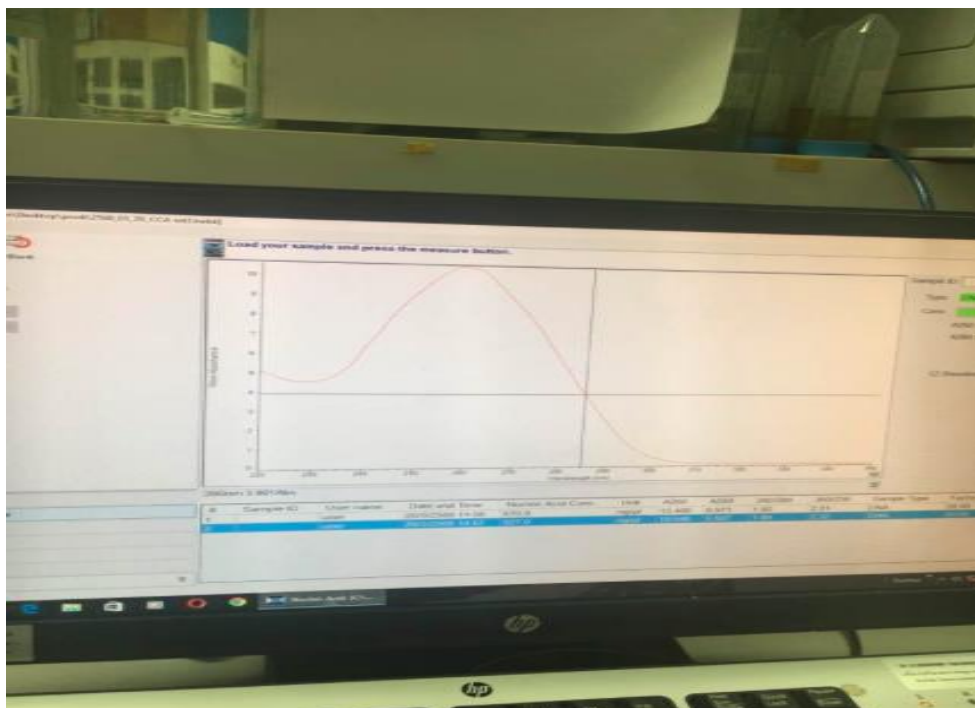


รูปภาพที่ 12 แสดงการเตรียมการวัดค่าการดูดกลืนแสง

#### การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาปริมาณของดีเอ็นเอ

ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้เครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ซึ่งดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ในหน่วยนาโนกรัมต่อ 1 ไมโครลิตรถ้าค่าของ (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) มีค่าที่อยู่ในช่วง 1.80 -1.90 แสดงว่า

ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์หรือมีคุณภาพดีแต่ถ้ามีค่าต่ำกว่า 1.80 แสดงว่ามีโปรตีน และ สารละลายนอลปะปนอยู่ในสารละลายและถ้ามีค่ามากกว่า 1.90 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนอยู่ในสารละลาย ดังรูปภาพที่ 12 และ 13



รูปภาพที่ 13 แสดงตัวอย่างการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง nanodrop

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยปฏิกิริยาลูกโซ่

ตั้งอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม (ตามตารางที่ 2) ซึ่งในแต่ละขั้นตอนมีหลักการดังนี้

1. Initial PCR activation step เครื่องจะทำเพิ่มอุณหภูมิตามที่กำหนดในขั้นตอนแรก คือ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว
2. Denaturation เริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยเริ่มจากอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเกิดการเสียสภาพ
3. Annealing ลดอุณหภูมิลง ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอเกิดการจับอย่างจำเพาะกับไพรเมอร์
4. Final extension เพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที เพื่อให้เกิดการเพิ่มความยาวให้สายนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Taq polymerase (Extension) เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ ครบตามรอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา จะคงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์
5. หลังจากนั้นเก็บพีซีอาร์โปรดักส์ ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 2 - 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่

| primer | Sequence                            | Cycle | Product size |
|--------|-------------------------------------|-------|--------------|
| IDH1_F | 5'-TCAGAGAAGCCATTATCTGCAAAAATAT-3'  | 45    | 143          |
| IDH1_R | 5'-biotin-GGCCATGAAAAAAAAAACATGC-3' |       |              |
| IDH2_F | 5'-AAAACATCCCACGCCTAGTCC-3'         | 45    | 110          |
| IDH2_R | 5'-biotin-GTGCCAGGTCAGTGGATC-3'     |       |              |

#### PCR Condition IDH1

|                             |      |    |
|-----------------------------|------|----|
| 10X PCR buffer              | 6    | μl |
| 50 mmol/L MgCl <sub>2</sub> | 2.4  | μl |
| 10 mmol/L dNTP mix          | 0.6  | μl |
| 10 μM Forward primer        | 0.6  | μl |
| 10 μM Reverse primer        | 0.6  | μl |
| Platinum Taq                | 0.3  | μl |
| dH <sub>2</sub> O           | 18.5 | μl |
| DNA Template(50 ng/μl)      | 1    | μl |

#### PCR Condition IDH2

|                             |      |    |
|-----------------------------|------|----|
| 10X PCR buffer              | 2.5  | μl |
| 50 mmol/L MgCl <sub>2</sub> | 1    | μl |
| 10 mmol/L dNTP mix          | 0.5  | μl |
| 25 μM Forward primer        | 0.3  | μl |
| 25 μM Reverse primer        | 0.3  | μl |
| Platinum Taq                | 0.2  | μl |
| dH <sub>2</sub> O           | 24.2 | μl |
| DNA Template(50 ng/μl)      | 1    | μl |



ตารางที่ 5 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่

(ให้ความร้อน DNA ที่สกัดจากพาราฟินบล็อก ที่ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 20 นาที ก่อนทำ PCR)

| PCR cycle        | อุณหภูมิ<br>(องศาเซลเซียส) | เวลา    |
|------------------|----------------------------|---------|
| Pre-denaturation | 94                         | 2 mins  |
| Denaturation     | 94                         | 30 secs |
| Annealing        | 64                         | 30 secs |
| Extension        | 72                         | 60 secs |
| Pre-extension    | 72                         | 10 mins |

} 45 Cycles

#### การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยกระบวนการเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำพีซีอาร์โปรดักต์ (PCR product) ที่ได้มาเข้าสู่กระบวนการเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 8 เปอร์เซ็นต์โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) เพื่อเปรียบเทียบขนาดของพีซีอาร์โปรดักต์ที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นการใช้กระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้น สำหรับแยกดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ซึ่งดีเอ็นเอนั้นมีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปสู่ด้านที่มีประจุบวก ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ไกลกว่า ดีเอ็นเอขนาดใหญ่ จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วย SYBR green 20 นาที จะทำให้สามารถมองเห็นแถบของดีเอ็นเอซึ่งเราจะทราบขนาดของดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบดีเอ็นเอกับ ladder ทำให้สามารถตรวจสอบขนาดของพีซีอาร์โปรดักต์ได้

#### ขั้นตอนการทำ Pyrosequencing

เริ่มจากการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์โปรดักต์ด้วย Biotinylated primer และแยกเป็น single-stranded template โดยใช้ streptavidin coated beads จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Pyrosequencing (Q96 ID) โดยเลือกใช้ลำดับเบส ATAGGTNGTCATGC และ ATAGGTCG/TTCATGCTT สำหรับ *IDH1* ตำแหน่ง codon 132 และลำดับเบส GGCA/GGGCACGCC และ GGCAG/T/AGCACGCCCATGG สำหรับตำแหน่ง *IDH2* codon 172.

#### หลักการเกิดปฏิกิริยาในเครื่อง Pyrosequencing

1. เพิ่มปริมาณของพีซีอาร์โปรดักต์โดยใช้ Biotinylated PCR primer และทำให้แยกเป็น single-stranded template โดยการทำให้ denaturation
2. Sequencing primer จับกับ Biotinylated single-stranded template ซึ่งมี DNA Polymerase, ATP sulfurylase, luciferase, apyrase อยู่ในปฏิกิริยารวมทั้ง adenosine 5' phosphate (APS) และ luciferin เป็นสารตั้งต้นด้วย

3. Deoxyribonucleotide triphosphate(dNTP) ตัวแรกถูกใส่เข้ามาในปฏิกิริยาและเอนไซม์ DNA polymerase เร่งปฏิกิริยาการเติม dNTP เข้าที่ Sequencing primer ถ้า dNTP ที่เติมเข้ามาเข้ากันได้กับ DNA template ปฏิกิริยาก็จะปลดปล่อย Pyrophosphate (PPi) ออกมา
4. ในสถานะที่มี APS เอนไซม์ ATP sulfurylase จะเปลี่ยน PPi เป็น ATP ซึ่ง ATP ที่เกิดขึ้นจะจับเคลื่อนให้ Luciferase เปลี่ยน Luciferin เป็น Ox luciferin ในปฏิกิริยานี้จะทำให้เกิดแสงขึ้นโดยปริมาณแสงที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณ ATP ที่เกิดขึ้น
5. Apyrase ทำหน้าที่ย่อยสลาย dNTP และ ATP ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาหลังจากย่อยสลายสมบูรณ์แล้ว dNTP ตัวใหม่จะถูกเติมลงไปเพื่อทำปฏิกิริยาต่อไป
6. การเติม dNTPs ตัวต่อไปยังคงดำเนินต่อไป สายดีเอ็นเอถูกสร้างให้ยาวขึ้น ลำดับเบสของดีเอ็นเอ จะแสดงอยู่ในรูปของ signal peaks

ตารางที่ 6 แสดงลำดับไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับเบสที่ใช้ในการทำ Pyrosequencing

| Sequencing Primer | Sequence           |
|-------------------|--------------------|
| IDH1-PySeq        | TGGGTA AACCTATCATC |
| IDH2-PySeq        | AAGCCCATCACCATT    |

### ขั้นตอนการทำ Pyrosequencing

1. เตรียม Binding buffer mix และ ดูด Binding buffer mix 60  $\mu$ l ใส่ใน PCR plate (Binding buffer mix)

Binding Buffer 40  $\mu$ l

Milli Q 17  $\mu$ l

Sepharose beads 3  $\mu$ l

2. ดูด PCR product 20  $\mu$ l ลงใน PCR plate ติดสติ๊กเกอร์แล้วจึงปิด PCR plate

3. นำ 96 PCR plate ไปเขย่า ที่ 1,400 rpm 10 นาที

4. เตรียม Annealing buffer mix และ ดูด Annealing buffer mix 40  $\mu$ l ใส่ใน Pyro low plate (Annealing buffer mix)

Annealing buffer 33.6  $\mu$ l

Sequencing primer 6.4  $\mu$ l

5. เมื่อเขย่า PCR plate ครบ 10 นาที วาง plate ลงบน Station ที่ตำแหน่ง PCR plate

6. ยก Probe วางลงบน PCR plate

7. นำ Probe จุ่มลงใน 70% ethanol 5 วินาที ยกขึ้นตั้งฉาก 5 วินาที

8. นำ Probe จุ่มลงใน Denature buffer 5 วินาที ยกขึ้นตั้งฉาก 5 วินาที
9. นำ Probe จุ่มลงใน Washing buffer 10 วินาที ยกขึ้นตั้งฉาก 10 วินาที
10. ยก Probe ขึ้น เล็งปลาย Probe ให้ตรงกับ Pyro low plate ปิด pump
11. จุ่ม Probe ลงใน Pyro low plate เขย่า 10 วินาที
12. เติม Enzyme, Substrate และ Nucleotide ลงใน Cartridge
13. วาง Pyro low plate และ Cartridge ลงในเครื่อง Q96 ID กด Run
14. โปรแกรมจะแปลผลการกลายพันธุ์ด้วย software ผลที่ได้จะออกมาในรูปแบบกราฟ

Pyrogram

### 3.7 การเก็บข้อมูลการวิจัย (Data collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลจากแผนกพยาธิวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผู้เก็บข้อมูล คือ ผู้ดำเนินงานวิจัยและผู้บันทึกข้อมูล คือ ผู้ดำเนินการวิจัย

การเก็บข้อมูลและบันทึกใน case record form ภาคผนวก

1. ค้นหาผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดีทั้งชนิดภายในตับและชนิดภายนอกตับ เดือน มกราคม พ.ศ. 2559- กันยายน พ.ศ. 2559

2. เก็บรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยที่เข้าได้กับ inclusion criteria โดยทำการทบทวนประวัติพื้นฐานของผู้ป่วยแยกกลุ่มผู้ป่วยออกเป็น มะเร็งท่อน้ำดีชนิดในตับ และผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิดนอกตับ โดยอาศัยประวัติทางรังสีวินิจฉัย ตามเกณฑ์กรณีไม่แน่ใจไม่สามารถแยกได้ มีการปรึกษาเป็นรายเคสกับรังสีแพทย์ ช่วงเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2559- ธันวาคม พ.ศ. 2559

3. นำชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่เข้ากับ inclusion criteria มาตรวจหาการกลายพันธุ์ ช่วงเดือน มกราคม พ.ศ.2560

4. ทบทวนอาการและอาการแสดง ประวัติการรักษา และสถานภาพการมีชีวิต ลงในแบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วยโดยผู้วิจัยเป็นผู้รวบรวม ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ.2560

### 3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลการวิจัย (Data analysis)

งานวิจัยนี้ได้คำนวณอัตราการพบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* โดย ใช้ค่าสถิติในการวิเคราะห์ดังนี้

1. การวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานและตัวแปรที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพเช่นลักษณะทางประชากรวิเคราะห์โดยหาความถี่และร้อยละจากนั้นจะนำเสนอข้อมูลในรูปแบบตาราง แผนภูมิวงกลม

2. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณ (quantitative data) เช่น อายุ ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์โดยหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่ามัธยฐานและค่าพิสัย แล้วนำข้อมูลมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มด้วย Independent T-test และ Chi-square test

3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* และลักษณะทางพยาธิวิทยาคลินิก วิเคราะห์โดยใช้ Independent T-test และ Chi-square test และ Fisher's exact test

4. การวิเคราะห์เปรียบเทียบทางคลินิกและระยะการรอดชีวิตโดยรวมตามเกณฑ์การนับระยะเวลารอดชีวิตในขั้นตอนการวิจัย ในกลุ่มตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ ของยีน *IDH1* และ *IDH2* และกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* และ *IDH2* วิเคราะห์โดยใช้ Kaplan- Meier curve were plotted และ log rank test ระดับนัยสำคัญที่ .05



## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 ลักษณะพื้นฐานประชากรที่ศึกษา (Baseline characteristics)

จากการรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้รับการรักษาด้วยการผ่าตัดหรือได้รับการตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างร่วมกับมีภาพทางรังสีวินิจฉัย เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีชนิดทั้งชนิดภายในตับและชนิดภายนอกตับ ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ.2552 ถึง 31 ธันวาคม พ.ศ.2557

จากฐานข้อมูลการลงทะเบียนโรค ICD10 รหัส C22.0 C22.1 C22.9 C24.0 C24.1 และ C24.9 ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มีจำนวนทั้งสิ้น 1207 คน แต่เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์การคัดเลือกศึกษามีจำนวน 85 คน โดยผู้ป่วยที่คัดออกจากการศึกษา 28 คน ด้วยเหตุผลคือไม่สามารถหาชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาเพื่อมาใช้ในการศึกษาหรือไม่มีภาพรังสีวินิจฉัยก่อนการรักษาภายหลังได้ผู้ป่วยที่มีทั้งชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาและมีภาพรังสีวินิจฉัยจำนวน 57 คน และมี ดีเอ็นเอภายหลังการสกัดเพียงพอต่อการตรวจ Pyrosequencing จำนวนทั้งหมด 50 คน

ลักษณะพื้นฐานของประชากรที่ศึกษาทั้ง 50 คน แบ่งเป็นมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับจำนวน 23 คน ประกอบไปด้วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนล่าง(distal common bile duct) 5 คนและ มะเร็งขั้วตับ (hilar) 18 คนมีอายุเฉลี่ย 59.35 ปี เป็นมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับจำนวน 27 คน อายุเฉลี่ย 59.56 ปี ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 11คน คิดเป็นร้อยละ 47.8 และจากภาคอื่น 12คน คิดเป็นร้อยละ 52.2 ส่วนมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับพบว่าผู้ป่วยมีภูมิลำเนาที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 6 คนคิดเป็นร้อยละ 22.2 และภาคอื่น 21 คน คิดเป็นร้อยละ 77.8 โดยภูมิลำเนาที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีแนวโน้มพบการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับที่แตกต่างกับภาคอื่น โดยค่านัยสำคัญทางสถิติ  $p=0.054$  ดังแสดงในตารางที่ 7

ชิ้นเนื้อจากมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับได้มาจากการผ่าตัด hepatectomy จำนวน 18 ราย 2 รายได้มาจากการผ่าตัด wedge liver biopsy ชิ้นเนื้อจากมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับได้มาจากการผ่าตัด hepatectomy 17 ราย 5 ราย มาจากการการผ่าตัด whipple's operation

จากการศึกษาขนาดของก้อนมะเร็งพบว่ามะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับมีขนาดก้อนมะเร็งเฉลี่ยที่ 4 เซนติเมตรในขณะที่ก้อนมะเร็งท่อน้ำดีในตับมีขนาดใหญ่กว่า ขนาดเฉลี่ย 8 เซนติเมตรโดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติที่  $p=0.006$  โดย histologic grading เป็น well differentiated , moderated differentiated และ poorly differentiated มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับเป็น 16 คนคิดเป็นร้อยละ 69.6 , 5 คน คิดเป็นร้อยละ 21.7 และ 1 คนคิดเป็นร้อยละ 4.3 และมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับเป็น 12

คนคิดเป็นร้อยละ48, 9 คนคิดเป็นร้อยละ36 และ 1คนคิดเป็นร้อยละ 4 ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างของระยะโรค ในมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ พบ Perineural invasion ในทั้งมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับร้อยละ 65 และ ร้อยละ 44.4 ตามลำดับโดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่พบ lymphovascular invasion ได้น้อยกว่า ในทั้งมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับร้อยละ 17.4 และ ร้อยละ 26.6 ตามลำดับ

เมื่อตรวจการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลืองพบว่ามะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับพบต่อมน้ำเหลือง 8 คน คิดเป็นร้อยละ 34.8 ในขณะที่มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับพบการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง 9 คนคิดเป็นร้อยละ 34.6 ทั้งนี้การแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลืองพบว่ามะเร็งท่อน้ำดีทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเป็นระยะที่4 (advance stage) จำนวน9คนคิดเป็นร้อยละ 39.1 ในมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ และจำนวน 16 คน คิดเป็นร้อยละ59.2 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2 พบว่าจากกลุ่มตัวอย่าง 50 คน พบการกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2 จำนวน18 คน โดยแบ่งเป็นการกลายพันธุ์ 7 คนในมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ และพบการกลายพันธุ์ 11 คน ในมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับโดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในมะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ

(Clinical Feature with Cholangiocarcinoma and Comparison between Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Extrahepatic Cholangiocarcinoma)

| Feature                  | Extrahepatic<br>Cholangiocarcinoma<br>N=23 | Intrahepatic<br>Cholangiocarcinoma<br>N=27 | p-value |
|--------------------------|--|--|---------|
| Age 59.46 years ( 28-83) | 59.35 (28-79)                              | 59.56(38-83)                               | P=0.953 |
| <b>Sex</b>               |  |  |         |
| Male                     | 15(62.5%)                                  | 15 (55.6%)                                 | P=0.343 |
| Female                   | 8 (34.8%)                                  | 12 (44.4%)                                 |         |
| <b>Hometown</b>          |  |  |         |
| Northeast                | 11(47.8%)                                  | 6(22.2%)                                   | P=0.054 |
| Other                    | 12(52.2%)                                  | 21(77.8%)                                  |         |

ตารางที่ 7 (ต่อ)

| Feature                           | Extrahepatic<br>Cholangiocarcinoma<br>N=23 | Intrahepatic<br>Cholangiocarcinoma<br>N=27 | p-value  |
|-----------------------------------|--|--|----------|
| Size (cms) 6.1 cms (1.5-14)       | 4(1.5-8)                                   | 8(3-14)                                    | P=0.006  |
| <b>Grade</b>                      |  |  |          |
| Well diff                         | 16(69.6%)                                  | 12(48.0%)                                  | P=0.352  |
| Moderate diff                     | 5(21.7%)                                   | 9(36.0%)                                   |          |
| Poorly diff                       | 1 (4.3%)                                   | 1 (4.0%)                                   |          |
| Non diff                          | 1 (4.3%)                                   | 3(12.0%)                                   |          |
| Not Report                        | -  | 2  |          |
| <b>PNI</b>                        |  |  |          |
| No                                | 3(13.0%)                                   | 3(11.2%)                                   | P=0.233  |
| Yes                               | 15(65.2%)                                  | 12(44.4%)                                  |          |
| not report                        | 5(27.1%)                                   | 12(44.4%)                                  |          |
| <b>LVI</b>                        |  |  |          |
| No                                | 13 (56.5%)                                 | 7 (26.0%)                                  | P= 0.086 |
| Yes                               | 4(17.4%)                                   | 7(26.0%)                                   |          |
| not report                        | 6(26.1%)                                   | 13(48.0%)                                  |          |
| <b>Lymph Node</b>                 |  |  |          |
| No                                | 15(65.2%)                                  | 10(37.0%)                                  | P=0.012* |
| Yes                               | 8(34.8%)                                   | 9(33.4%)                                   |          |
| No dissect                        | 0(0%)                                      | 8 (29.6 %)                                 |          |
| <b>Stage</b>                      |  |  |          |
| Stage1                            | 1(4.3%)                                    | 3(11.1%)                                   | P=0.289  |
| Stage2                            | 8(34.8%)                                   | 3(11.1%)                                   |          |
| Stage3                            | 5(21.7%)                                   | 5(18.5%)                                   |          |
| Stage4                            | 9(39.1%)                                   | 16(59.2%)                                  |          |
| <b>IDH mutation status</b>        |  |  |          |
| IDH1/2 mutation<br>N=18 (36%)     | 7(30.4%)                                   | 11(40.7%)                                  | P=0.323  |
| No IDH1/2 mutation<br>N= 32 (64%) | 16(69.6%)                                  | 16(59.3%)                                  |          |

#### 4.2 การกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2

จากจำนวนชิ้นเนื้อตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี 50 คน มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* จำนวน 18 คน คิดเป็นร้อยละ 36 เมื่อแยกตรวจวิเคราะห์ พบว่ามีกลายพันธุ์ที่ *IDH1* จำนวน 1 คน และกลายพันธุ์ที่ *IDH2* จำนวน 17 คน จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่ามะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีภายในตับมีแนวโน้มของการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* มากกว่ามะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีภายนอกตับ แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่มี ความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ

การกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* พบเพียง 1 คนจากมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีภายในตับโดยมีการกลายพันธุ์ที่ ตำแหน่ง R132CSG ดังแสดงในตารางที่ 8 ในขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* ตำแหน่ง R172G พบการกลายพันธุ์จำนวน 15 คน คิดเป็นร้อยละ 88 โดยอุบัติการณ์การเกิดกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* ไม่แตกต่างกันในมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีภายนอกตับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* และ *IDH2* ในขั้นตอนการทำ

*Pyrosequencing*

| IDH mutation              | Extrahepatic<br>N= 7 /23 | Intrahepatic<br>N= 11/27 | P value |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------|
| <b>IDH1 N= 1 (5%)</b>     |                          |                          |         |
| R132L                     | -                        | -                        | NA      |
| R132CSG                   |                          | 1(4%)                    | P=0.556 |
| <b>IDH 2 N = 17 (95%)</b> |                          |                          |         |
| R172KM                    |                          | 2(7.4%)                  | P=0.298 |
| R172G                     | 7(31.8%)                 | 8(29.6%)                 | P=0.556 |

#### 4.3 ลักษณะพยาธิสภาพทางคลินิกของผู้ป่วยเมื่อจำแนกตามการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* และ *IDH2*

จากจำนวนชิ้นเนื้อตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดี 50 คน มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* จำนวน 18 คนคิดเป็นร้อยละ 36 ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* จำนวน 32 คนคิดเป็นร้อยละ 64 ซึ่งผู้ป่วยที่มีภูมิลาเนาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีแนวโน้มของการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* มากกว่าภาคอื่นของประเทศ  $p=0.054$

เมื่อพิจารณาขนาดของก้อนมะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* พบว่ามีขนาดก้อน 7.89 เซนติเมตร โตกกว่ามะเร็งเรื้อรังท่อน้ำดีที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่มีขนาด 5.27 เซนติเมตร ตามลำดับ



อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p = 0.01$  โดยไม่พบความแตกต่างการกลายพันธุ์ระหว่างท่อน้ำดีภายในตับ และท่อน้ำดีภายนอกตับ  $p = 0.323$  ดังแสดงในตารางที่ 9

การตรวจพบ perineural invasion และ lymphovascular invasion รวมถึงการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง ระยะของโรคเมื่อทำการศึกษา การกลับเป็นซ้ำ จำนวนครั้งการกลับเป็นซ้ำ และวิธีการรักษา จากข้อมูลในการศึกษานี้พบว่าปัจจัยดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่จำแนกตามการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2*

ตารางที่ 9 ลักษณะพยาธิสภาพคลินิกของผู้ป่วยเมื่อจำแนกตามการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* และ *IDH2*

| Variability<br>N = 50       | No Mutation<br>N = 32 | Mutation<br>N = 18 | p- value  |
|-----------------------------|-----------------------|--------------------|-----------|
| Age                         | 59.97 (38-81)         | 58.56(28-83)       | P=0.903   |
| Male                        | 21(70%)               | 9(30%)             | P=0.217   |
| Female                      | 11(55%)               | 9(45%)             |           |
| Extrahepatic                | 16(69.9%)             | 7(30.4%)           | P = 0.323 |
| Intrahepatic                | 16(59.3%)             | 11(40.7%)          |           |
| <b>Hometown</b>             |                       |                    |           |
| Northeast                   | 8 (47.1%)             | 9(52.9%)           | P = 0.054 |
| Others                      | 24(72.4%)             | 9(27.3%)           |           |
| Size (cms)                  | 5.27(1.5-11)          | 7.89(1.7-14)       | P=0.01    |
| <b>Grading of pathology</b> |                       |                    |           |
| Well diff                   | 20 (71.4%)            | 8 (28.6%)          | P=0.315   |
| Moderate diff               | 9 (64.3%)             | 5(35.7%)           |           |
| Poorly diff                 | 1(50%)                | 1(50%)             |           |
| Non diff                    | 2(50%)                | 2(50%)             |           |
| Not Report                  | -                     | 2                  |           |
| <b>PNI</b>                  |                       |                    |           |
| No                          | 6(100%)               | 0                  | P=0.070   |
| Yes                         | 17(63.0%)             | 10(37.0%)          |           |
| No report                   | 9(53%)                | 8(47%)             |           |
| <b>LVI</b>                  |                       |                    |           |
| No                          | 16(80%)               | 4(20%)             | P=0.094   |
| Yes                         | 6(54.5%)              | 5(45.5%)           |           |
| No report                   | 10(52.6%)             | 9(47.3%)           |           |

ตารางที่ 9 (ต่อ)

| Variability<br>N = 50          | No Mutation<br>N= 32 | Mutation<br>N = 18 | p- value |
|--------------------------------|----------------------|--------------------|----------|
| <b>Node presents</b>           |                      |                    |          |
| No                             | 20(80%)              | 5(20%)             | P= 0.078 |
| Yes                            | 8(47.1%)             | 9(52.9%)           |          |
| No dissect                     | 4(50.0%)             | 4(50.0%)           |          |
| <b>Stage</b>                   |                      |                    |          |
| Stage1                         | 3(9%)                | 1(6%)              | P=0.229  |
| Stage2                         | 10(31%)              | 1(6%)              |          |
| Stage3                         | 6(18%)               | 4(22%)             |          |
| Stage4                         | 13(42%)              | 12(66%)            |          |
| Recurrence                     | 13(61%)              | 8(39%)             | P=0.235  |
| <b>Number of recurrence</b>    |                      |                    |          |
| N=1                            | 8(72%)               | 3(28%)             | P=0.259  |
| N=2                            | 3(50%)               | 3(50%)             |          |
| N=3                            | 1(34%)               | 2(66%)             |          |
| <b>Post treatment</b>          |                      |                    |          |
| RT alone                       | 4(100%)              | 0                  | P=0.282  |
| CMT alone                      | 7(50%)               | 7(50%)             | P=0.153  |
| CCRT                           | 6(54.5%)             | 5(45.5%)           | P=0.327  |
| <b>Median overall survival</b> | 43 (15.03-71.36)     | 15.3(8.88-21.7)    | P=0.08   |

#### 4.3 ลักษณะพยาธิสภาพทางคลินิกของผู้ป่วยเมื่อจำแนกตามการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1* และ *IDH2*

จากจำนวนชิ้นเนื้อตัวอย่างของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 50 คน มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* จำนวน 18 คน คิดเป็นร้อยละ 36 ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* จำนวน 32 คน คิดเป็นร้อยละ 64 ซึ่งผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีแนวโน้มของการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* มากกว่าภาคอื่นของประเทศ  $p=0.054$

เมื่อพิจารณาขนาดของก้อนมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* พบว่ามีขนาดก้อน 7.89 เซนติเมตร โทกว่ามะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่มีขนาด 5.27 เซนติเมตร ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p= 0.01$  โดยไม่พบความแตกต่างการกลายพันธุ์ระหว่างท่อน้ำดีภายในตับและท่อน้ำดีภายนอกตับ  $p=0.323$  ดังแสดงในตารางที่ 9

การตรวจพบ perineural invasion และ lymphovascular invasion รวมถึงการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง ระยะของโรคเมื่อทำการศึกษา การกลับเป็นซ้ำ จำนวนครั้งการกลับเป็นซ้ำ และวิธีการการรักษา จากข้อมูลในการศึกษานี้พบว่าปัจจัยดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่จำแนกตามการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2*

ตารางที่ 10 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลตัวแปรที่ส่งผลต่อการรอดชีพโดยรวม

Univariate analysis of Overall Survival in Cholangiocarcinoma patients by Cox proportional Hazards model

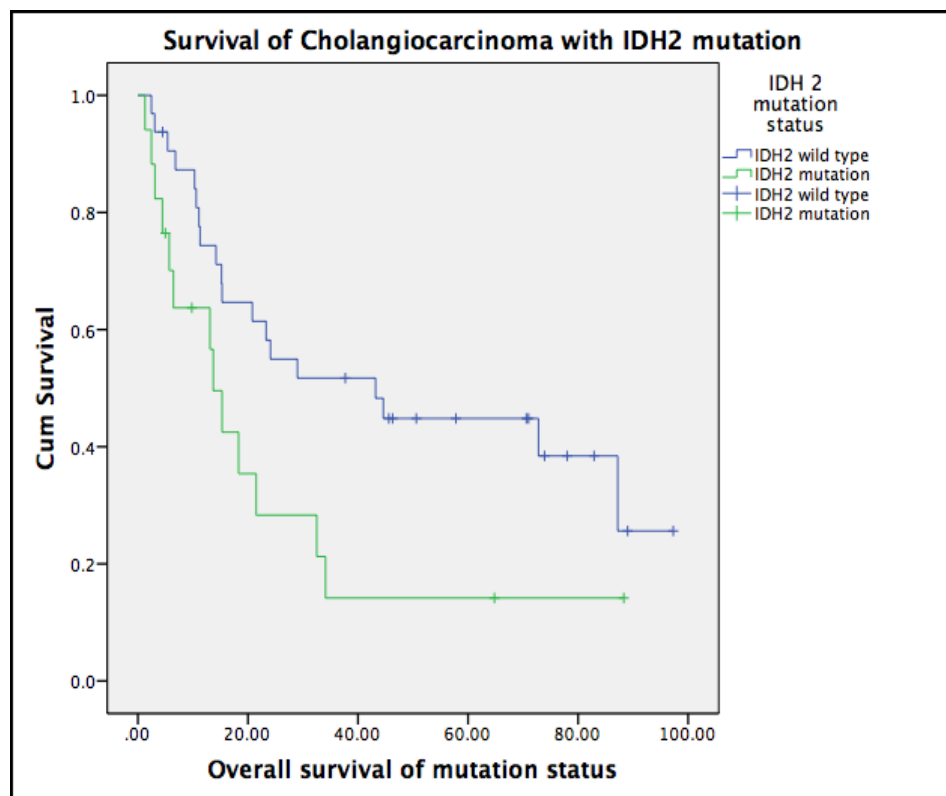
| Variables                      | Univariate Analysis   |              |         |
|--------------------------------|-----------------------|--------------|---------|
|                                | Hazards ratio<br>(HR) | 95% CI       | P-value |
| IDH1/2 mutation vs No Mutation | 0.322                 | 0.137-0.756  | 0.045   |
| IDH1 mutation vs No mutation   | 21.634                | 0.005-94285  | 0.472   |
| IDH2 mutation vs No mutation   | 0.466                 | 0.228-0.953  | 0.037   |
| Intra-CCA vs Extra-CCA         | 0.494                 | 0.293-1.148  | 0.136   |
| Grading G1&2 vs G3             | 2.66                  | 0.289-24.524 | 0.886   |
| Tumor Stage 1&2 vs 3&4         | 0.229                 | 0.029-3.140  | 0.315   |

#### 4.4 การกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* กับการพยากรณ์โรค

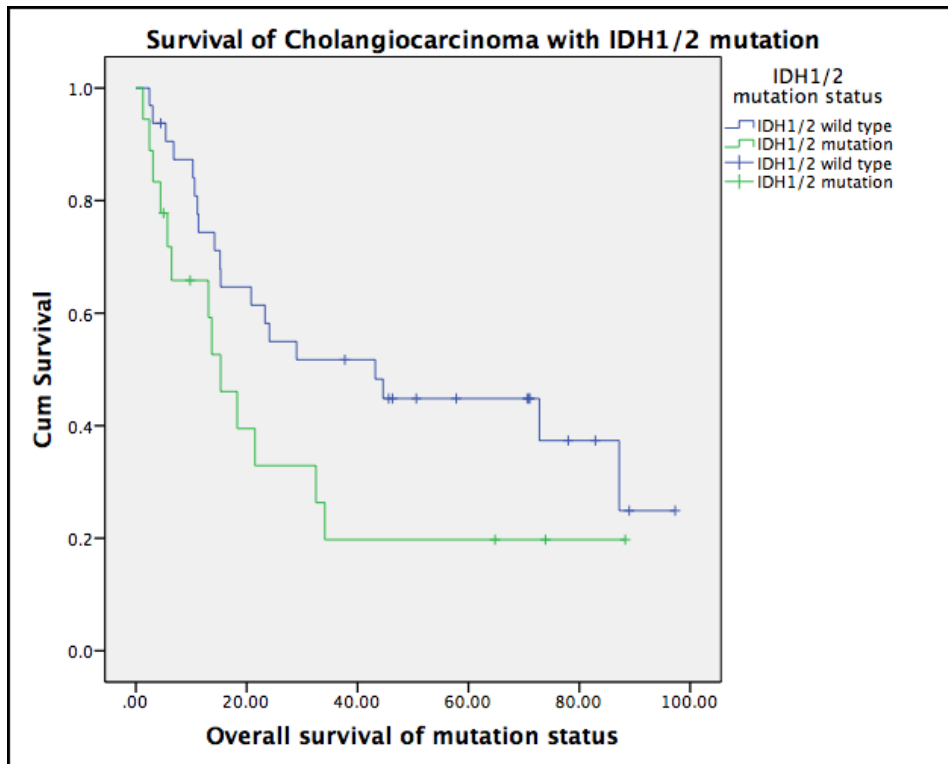
กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* จำนวน 18 คน มีค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตโดยรวม 15.3 เดือนซึ่งน้อยกว่า ค่ามัธยฐานของการรอดชีวิตของผู้ป่วยที่ไม่มีกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ที่ 43 เดือน แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p=0.08$  แสดงในตารางที่ 9

จากการศึกษานี้เมื่อวิเคราะห์ตัวแปรที่คาดว่าส่งผลต่อการรอดชีพโดยรวมดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าตัวแปรที่ส่งผลต่อการรอดชีพโดยรวมในการศึกษานี้ได้แก่การกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* และแยกเฉพาะการกลายพันธุ์ *IDH2* โดยมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P=0.045$  และ  $P=0.037$  ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วย Kaplan Meier พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* จะมีอัตราการรอด

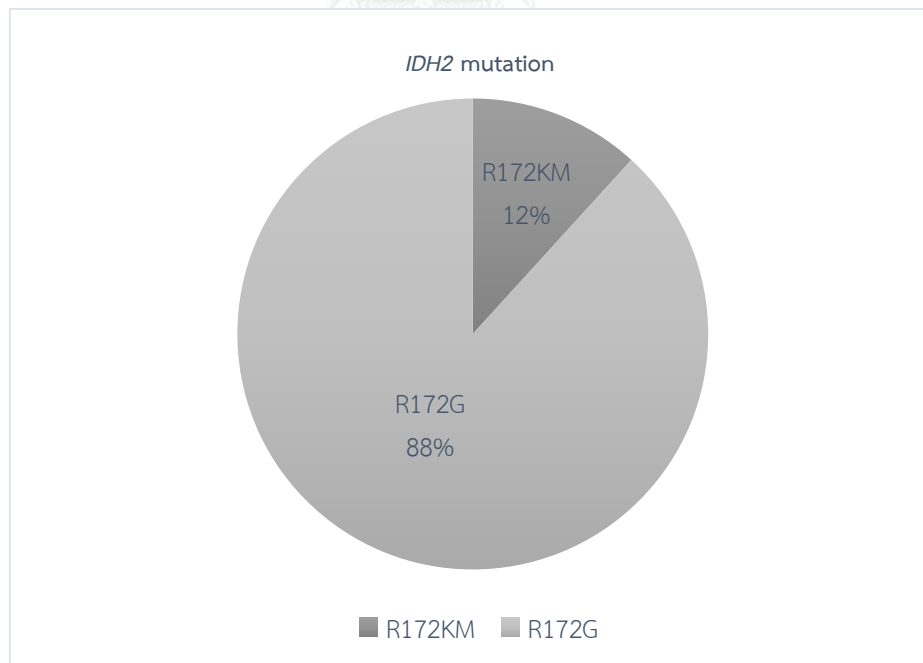
ชีวิตโดยรวมน้อยกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p=0.032$  ดังแสดงในรูปที่ 14 Median survival *IDH2* WT vs *IDH2* mutation 43.2 (95% CI 15.03-71.3) vs 13.7 (95% CI 9.8- 17.5) months.  $P=0.032$  ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการรอดชีพโดยรวมของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ที่น้อยกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ดังแสดงรูปภาพที่ 15 Median survival *IDH1/2* WT vs *IDH1/2* mutation 43 (95%CI 15-71.3) vs 15.3 (95% CI 9.8-176) months.  $P=0.08$



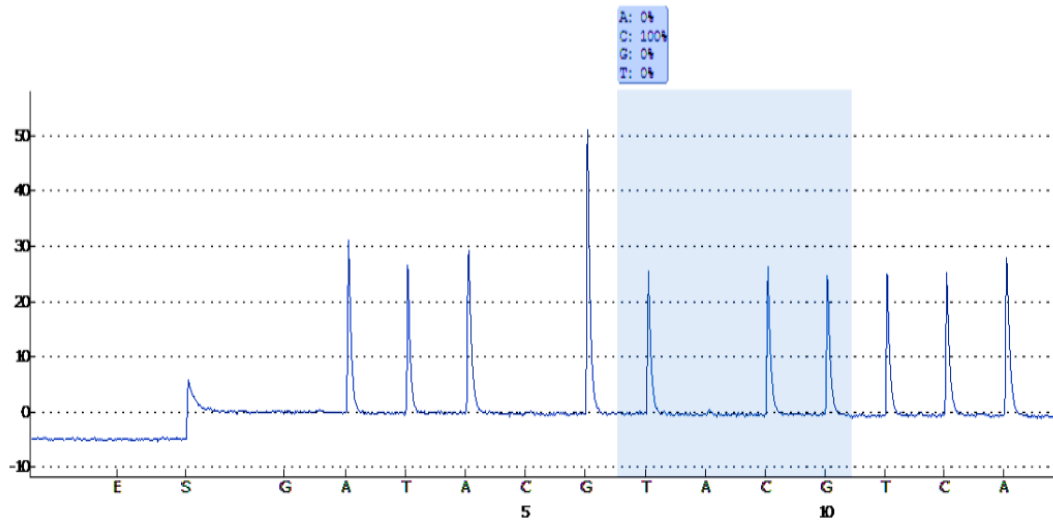
รูปภาพที่ 14 ระยะเวลาการรอดชีพโดยรวมในการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2*



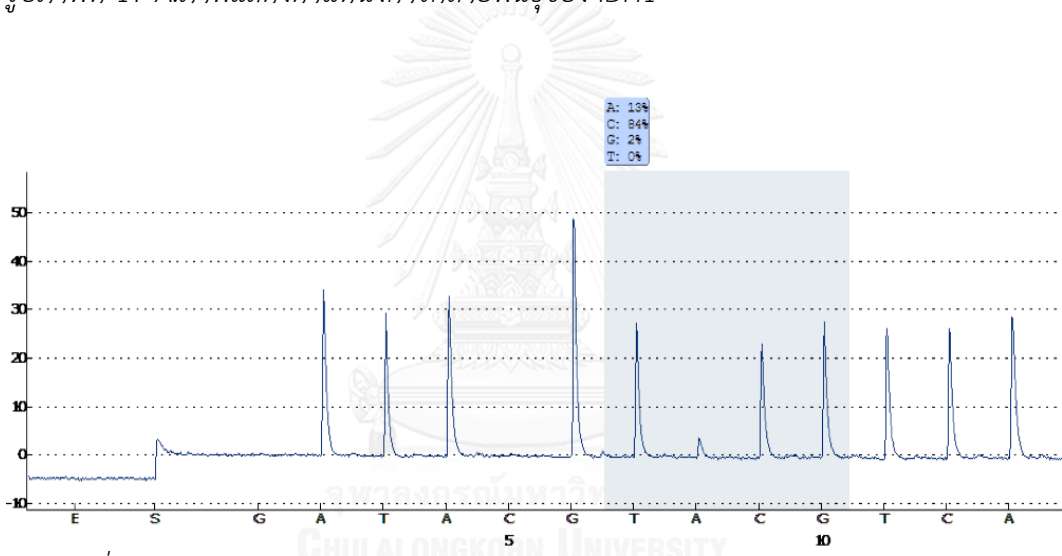
รูปภาพที่ 15 ระยะเวลาการรอดชีพโดยรวมในการกลายพันธุ์ของยีน IDH1/2



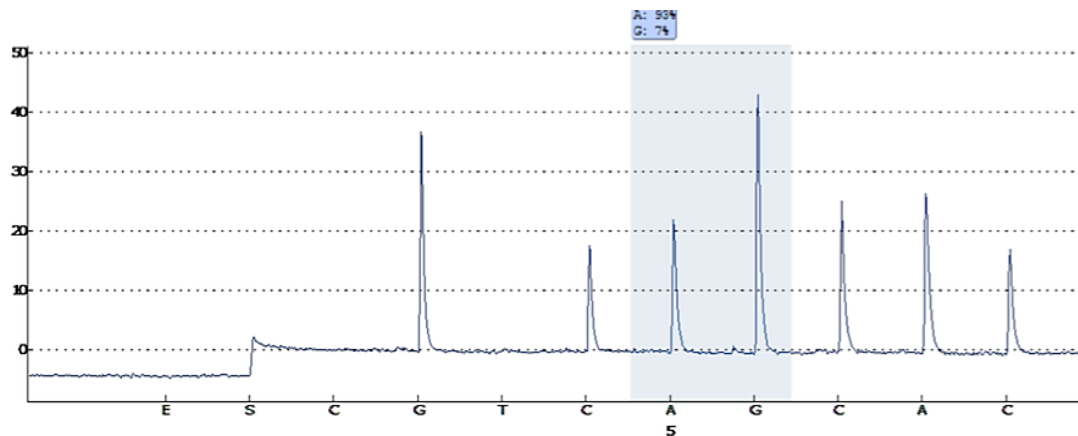
รูปภาพที่ 16 แสดงอัตราส่วนร้อยละตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีน IDH2



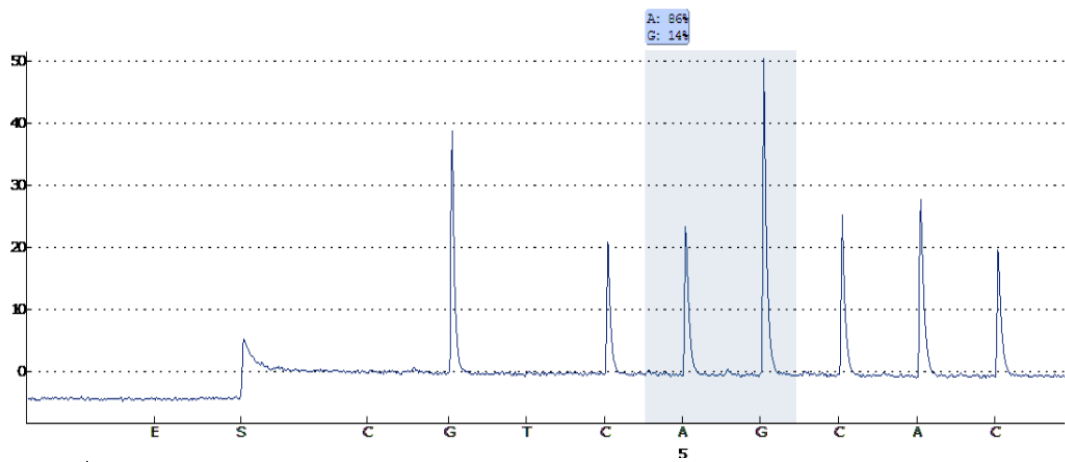
รูปภาพที่ 17 A.ภาพแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ IDH1



รูปภาพที่ 18 B.ภาพแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ IDH1



รูปภาพที่ 19 A.ภาพแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ IDH2



รูปภาพที่ 20 B.ภาพแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ IDH2



## บทที่ 5

### อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้พบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* มะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยไทย จำนวน 18 คน คิดเป็นร้อยละ 36 จากคนไข้ทั้งหมด 50 คน โดยเป็นการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* มากกว่ายีน *IDH1* คิดเป็นร้อยละ 95 และร้อยละ 5 ตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างของการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชนิดของมะเร็งท่อน้ำดีแยกมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับและมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ

การศึกษาก่อนหน้านี้ พบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ร้อยละ 7-23<sup>(37,38,39)</sup> จากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทั้งหมด โดยการกลายพันธุ์พบมากในมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ และพบได้น้อยหรือไม่พบในมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ<sup>(37,38)</sup> โดยการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ที่พบได้บ่อยได้แก่<sup>(27,37)</sup> ยีน *IDH1* ที่ตำแหน่ง R132L และตำแหน่ง R132 CSG และยีน *IDH2* ที่ตำแหน่ง R172KM R172G ซึ่งการศึกษปัจจุบันพบความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* มากกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ค่อนข้างมาก และส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* แบบ R172G และพบทั้งในมะเร็งท่อน้ำดีภายในและภายนอกตับพอๆ กัน ดังแสดงในตารางที่ 11 ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ในมะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบการศึกษาก่อนหน้านี้และการศึกษาปัจจุบัน

ตารางที่ 11 แสดงอัตราการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* เปรียบเทียบในการศึกษานี้

| การศึกษา                                   | Kipp<br>และคณะ                 | Darrell<br>และคณะ             | Waraporn<br>และคณะ             | การศึกษานี้                    |
|--|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>IDH1/2</i><br>mutation<br>incidence (%) | 22.3%<br>N=21 (94<br>specimen) | 14.5%<br>N=9 (62<br>specimen) | 7.2%<br>N=15<br>(209 specimen) | 36%<br>N=18<br>(50 specimen)   |
| <b>ตำแหน่งการกลายพันธุ์</b>                |                                |                               |                                |                                |
| Intrahepatic<br>CCA                        | 28%<br>N=19<br>(67 specimen)   | 23%<br>N=9<br>(40 specimen)   |                                | 40.7%<br>N=11<br>(27 specimen) |
| Extrahepatic<br>CCA                        | 7%<br>N=2<br>(27 specimen)     | 0%<br>N=22<br>(22 specimen)   |                                | 30.4%<br>N=7<br>(23 specimen)  |



ความแตกต่างของผลการศึกษานี้เปรียบเทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ เบื้องต้นผู้วิจัยสันนิษฐานว่า อาจสามารถอธิบายจากเรื่องของเทคนิคการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ที่แตกต่างกัน หรือ จากการที่กลุ่มประชากรที่ศึกษาแตกต่างกัน

การศึกษานี้พบความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* แบบ R172G ถึงร้อยละ 30 โดยใช้วิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ด้วยเทคนิค pyrosequence โดยเครื่อง Q96 ID โดยใช้ primer เพื่อครอบคลุมการตรวจพบการกลายพันธุ์ของ ยีน *IDH1/2* ตามที่รายงานโดย Darell และคณะ<sup>(37)</sup> ดังนั้น โอกาสที่จะตรวจพบการกลายพันธุ์แบบที่แตกต่างออกไป โดยที่ตรวจไม่พบในการศึกษาของ Darell และคณะ<sup>(37)</sup> คงเป็นไปได้ยาก โดยเฉพาะตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* ที่ codon 172 ก็เป็นตำแหน่งที่มีรายงานในการศึกษาของ Darell และคณะ<sup>(37)</sup> เพียงแต่พบได้น้อยกว่าการศึกษาปัจจุบันมาก ส่วนการศึกษาที่ทำในมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ผู้วิจัยใช้การตรวจโดยเทคนิค Exome sequencing โดยตรวจการผิดปกติของหลายยีนพร้อมกัน รวมทั้งยีน *IDH1/2* ซึ่งเทคนิคมักจะมีความไวค่อนข้างสูง และมักจะสูงกว่าการตรวจเฉพาะยีนด้วยวิธี pyrosequencing แบบในการศึกษาปัจจุบัน ดังนั้น เทคนิคการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ที่แตกต่างกันไม่น่าจะสามารถอธิบายความแตกต่างของผลการศึกษาได้

ส่วนความแตกต่างของประชากรที่ศึกษา ซึ่งในการศึกษานี้ทำเฉพาะในผู้ป่วยไทย ดังที่ทราบกันว่า ผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดี โดยเฉพาะในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ มักสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ แตกต่างจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีในแถบอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Waraporn และคณะ<sup>(38)</sup> ซึ่งศึกษาเฉพาะมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยที่มีหลักฐานยืนยันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมาก่อน พบการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* น้อยกว่าการศึกษาในประเทศตะวันตกมาก จึงเป็นไปได้ยากที่ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ที่สูงมากในการศึกษานี้ จะเป็นผลมาจากความสัมพันธ์ของมะเร็งท่อน้ำดีกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ โดยในการศึกษาปัจจุบันไม่ได้มีการตรวจยืนยันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเห็นว่า ผลการศึกษานี้ควรต้องมีการตรวจยืนยันผลการศึกษาอีกครั้ง ด้วยวิธีการตรวจมาตรฐานอื่น ๆ ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน เช่น Sanger sequencing เป็นต้น ส่วนการไม่พบความแตกต่างของความชุกในการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ระหว่างมะเร็งท่อน้ำดีภายในและภายนอกตับก็คงต้องมีการตรวจยืนยันอีกครั้งก่อน ด้วยเหตุผลแบบเดียวกัน

เมื่อพิจารณาการรอดชีพโดยรวมพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH2* มีอัตราการรอดชีพต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P=0.032$  แต่อย่างไรก็ตาม ต้องใช้ความระวังในการแปลผลเพราะว่าเป็นการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้เพียงการวิเคราะห์ตัวแปร univariate analysis อีกทั้งเป็นการศึกษา retrospective analysis ที่มีจำนวนตัวอย่างการศึกษาน้อย โดยไม่ได้แยกระยะของโรค มีโอกาสที่จะมีตัวรบกวน(confounding factor) และอคติ

(bias)ในงานวิจัยได้มาก ซึ่งอาจจะไม่สามารถสรุปในการศึกษาขณะนี้ได้ และเมื่อพิจารณาปัจจัยอื่น เช่นระยะโรค (grading) ของมะเร็งท่อน้ำดี การตรวจพบการลุกลามของมะเร็งไปยังเส้นประสาท (perineural) และเส้นเลือด (lymphovascular) รวมถึงการแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง หรือระยะของโรค (staging) เมื่อทำการศึกษา การกลับเป็นซ้ำ และวิธีการรักษา จากข้อมูลในการศึกษานี้พบว่า ปัจจัยดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการกลายพันธุ์ สองคลัสต์กับการศึกษาของ Kipp และ คณะ<sup>(39)</sup> ก่อนหน้าที่ไม่พบความแตกต่างทางด้านพยาธิวิทยาคลินิกในระหว่างกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* กลุ่มที่ไม่มีกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2*

### ข้อจำกัดของการศึกษา

1. จำนวนตัวอย่างที่นำมาศึกษาไม่เป็นไปตามที่วางแผนไว้ อาจทำให้ผลการศึกษามีความคลาดเคลื่อนได้
2. การศึกษานี้เป็นการศึกษาการกลายพันธุ์แบบย้อนหลังมีปัจจัยหลายประการที่อาจจะส่งผลต่อการพยากรณ์โรคบางอย่างที่ไม่ได้มีการบันทึกไว้
3. ชิ้นเนื้อนอกเหนือจากการผ่าตัด hepatectomy หรือ Whipple's operation ในการศึกษานี้ บางส่วนได้มาจากการbiopsy ซึ่งมีปริมาณน้อยอาจจะไม่เพียงพอต่อการนำมาศึกษา

### ข้อเสนอแนะในการศึกษา

การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นในกลุ่มประชากรของคนไทยเพื่อทราบอัตราการกลายพันธุ์ของยีน *IDH1/2* ทั้งนี้ อาจยังไม่สะท้อนภาพรวมของประชากรในทั้งประเทศได้และยังมีความแตกต่างกับการศึกษามาก่อนหน้ามาก ซึ่งทำให้ผลการศึกษาที่น่าสนใจมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยยังไม่สามารถอธิบายถึงความแตกต่างนี้ได้ ดังนั้นการตรวจยืนยันผลการศึกษาดังกล่าวด้วยวิธีอื่นข้างต้นเป็นสิ่งจำเป็นในการศึกษานี้ เพราะหากผลยืนยันสอดคล้องตามผลการศึกษาเดิมว่ามีการกลายพันธุ์ยีน *IDH1/2* พบมากในคนไทยจริง การศึกษาวิจัยโดยใช้ *IDH inhibitor* กับคนไข้กลุ่มดังกล่าวเพื่อดูการตอบสนองต่อยาจึงอาจจะมีประโยชน์ในอนาคตสำหรับการพัฒนาใช้ *IDH inhibitor* ต่อไป เพราะจากข้อมูลในปัจจุบันพบว่า มีการวิจัยคลินิก ระยะที่ 1/2 ที่เลือกใช้ *IDH (IDH inhibitor) IDH1 (AGI-120), IDH2 (AG881)* พบว่ามีสัญญาณสามารถการยับยั้งการทำงานของโปรตีน *IDH* ที่กลายพันธุ์ในเนื้องอกมะเร็งได้ (solid tumor)<sup>(45)</sup> และท้ายที่สุดการศึกษาเพิ่มเติมในประชากรที่มากขึ้นและมีการตรวจหาการกลายพันธุ์อื่นที่อาจจะเป็นตัวกำหนดหรือเป็นสาเหตุร่วมที่สามารถพยากรณ์ลักษณะทางคลินิกหรือธรรมชาติการดำเนินโรคเพื่อเป็นประโยชน์ในการรักษาหรือการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

## รายการอ้างอิง

1. Tushar P MJ. Cancer of Biliary tree. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Devita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principal and practice of oncology. 10 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2015.
2. Vatanasapt V UT, Mairiang EO, Pairojkul C, Chartanchachai W, Haswell-Elkins M., Cholangiocarcinoma in Northeast Thailand. *Lancet*. 1990;335:116-7.
3. Bhudhisawasdi V, Khuntikeo N, Chur-in S, Pugkhem A, Talannin C, Wongkham S. Cholangiocarcinoma: Experience of Srinagarind Hospital. *Srinagarind Med J*. 2017;27:331-9.
4. DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, et al. Cholangiocarcinoma: Thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg*. 2007;245:755-62.
5. Sripan B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24:349-56.
6. Yun KK, Woo Hk. Microsatellite instability and Mismatch repair protein expression in Intrahepatic cholangiocarcinoma. *The Korean Journal of Pathology*. 2005;39:9-14.
7. Attasara P, Khuhaprema T, Srivatanakul P, Sriplung H, editors. Cancer in Thailand: Hospital base cancer registry. Bangkok: National Cancer Institute Thailand; 2010.
8. Parkin DM, Whelan SL. Cancer Incidence in five continents volume VIII. Lyon: International agency for research on cancer; 2002.
9. Patel T. Increase incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology*. 2001.
10. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut*. 2012;61:1657-69.

11. Siqueira E, Schoen RE, Silverman W, Martin J, Robinovitz M, Weissfeld JL, et al. Detecting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastrointest Endosc.* 2002;56:40-7.
12. Levy C, Lymp J, Angulo P, Gores GJ, Larusso N, Lindor KD. The value of serum CA 19-9 in predicting cholangiocarcinoma's in patients with primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis Sci.* 2005;50:1734-40.
13. Khuntikeo N, Pugkhem A. Current Treatment of Cholangiocarcinoma. *Srinagarind Med J.* 2012;27:340-50.
14. Waraporn C, Maarja-Liisa N, ChoonKiat O, Weng KL, Simona D, Chawalit P, et al. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. *Nature Genetics.* 2013;45:1474-8.
15. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:1148-59.
16. Dang L, White DW, Gross S, Bennett DB, Bittinger AM, Driggers ME, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009;462:739-44.
17. Fujii T, Muhammad RK, Courtney DD, Johnique TA, Filip J. Targeting Isocitrate Dehydrogenase (IDH) in Cancer. *Discov Med* 2016;21:373-80.
18. Macias RI, [Internet]. Cholangiocarcinoma: Biology, Clinical Management and Pharmacological Perspectives:ISRNHematol 2014 [Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/828074>. มหาวิทยาลัย
19. Sirica AE. Cholangiocarcinoma: Molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology.* 2005;41:5-15.
20. Gores GJ. Cholangiocarcinoma: Current concepts and insights. *Hepatology.* 2003;37:961-9.
21. Sripa B, Brindley PJ, Mulvenna J, Laha T, Smout MJ, Mairang E, et al. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*-multiple pathways to cancer. *Trends parasitol.* 2012;28(395-407).
22. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11:597-610.
23. Choi BI, Lee JM. Neoplasms of the Gallbladder and Biliary Tract. In: Gore RM, Levine MS, editors. *Textbook of gastrointestinal radiology.* 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000. p. 1402-26.

24. Koichi H, Sang HL, Dushyant S. Imaging for assessment of treatment response in hepatocellular carcinoma: Current update. *Indian J Radiol Imaging*. 2015;25:121-8.
25. Klatskin G. Adenocarcinoma of the hepatic duct at its bifurcation within the port hepatic. An unusual tumor with distinctive clinical and pathological features. *Am J Med*. 1965;38:241-56.
26. Bragazzi MC, Cardinale V, Carpino G, Venere R, Semeraro R, Gentile R, et al. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk Factors. *Transl Gastrointest Cancer*. 2012;1:21-32.
27. Vincenzo C. Intra-hepatic and Extra-hepatic cholangiocarcinoma: new insight into epidemiology and risk factors. *World J Gastrointest Oncol*. 2010;2:407-16.
28. Tania MW, Katherine AM. Impact of Classification of Hilar Cholangiocarcinoma (Klatskin Tumor) on the Incidence of Intra- and Extrahepatic Cholangiocarcinoma in the United State. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98:873-5.
29. หัซซา ศรีปลั่ง. รายงานโครงการวิเคราะห์คุณภาพข้อมูลมะเร็งและศึกษาสถานการณ์โรคมะเร็งและความสัมพันธ์กับแนวโน้มและการกระจายของปัจจัยเสี่ยงจากแหล่งข้อมูลต่างๆ ในแผนพัฒนาระบบข้อมูลข่าวสารสุขภาพแห่งชาติ. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส); 2553.
30. Yen KE, Schenkein DP. Cancer-Associated isocitrate dehydrogenase mutations. *The Oncologist*. 2012;17:72-9.
31. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: Biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene*. 2010;29:6409-17.
32. Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov*. 2013;3:730-41.
33. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2010;102:932-41.
34. Icard P, Poulain L, Lincet H. Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1825:111-6.
35. Hiller K, Metallo CM. Profiling metabolic networks to study cancer metabolism. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24:60-8.

36. Lee SM, Koh HJ, Park DC, Song BJ, Huh TL, Park JW. Cytosolic NADP (+) - dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1185-96.
37. Darrell RB, Kenneth KT, Kenneth CF, Hector UL, Valeria RF, Kimberly SS, et al. Frequent Mutation of Isocitrate Dehydrogenase IDH1 and IDH2 in Cholangiocarcinoma Identified Through Broad-Based Tumor Genotyping. *Oncologist*. 2012;17:72-9.
38. Waraporn C, Maarja-Liisa N, ChoonKiat O, Weng KL, Simona D, Chawalit P, et al. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection -related bile duct cancer. *Nature Genetics*. 2013;45:1474-8.
39. Kipp BR, Voss JS, Kerr SE, Barr Fritcher EG, Graham RP, Zhang L, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*. 2012;43:1552-8.
40. Churi CR RS, Wang Y, Rashid A, Kang HC, Weatherly J, et al [Internet]. Mutation profiling in cholangiocarcinoma: Prognostic and Therapeutic Implications. *PLoS ONE* 2014 [Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0115383>.
41. Lipika G, Aparna G, Rahul AS, Valentina N, Lawrence SB, Jason EF, et al. Prognosis and Clinicopathologic Feature of Patients with Advanced Stage Isocitrate dehydrogenase (IDH) Mutant and IDH Wide-Type intrahepatic Cholangiocarcinoma. *The Oncologist*. 2015;20:1019-27.
42. Wang P, Dong Q, Zhang C, Kuan PF, Liu Y, Jeck WR, et al. Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinoma and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene*. 2013;32:3091-100.
43. Soyer P. Imaging of intrahepatic cholangiocarcinoma: 1 peripheral cholangiocarcinoma. *American roentgen ray society AJR*. 1995;165:1427-31.
44. Soyer P. Imaging of intrahepatic cholangiocarcinoma: 2 hilar cholangiocarcinoma. *American roentgen ray society AJR*. 1995;165:1433-6.
45. Fujii T, Khawaja MR, DiNardo CD, Atkins JT, Janku F. Targeting isocitrate dehydrogenase (IDH) in cancer. *Discov Med*. 2016;117:373-80.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลผู้ป่วยในงานวิจัย(case record form)

เรื่อง : การศึกษาอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 ในผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีชนิดภายในตับและมะเร็งทางเดินน้ำดีนอกตับ

Demographic and clinical data

1. No .....Age at diagnosis ..... years
2. Sex  Male  Female
3. Underlying disease  DM  HT  CKD  
 Cirrhosis alcoholic nash unknown  Hepatitis Hepatitis B Hepatitis c unknown  
 Dyslipidemia  no underlying  
 others.....
4.  no Smoking  quit smoke (light smoke)  quit smoke (heavy smoke)  
 current light smoke  current heavy smoke  no data
5.  drinking  no drink  quit
6. Date of diagnosis CCA .....  

7. ECOG performance status  0  1  2  3  4
8. Present symptoms  
 Abdominal pain  back pain  Jaundice  Ascites  Fever  
 weight loss  loss of appitize  itching  palpable mass  
 no symptom  other .....
9. Basic lab  CA19-9.....  CEA...  AFP.....



**Imaging**

Imaging Modality  Ultrasound  CT whole abdomen  MRI/MRCP  other

1. Location of tumor

Intrahepatic ...left lobe....right lobe .... Both lobe

Extrahepatic .....Hilar ..... Distal CBD ..... Other

2. Staging  cT  pT  yp

3. For intrahepatic T  1  2a  2b  3  4

4. N  0  1

5. M  0  1 .....1Liver....1Peritoneum .....1Bone.....1lymphnode.....1other

6. STAGE  1  2  3  4a  4b

7. For extrahepatic hilar CCA T  1  2a  2b  3  4

8. N  0  1  2

9. M  0  1 ....1Liver....1Peritoneum .....1Bone....1lymphnode.....1other

10. STAGE  1  2  3a  3b  4a  4b

11. For distal bile duct T  1  2  3  4

12. N  0  1

13. M  0  1 ....1Liver....1Peritoneum .....1Bone....1lymphnode.....1other

14. STAGE  1a  1b  2  3  4a  4b

### 15. Work up

1. Operation date .....

2. Treatment before operation

PVE  PTBD  Biliary stent  ERCP  TACE  noTX

3. Type of surgery

Right Hepatectomy with .....hepatojejunostomy .....roux en y  
hepaticojejunostomy .....cholecystectomy .....gastectomy .....no other

left Hepatectomy with .....hepatojejunostomy .....roux en y  
hepaticojejunostomy .....cholecystectomy .....gastectomy .....no other

liver biopsy  wedge biopsy liver

### Pathology report

1.  Extrahepatic ..... hilar..... distal CBD  Intrahepatic

2. Type of pathologic classification

adenocarcinoma ..... Nodular ..... sclerosing ..... Papillary ..... unknown .....  
not specified

other ..... squamous ..... adeno squamous ..... mucinous ..... signet clear cell  
..... undiff type ..... lymphoepithelial  not specified

3. Histologic grading

well differentiated  moderately differentiated  poorly differentiated

undifferentiated  non diag

4. Margin  R0  R1  R2  no margin

5. Node  positive site.....  negative  no node dissection

6. Molecular study  IDH1/2 mutation  no mutation

**Treatment**  no Tx

1. RT only  No  Yes if yes .....FX .

2. CMT only  No  Yes if yes

2.1  Neoadj 2.2  Adj regimen 2.3  Palliative regimen

3. CRT  yes  no

4. if use Chemotherapy Regimen is

Gem  Cis/gem  Carbo/gem  carbo/5FU  Cape/Cis  5FU/LV

Folfox  Xelox  Cape/Ox  other

5. Cycle  1  2  3  4  5  6

**Follow up outcome**

recurrence  no recurrence  PD  not evaluation

**For recurrence of disease or PD**

Diagnosis date (first recurrence Or PD) ..... Months of last TX (DFS) ..... months

Number of recurrence .....

**Site of first recurrence or PD**

Tumor bed  liver  peritoneum  pancrease  colon  lung  node

gastric  others

**Site of second time recurrence or PD**

Tumor bed  liver  peritoneum  pancrease  colon  lung  node

gastric  others

**Site of third time recurrence or PD**

Tumor bed  liver  peritoneum  pancrease  colon  lung  node

gastric  others

**Site of fourth time recurrence or PD**

Tumor bed  liver  peritoneum  pancrease  colon  lung  node

gastric  others

**Site of fifth time recurrence or PD**

- Tumor bed  liver  peritoneum  pancreas  colon  lung  node  
 gastric  others

**Treatment of post first PD or recurrent**

- RT  CMT  surgery  local Tx ..... palliative  
 CMT regimen  gem  Cis/gem  Carbo/gem  carbo/5FU  Cape/Cis  
 5FU/LV  xelox  Folfox  Cape/Ox  other  
 Cycle  1  2  3  4  5  6

**Treatment of post second time PD or recurrent**

- RT  CMT  surgery  local Tx ..... palliative  
 CMT regimen  gem  Cis/gem  Carbo/gem  carbo/5FU  Cape/Cis  
 5FU/LV  xelox  Folfox  Cape/Ox  other  
 Cycle  1  2  3  4  5  6

**Treatment of post third time PD or recurrent**

- RT  CMT  surgery  local Tx ..... palliative  
 CMT regimen  gem  Cis/gem  Carbo/gem  carbo/5FU  Cape/Cis  
 5FU/LV  xelox  Folfox  Cape/Ox  other  
 Cycle  1  2  3  4  5  6

**Treatment of post fourth time PD or recurrent**

- RT  CMT  surgery  local Tx ..... palliative  
 CMT regimen  gem  Cis/gem  Carbo/gem  carbo/5FU  Cape/Cis  
 5FU/LV  xelox  Folfox  Cape/Ox  other  
 Cycle  1  2  3  4  5  6

**Treatment of post fifth time PD or recurrent**

RT  CMT  surgery  local Tx ..... palliative

CMT regimen  gem  Cis/gem  Carbo/gem  carbo/5FU  Cape/Cis

5FU/LV  xelox  Folfox  Cape/Ox  other

Cycle  1  2  3  4  5  6

Dead date ..... time after progression ... month overall survival OS ... months

no dead time after progression..... month Time of follow up ..... months

(สิ้นสุด 31 ธ.ค. 2559)



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นพ. ภูริทัตต์ สุทธิประภา

วัน เดือน ปี เกิด 18 กรกฎาคม พ.ศ.2525 จังหวัดร้อยเอ็ด

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นักศึกษาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 2544-2550

แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลร้อยเอ็ด 2550-2551

แพทย์ใช้ทุน โรงพยาบาลพนมไพร 2551-2554

แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 2554-2556

อายุรแพทย์ประจำโรงพยาบาลร้อยเอ็ด 2556-2558

แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขามะเร็งวิทยา รพ.จุฬาลงกรณ์ 2558- ปัจจุบัน

ปริญญาและประกาศนียบัตร

แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร 2550

วุฒิปัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์ 2556

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกวิทยาลัยสมาคมมะเร็งแห่งประเทศไทย