Chulalongkorn University
Chula Digital Collections

Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)

2018

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

จิรวดี สถิตย์เรืองศักดิ์
คณะแพทยศาสตร์

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd

Part of the Medical Sciences Commons

Recommended Citation
สถิตย์เรืองศักดิ์, จิรวดี, "การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก" (2018). *Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)*. 3621.
https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/3621

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก

น.ส.จิรวดี สถิตย์เรืองศักดิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Expression of Immune-Related Signal Regulatory Protein on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Non-Small Cell Lung Cancer Patients

Miss Chirawadee Sathitruangsak

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medicine
Department of Medicine
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2018
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก
โดย	น.ส.จิรวดี สถิตย์เรืองศักดิ์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	แพทย์หญิง ดร.ชนิดา วินะยานุวัติคุณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสมนพร บุณยะรัตเวช สองเมือง)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(แพทย์หญิง ดร.ชนิดา วินะยานุวัติคุณ)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิริยาพร ฤทธิทิศ)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงภัทรพิมพ์ สรรพวีรวงศ์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จิรวดี สถิตย์เรืองศักดิ์ : การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก. (Expression of Immune-Related Signal Regulatory Protein on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Non-Small Cell Lung Cancer Patients) อ.ที่ปรึกษาหลัก : พญ. ดร.ชนิดา วินะยานุวัติคุณ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ.นพ. ดร.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร

ความเป็นมา เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงที่สัมพันธ์กับมะเร็งในร่างกาย บ่งบอกถึงการพยากรณ์โรคและผลการรักษา และอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจคัดกรองมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กได้ การศึกษานี้จัดทำเพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กเปรียบเทียบกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุม

วิธีการศึกษา ขั้นตอนที่ 1 คัดเลือกโปรตีนที่สนใจโดยใช้ข้อมูลการแสดงออกของอาร์เอ็นเอของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กจากฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจด้วยการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ ขั้นตอนที่ 3 เปรียบเทียบการแสดงของออกโปรตีนบนเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวด้วยเครื่องตรวจและวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก 30 คนและอาสาสมัครกลุ่มควบคุม 30 คน

ผลการวิจัย จากการย้อมการแสดงออกของโปรตีน 5 ชนิด ได้แก่ CLEC4A, CLEC4D, C5AR1, NLRP3 และ S100A12 พบว่าเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กมีการแสดงออกของโปรตีน CLEC4A, CLEC4D และ NLRP3 เพิ่มขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีน C5AR1 และ S100A12 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเลือดจากอาสาสมัครกลุ่มควบคุม

สรุปผลการวิจัย การแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และอาจจะเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งปอดในอนาคตได้

สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2561	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

6074004430 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: lung cancer, blood screening, peripheral blood mononuclear cells

Chirawadee Sathitruangsak : Expression of Immune-Related Signal Regulatory Protein on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. Advisor: Dr. CHANIDA VINAYANUWATTIKUN Co-advisor: Prof. Dr. APIWAT MUTIRANGURA

Background: Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) have offered potential information related to the presence of disease. Recent studies have reported the feasibility of using PBMC gene expression signature for cancer detection. In this study, we investigated whether immune-related protein expression on PBMC could discriminate between patients with and without non-small cell lung cancer (NSCLC).

Methods: This study was divided into three phases: (1) candidate protein discovery using available published data on RNA expression on PBMC in NSCLC patients; (2) protein selection and validation by immunofluorescence staining on PBMC; and (3) independent validation using flow cytometry on a set of PBMC from 30 patients with advanced stage NSCLC and 30 healthy controls.

Results: Of the panel of 5 immune-related proteins analyzed (CLEC4A, CLEC4D, C5AR1, NLRP3, and S100A12), we have observed the significantly increased expression of CLEC4A, CLEC4D and NLRP3 in NSCLC group while expression of C5AR1 and S100A12 were decreased when compared to control group.

Conclusions: Diverse immune-related protein expressions on PBMC between NSCLC patients and healthy control could be a potential non-invasive strategy of lung cancer detection in the future.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study:	Medicine	Student's Signature ....
Academic Year:	2018	Advisor's Signature ....
		Co-advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อาจารย์แพทย์หญิงดอกเตอร์ ชนิดา วินะยานุวัติคุณ ภาควิชาอายุรศาสตร์ สาขามะเร็งวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์, ศาสตราจารย์นายแพทย์ดอกเตอร์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมถึงเจ้าหน้าที่หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์และเจ้าหน้าที่ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงสมนพร บุณยะรัตเวช สองเมือง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์, รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวิริยาพร ฤทธิทิศ และรองศาสตราจารย์แพทย์หญิงภัทรพิมพ์ สรรพวีรวงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้แนวทางการวิจัยและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณเพื่อนแพทย์ประจำบ้านแพทย์ต่อยอดสาขามะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้กำลังใจและความช่วยเหลือข้าพเจ้ามาตลอด

จิรวดี สถิตย์เรืองศักดิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูปภาพ ..... ฌ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ 1

บทที่ 1 3

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 3

1.2 คำถามของการวิจัย 5

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย 5

1.4 สมมติฐาน 5

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น 5

1.6 กรอบความคิดแนววิจัย (Conceptual Framework) 6

1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย 6

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 9

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการการแก้ไข 9

บทที่ 2 10

บทที่ 3 24

3.1 รูปแบบการวิจัย 24

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย 24

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 ขนาดตัวอย่างและการคำนวณ 25
3.4 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย..... 25
3.5 การรวบรวมข้อมูล..... 34
3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย 35
3.7 การเปิดเผยข้อมูลแสดงตัวตนของผู้ป่วย 35
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)..... 35
บทที่ 4 37
4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา 37
4.2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย 37
4.3 ผลเปรียบเทียบปัจจัยที่นำมาศึกษา 39
บทที่ 5 50
5.1 อภิปรายผล..... 50
5.2 สรุปผลการวิจัย 54
5.3 ข้อดีของการศึกษานี้..... 54
5.4 ข้อด้อยของการศึกษานี้ 55
5.5 ข้อเสนอแนะ 56
บรรณานุกรม..... 57
ภาคผนวก..... 64
แบบบันทึกข้อมูลผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย 64
ประวัติผู้เขียน..... 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

*ตาราง 1 แสดงปริมาณการสูบบุหรี่** 7

ตาราง 2 แสดงระดับสมรรถภาพร่างกายโดยใช้เกณฑ์ ECOG Performance Status 8

*ตาราง 3 แสดงชนิด ปริมาณ และหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด** 14

ตาราง 4 แสดงการย้อมโปรตีนที่จำเพาะต่อยีนแต่ละชนิดของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดเปรียบเทียบกับในต่อมน้ำเหลืองที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง 29

*ตาราง 5 แสดงการแบ่งหมวดหมู่ของยีน CLEC4A, CLEC4D, C5AR1, NLRP3 และ S100A12 ในมนุษย์โฮโมเซเปียนส์ (Homo sapiens species) โดยแบ่งตาม PANTHER classification system** 30

ตาราง 6 แสดงข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ 37

ตาราง 7 แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด 43

ตาราง 8 แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ตรวจด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง 48

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปภาพ 1 แสดงกรอบความคิดแนววิจัย (Conceptual Framework) 6

รูปภาพ 2 แสดงการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด 13

รูปภาพ 3 แสดงกระบวนการควบคุมและกำจัดเซลล์มะเร็งของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย 18

รูปภาพ 4 แผนภาพเวนน์แสดงความสัมพันธ์ของจำนวนยีนที่ผิดปกติจากชุดข้อมูลไมโครแอเรย์ 4 ชุด 27

รูปภาพ 5 แสดงการแยกเซลล์จากความหนาแน่นของเซลล์โดยการปั่นแยกตัวอย่างเลือดด้วยเครื่องหมุนแยกวัตถุโดยใช้แรงเหวี่ยง 31

รูปภาพ 6 แสดงแนวทางการวิจัย 36

รูปภาพ 7 แสดงการย้อมติดแอนติบอดีของชิ้นเนื้อควบคุมบวก 39

รูปภาพ 8 แสดงการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก 40

รูปภาพ 9 แสดงเม็ดเลือดขาวที่ย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์จากการตรวจด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติ 42

รูปภาพ 10 แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด 43

รูปภาพ 11 แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ชนิดทีที่มีการแสดงออกของ CD3 โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนร้อยละของแต่ละตัวอย่างเลือดที่ได้จากอาสาสมัคร 44

รูปภาพ 12 แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชาวที่มีการแสดงออกของ CD45 โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนร้อยละของแต่ละตัวอย่างเลือดที่ได้จากอาสาสมัคร 45

รูปภาพ 13 แสดงค่าความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่สนใจศึกษาแต่ละชนิดบนเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดที (CD3+ lymphocytes) จากผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะแพร่กระจายและอาสาสมัครกลุ่มควบคุม 46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปภาพ 14 แสดงรูปแบบการกระจายของจำนวนและความเข้มข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่จำเพาะบนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดที 47

รูปภาพ 15 แสดงความแตกต่างของรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กและอาสาสมัครกลุ่มควบคุม โดยวัดเฉพาะในลิมโฟไซต์ชนิดทีซึ่งติดสัญญาณ CD3 เป็นบวก 49

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
Anti-CTLA-4	Anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
Anti-PD-1	Anti-programmed cell death protein 1
Anti-PD-L1	Anti-programmed cell death-ligand 1
C5AR1	Complement component 5a receptor 1
CD	Cluster of differentiation
cfDNA	Cell-free fragments of DNA
CLEC4A	C-type lectin domain family 4 member A
CLEC4D	C-type lectin domain family 4 member D
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CTC	Circulating tumor cells
CU-DREAM	Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays
DC	Dendritic cell
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GLOBOCAN	Global Burden of Cancer Study
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LDCT	Low-dose helical computed tomography
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells
MHC	Major histocompatibility complex

NALP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
NK cell	Natural killer cell
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
NSCLC	Non-small cell lung cancer
NSDUH	National Survey on Drug Use and Health
PANTHER	Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships classification system
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
S100A12	S100 calcium-binding protein A12
TCTR	Thai Clinical Trials Registry
TGF	Transforming growth factor
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes
Treg	Regulatory T cell
VEGF	Vascular endothelial growth factor

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะเร็งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตทั่วโลก ทางองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) รายงานว่าในปี พ.ศ. 2555 มีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ 14.1 ล้านคนและเสียชีวิตจากโรคมะเร็งราว 8.2 ล้านคน และคาดการณ์ว่าภายในปี พ.ศ. 2573 จะมีผู้ป่วยโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นเป็น 23.6 ล้านคน หรือเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 68 และคาดว่าจะมีผู้เสียชีวิตราว 13 ล้านคน ซึ่งประมาณร้อยละ 70 ของผู้เสียชีวิตจะอยู่ในประเทศที่มีรายได้ปานกลางถึงต่ำ [1, 2] ส่วนในประเทศไทยพบว่าโรคมะเร็งจัดเป็นปัญหาการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตที่สำคัญ โดยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 เป็นต้นมา โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ของประชากรไทยและมีแนวโน้มสูงมากขึ้นเรื่อยๆ [3]

มะเร็งปอดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตที่สำคัญทั้งในเพศหญิงและเพศชาย ในปี พ.ศ. 2561 มีผู้ป่วยมะเร็งปอดรายใหม่ 2.1 ล้านคนทั่วโลก และมีผู้เสียชีวิตจากมะเร็งปอด ประมาณ 1.8 ล้านคนทั่วโลก [1, 4] ประมาณร้อยละ 75 ของผู้ป่วยมะเร็งปอดจะมาด้วยอาการที่เกิดจากโรคลุกลามหรือแพร่กระจาย ซึ่งเป็นระยะที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ [5] ทำให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปอดไม่ดี ถึงแม้ปัจจุบันการรักษาจะพัฒนาไปมากแต่ผู้ป่วยมะเร็งปอดยังมีอัตราการรอดชีวิตที่ห้าปีประมาณร้อยละ 18 เท่านั้น [6, 7] สาเหตุที่ผู้ป่วยมะเร็งปอดมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงเนื่องจากมักได้รับการวินิจฉัยช้าในระยะที่โรคมีการลุกลามหรือแพร่กระจายแล้ว ดังนั้นจึงมีความพยายามพัฒนาการตรวจคัดกรองมะเร็งปอดเพื่อช่วยวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งระยะต้นที่ไม่มีอาการ โดยมีเป้าหมายเพื่อให้วินิจฉัยมะเร็งได้เร็วขึ้น ส่งผลให้ผู้ป่วยมีโอกาสได้รับการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ลดอัตราการทุพพลภาพและการเสียชีวิตจากมะเร็งในที่สุด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การศึกษาก่อนหน้าหลายฉบับพบว่าการตรวจคัดกรองมะเร็งปอดด้วยภาพรังสีเอกซเรย์ปอดและการตรวจหาเซลล์มะเร็งในเสมหะไม่ลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งปอด [8] การตรวจวิธีใหม่ได้แก่ เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ขนาดต่ำของปอด (low-dose helical computed tomography, LDCT) ซึ่งมีการศึกษาขนาดใหญ่ของ National Lung Screening Trial (NLST) ทำการศึกษาแบบสุ่มเปรียบเทียบการตรวจคัดกรองมะเร็งปอดโดยใช้ LDCT เปรียบเทียบกับการทำเอกซเรย์ปอดปีละครั้งติดกัน 3 ปี ในกลุ่มผู้ที่มีความเสี่ยงสูง ซึ่งได้แก่ ผู้ที่มีอายุ 55-74 ปี มีประวัติการสูบบุหรี่อย่างน้อย 30 ซอง-ปี (pack-years) และยังสูบบุหรี่อยู่หรือหยุดสูบบุหรี่มาแล้วไม่เกิน 15 ปี โดยทำ LDCT ปีละ 1 ครั้งติดต่อกันเป็นระยะเวลา 3 ปี ผลการศึกษาพบว่าการทำ LDCT นี้มีความไวต่อการตรวจพบมะเร็งปอดระยะต้นที่มีขนาดเล็กและยังไม่มีอาการได้ดีกว่าการทำเอกซเรย์ปอด และสามารถลดอัตรา

การเสียชีวิตในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงเหล่านี้ได้ อย่างไรก็ตามทั้งภาพเอกซเรย์ปอดและ LDCT มีอัตราการเกิดผลบวกลวงสูง (ร้อยละ 96.4 ในกลุ่ม LDCT และร้อยละ 94.5 ในกลุ่มเอกซเรย์ปอด) [9] ทำให้การคัดกรองมะเร็งปอดยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความคุ้มทุน (cost-effectiveness) เนื่องจากการตรวจด้วย LDCT มีค่าใช้จ่ายสูงและยังมีผลบวกลวงสูง ส่งผลให้ต้องมีการตรวจภาพรังสีเพิ่มเติมหรือมีหัตถการอื่นๆ ที่อาจมีภาวะแทรกซ้อนตามมาได้ รวมไปถึงการได้รับปริมาณรังสีสะสมซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งชนิดที่สองอีกด้วย [10-12] นอกเหนือจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆ ที่ทำการศึกษาคล้ายกัน แม้ว่าจะได้ผลไปในทิศทางเดียวกัน แต่การศึกษาส่วนใหญ่ไม่สามารถแสดงผลการลดอัตราการตายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องมาจากกลุ่มประชากรที่ศึกษามีขนาดเล็กเกินไป

จะเห็นได้ว่าการตรวจคัดกรองมะเร็งปอดในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดมาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาวิธีการตรวจให้มีความไวและความแม่นยำมากขึ้น นอกจากนี้ควรทำได้ง่าย นำไปใช้ได้อย่างทั่วถึงและมีความคุ้มทุนด้วย มีการศึกษาการตรวจด้วยวิธีไม่ลุกลาม (non-invasive diagnostic techniques) ได้แก่ การตรวจหาสารพันธุกรรม (DNA) ของเซลล์มะเร็งในเสมหะ การตรวจวัดระดับของแอนติบอดีต่อต้านมะเร็งในเลือด การตรวจการแสดงออกของยีนในเสมหะ การตรวจทางเซลล์-วิทยาของเซลล์เยื่อบุท่อหลอดลมในปอด เป็นต้น [13] อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจดังกล่าวยังมีข้อจำกัดหลายอย่างและยังอยู่ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ยังไม่นำมาใช้ในทางคลินิกในปัจจุบัน การตรวจเลือดเป็นหนึ่งในวิธีการตรวจที่น่าสนใจที่จะพัฒนานำไปใช้ต่อในทางคลินิก เนื่องจากเป็นวิธีที่รุกล้ำเข้าร่างกาย (invasive) น้อย เก็บตัวอย่างได้จากเวชปฏิบัติทั่วไป สามารถทำในประชากรกลุ่มใหญ่และมีข้อมูลทางชีวภาพของมะเร็งในร่างกายที่อาจจะสามารถตรวจพบความผิดปกติได้ก่อนภาพทางรังสี-วิทยา จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาพัฒนาใช้ตรวจในทางเวชปฏิบัติได้ในอนาคต ซึ่งจะมีประโยชน์ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งปอดในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง เพื่อให้สามารถวินิจฉัยโรคได้เร็วขึ้น ส่งผลให้การรักษามีประสิทธิภาพมากขึ้นและเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในที่สุด

การศึกษานี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาถึงความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กเปรียบเทียบกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอด โดยคัดเลือกโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานจากการศึกษาก่อนหน้า และใช้ระดับการแสดงของออกโปรตีนบนเม็ดเลือดขาวที่ตรวจได้จากเลือดของผู้ป่วย ร่วมกับข้อมูลทางพยาธิวิทยาและข้อมูลทางคลินิกในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อดูความแตกต่างระหว่างประชากรทั้งสองกลุ่ม

1.2 คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก: การแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิ-ต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กมีความแตกต่างจากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมที่ตรวจไม่พบความผิดปกติจากภาพถ่ายเอกซเรย์ทรวงอกหรือไม่

คำถามรอง: การแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิ-ต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะที่ 1-3 มีความแตกต่างจากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะที่ 4 หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. ศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามแพร่กระจาย เปรียบเทียบกับประชากรกลุ่มควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติจากภาพถ่ายเอกซเรย์ทรวงอก

2. ศึกษาจำนวนและความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ย้อมโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามแพร่กระจาย เปรียบเทียบกับเม็ดเลือดขาวจากอาสาสมัครที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอดโดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติ (flow cytometry)

3. เปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณ ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของ ผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะที่ 1-3 กับระยะที่ 4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

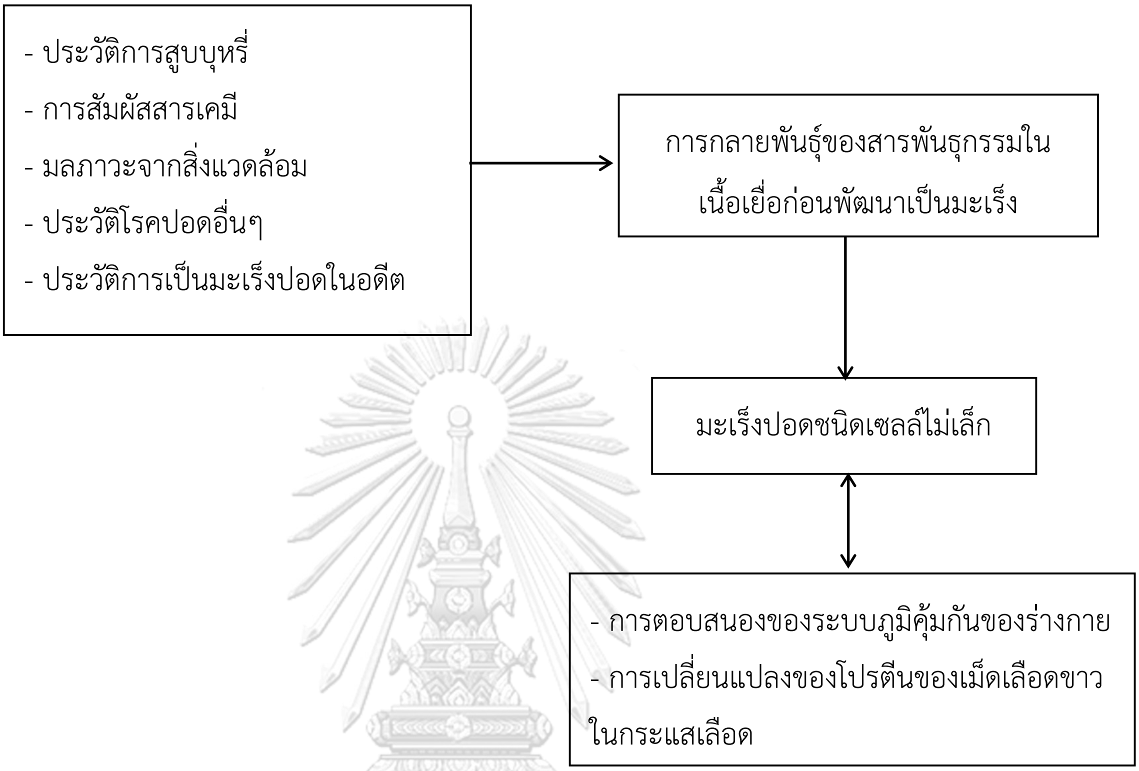
1.4 สมมติฐาน

การแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กมีความแตกต่างจากประชากรกลุ่มควบคุมที่ไม่พบความผิดปกติจากภาพถ่ายเอกซเรย์ทรวงอก

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น

ผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กรายใหม่ที่ยังไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาที่ออกฤทธิ์ทั่วร่างกายมาก่อน มีข้อมูลทางคลินิกและผลทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

1.6 กรอบความคิดแนววิจัย (Conceptual Framework)



รูปภาพ 1 *แสดงกรอบความคิดแนววิจัย (Conceptual Framework)*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย

- มะเร็งปอด คือ มะเร็งที่มีต้นกำเนิดที่ปอดที่ได้รับการวินิจฉัยโดยมีผลทางพยาธิวิทยายืนยัน โดยในการศึกษาจะคัดเลือกเฉพาะมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (non-small lung carcinoma) และแบ่งชนิดย่อยของมะเร็งปอดตามผลพยาธิวิทยาโดยใช้เกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ปี พ.ศ. 2558 (2015 WHO classification)
- ชนิดย่อยของมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กตามลักษณะทางพยาธิวิทยาร่วมกับผลย้อมทางอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) จำแนกเป็นมะเร็งชนิดต่อมหรืออะดีโนคาร์ซิโน-มา (adenocarcinoma), มะเร็งชนิดสแควมัสเซลล์ (squamous cell carcinoma), มะเร็งชนิดอะดี-โนสแควมัส (adenosquamous carcinoma), มะเร็งชนิดเซลล์ตัวใหญ่ (large cell carcinoma) และ sarcomatoid carcinoma

- การกลายพันธุ์ของมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก เป็นการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมที่ทำให้มีการเจริญของเซลล์ในเนื้อเยื่อปอดอย่างควบคุมไม่ได้ โดยการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมที่ทำให้เกิดมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่พบบ่อย ได้แก่ การกลายพันธุ์ของอีจีเอฟอาร์ (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR) และเอแอลเค (Anaplastic Lymphoma Kinase; ALK) เป็นต้น
- ประเมินระยะโรคทางคลินิกโดยใช้เกณฑ์ของ American Joint Committee on Cancer classification, 8th edition [14] ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักในการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่ 4 โดยหมายรวมถึงมะเร็งปอดในระยะลุกลามแพร่กระจาย ได้แก่ กระจายไปปอดด้านตรงข้าม กระจายไปเยื่อหุ้มช่องโพรงปอด เยื่อหุ้มหัวใจ มีน้ำในช่องโพรงปอดหรือในเยื่อหุ้มหัวใจจากมะเร็งปอด หรือมีมะเร็งปอดแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นๆ
- ยาที่ออกฤทธิ์ทั่วร่างกาย หมายถึง การใช้ยาหรือสารยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็ง ได้แก่ เคมีบำบัด ยาโมเลกุลเล็กที่ออกฤทธิ์มุ่งเป้า (small molecule targeted therapy) ยาปรับภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) รวมถึงยาในกลุ่ม immune-checkpoint inhibitor เช่น anti-CTLA-4 (anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), anti-PD-1 (anti-programmed cell death protein 1), anti-PD-L1 (anti-programmed cell death-ligand 1) เป็นต้น
- การสูบบุหรี่ หมายความรวมทั้งการใช้บุหรี่ ยาสูบ ยาเส้น ซิการ์ เป็นต้น โดยปริมาณการสูบบุหรี่จะใช้จำนวนเฉลี่ยของบุหรี่ที่ใช้ต่อวันและระยะเวลาที่สูบบุหรี่แบ่งเป็น 3 กลุ่ม อ้างอิงจาก National Survey on Drug Use and Health (NSDUH) (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง [15]) ดังแสดงในตารางที่ 1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 1 *แสดงปริมาณการสูบบุหรี่**

กลุ่มการสูบบุหรี่	ปริมาณบุหรี่ที่ใช้
ยังสูบบุหรี่อยู่ (current smoker)	สูบบุหรี่อย่างน้อย 100 มวนในชีวิตและยังสูบบุหรี่อยู่จนถึงปัจจุบัน (ภายใน 30 วันที่ผ่านมา)
เลิกบุหรี่แล้ว (former smoker)	สูบบุหรี่อย่างน้อย 100 มวนในชีวิตแต่ปัจจุบันเลิกแล้ว (หยุดมามากกว่า 30 วัน)
ไม่เคยสูบบุหรี่ (never smoker)	ไม่เคยสูบบุหรี่เลยหรือเคยสูบน้อยกว่า 100 มวนในชีวิตและในปัจจุบันไม่ได้สูบแล้ว

*ดัดแปลงจาก National Survey on Drug Use and Health (NSDUH) [15]

■ ระดับสมรรถภาพร่างกายโดยประเมินจากความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวันจากเกณฑ์ของ Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] Performance Status) โดยแบ่งเป็นระดับ 0 ถึง 5 (ดัดแปลงมาจากเอกสารอ้างอิง [16]) รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 2

ตาราง 2 *แสดงระดับสมรรถภาพร่างกายโดยใช้เกณฑ์ ECOG Performance Status*

ระดับสมรรถภาพ	ความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวัน
0	ความสามารถปกติ ออกแรงทำงานได้โดยไม่มีข้อจำกัด
1	ไม่สามารถทำกิจกรรมที่ออกแรงมากได้ แต่สามารถทำกิจวัตรประจำวันได้ปกติ
2	สามารถเคลื่อนไหวและช่วยเหลือตัวเองในกิจวัตรประจำวันได้ปกติ แต่ไม่สามารถทำงานได้ ต้องพักน้อยกว่าร้อยละ 50 ของเวลาตื่น
3	สามารถช่วยเหลือตัวเองได้บางส่วน ไม่สามารถทำงานได้ ต้องพักบนเตียงหรือนั่งมากกว่าร้อยละ 50 ของเวลาตื่น
4	ไร้สมรรถภาพ ไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้ ต้องนั่งหรือนอนบนเตียงตลอดเวลา
5	เสียชีวิต

■ เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสเดี่ยวทรงกลมที่อยู่ในกระแสเลือด ได้แก่ เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ทั้งลิมโฟไซต์ชนิดที (ทีเซลล์; T cells), ลิมโฟไซต์ชนิดบี (บีเซลล์; B cells), เอ็นเคเซลล์ (natural killer cells; NK cells), โมโนไซต์ (monocytes), เซลล์เดนไดรติก (dendritic cells)

■ การตรวจวิธีอิมมูโนวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวด้วยวิธีการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ (immunofluorescence staining) โดยใช้แอนติบอดีชนิดที่หนึ่ง (primary antibody) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่สนใจ และใช้แอนติบอดีชนิดที่สอง (secondary antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งและมีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) หลังจากนั้นจะตรวจการติดสีด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscopy) โดยอ้างอิงจากกระบวนการย้อมมาตรฐานและคำแนะนำจากบริษัทที่จำหน่ายสารแอนติบอดีและสารเรืองแสง

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

อาสาสมัครจะไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากการวิจัย แต่ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะนำไปวิเคราะห์และพัฒนาหาสารชีวภาพบ่งชี้มะเร็งจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือด เพื่ออาจจะช่วยในการตรวจคัดกรองและ/หรือวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กในอนาคต

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการการแก้ไข

- คุณภาพของเลือดตัวอย่างที่ได้จากอาสาสมัคร กระบวนการเก็บเลือดที่อาจทำให้การคัดแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจากเลือดไม่มีคุณภาพหรือปริมาณไม่เพียงพอ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อคุณภาพของการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่ต้องการศึกษาได้ การป้องกันทำได้โดยเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณไม่น้อยกว่า 4 มิลลิลิตรใส่หลอดชนิด EDTA และส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวทันที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งเป็นสาเหตุเสียชีวิตอันดับสองของประชากรทั่วโลก องค์การอนามัยโลกรายงานว่าในปี พ.ศ. 2561 มีผู้เสียชีวิตจากมะเร็งประมาณ 9.6 ล้านคน โดยประมาณ 1 ใน 6 ของการเสียชีวิตทั่วโลกมีสาเหตุจากมะเร็ง มะเร็งปอดเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดโดยมีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งปอดรายใหม่ 2.09 ล้านคนทั่วโลก และจัดเป็นโรคที่ผู้ป่วยเสียชีวิตมากที่สุดในกลุ่มโรคมะเร็ง (1.76 ล้านคน) จากรายงานสถิติทะเบียนมะเร็งในประเทศไทยปี ช่วงปี พ.ศ. 2556-2558 ในเพศชายมีอุบัติการณ์ของมะเร็งปอดเป็นอันดับสอง รองจากมะเร็งในตับและท่อทางเดินน้ำดี โดยอัตราอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานอายุ (age standardized incidence rate) ของมะเร็งปอดในเพศชาย คือ 23 ต่อแสนคน ส่วนเพศหญิงพบมีอุบัติการณ์ของมะเร็งปอดเป็นอันดับห้า (รองจากมะเร็งเต้านม มะเร็งตับและท่อทางเดินน้ำดี มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ตามลำดับ) โดยอัตราอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานอายุของมะเร็งปอดในเพศหญิง คือ 10.9 ต่อแสนคน [17]

ปัญหาสำคัญของการดูแลรักษามะเร็ง คือ การเข้าถึงการบริการสาธารณสุขไม่ทั่วถึง การวินิจฉัยที่ล่าช้า ส่งผลให้การรักษามะเร็งได้ผลไม่ดีและยังมีอัตราการเสียชีวิตที่สูง โดยพบว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดประมาณร้อยละ 75 ได้รับการวินิจฉัยโรคในระยะที่มีการลุกลามหรือแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นแล้ว ซึ่งเป็นระยะที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ [5] ส่งผลให้ผู้ป่วยมะเร็งปอดมีอัตราการเสียชีวิตสูง

องค์การอนามัยโลกได้เสนอแนะวิธีการลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งโดยการลดปัจจัยเสี่ยง ได้แก่ การสูบบุหรี่ ภาวะน้ำหนักเกิน อาหารที่มีกากใยน้อย ขาดการออกกำลังกาย การใช้แอลกอฮอล์ รังสีอัลตราไวโอเลต ภาวะติดเชื้อไวรัสเรื้อรัง เช่น ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบซี เป็นต้น ซึ่งพบว่าประมาณร้อยละ 30-50 ของมะเร็งสามารถป้องกันได้ด้วยการลดปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ดังกล่าว โดยปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของมะเร็งปอด คือ การสูบบุหรี่ นอกจากนี้ยังรวมถึงการสัมผัสควันบุหรี่หรือควันที่เกิดจากการเผาไหม้อีกด้วย ซึ่งคาดการณ์ว่าการสูบบุหรี่เป็นสาเหตุของมะเร็งปอดประมาณร้อยละ 85-90 ของผู้ป่วย [18] ดังนั้นการรณรงค์ให้เลิกสูบบุหรี่จึงเป็นวิธีการป้องกันมะเร็งปอดได้ดีที่สุด

นอกจากการลดอัตราเสี่ยงดังกล่าวแล้ว การลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งอาจจะทำได้โดยการพัฒนาเครื่องมือหรือวิธีการในการตรวจคัดกรองมะเร็ง เพื่อให้สามารถวินิจฉัยมะเร็งได้ตั้งแต่ระยะต้นที่ไม่มีอาการ โดยมีเป้าหมายเพื่อวินิจฉัยมะเร็งในระยะที่ยังไม่ลุกลามซึ่งมีโอกาสรักษาให้หายขาด ส่งผลให้ลดอัตราการทุพพลภาพและการเสียชีวิตจากมะเร็งได้ในที่สุด หลักการของการตรวจคัดกรองมะเร็งที่มีประสิทธิภาพ คือ เป็นมะเร็งที่เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญของประชากรโดยมีอุบัติการณ์การเกิดสูงและเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เสียชีวิต มีโอกาสที่สามารถวินิจฉัยโรคได้ในระยะ

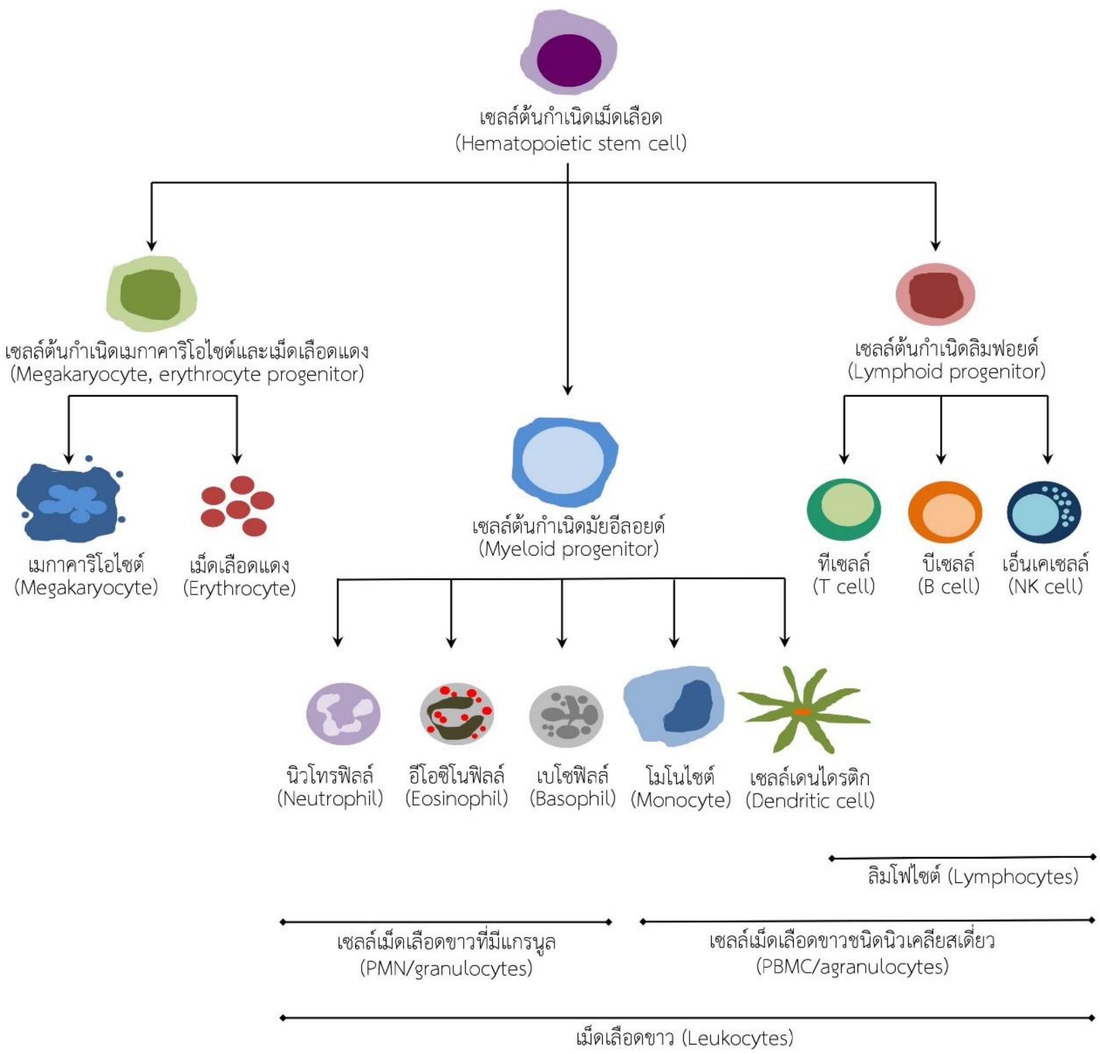
ต้นของโรคและมีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ควรเป็นวิธีที่นำไปปฏิบัติทางคลินิกได้ง่าย มีความปลอดภัยและคุ้มค่าเหมาะสมกับกลุ่มประชากรอีกด้วย สำหรับการตรวจคัดกรองมะเร็งปอดไม่แนะนำให้ทำเอกซเรย์ปอดหรือตรวจหาเซลล์มะเร็งในเสมหะ เนื่องจากมีการศึกษาหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการเอกซเรย์ปอดและ/หรือการตรวจหาเซลล์มะเร็งในเสมหะไม่ช่วยลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งปอด ในปัจจุบันแนะนำให้ตรวจคัดกรองในผู้ที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ ชายหรือหญิงที่มีอายุระหว่าง 55-74 ปี มีประวัติการสูบบุหรี่อย่างน้อย 30 ซอง-ปี (pack-years) และยังสูบบุหรี่อยู่หรือหยุดสูบบุหรี่มาแล้วไม่เกิน 15 ปี โดยทำการตรวจด้วยเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ขนาดต่ำของปอด (low-dose helical computed tomography, LDCT) ปีละ 1 ครั้ง ซึ่งจากการศึกษาของ National Lung Screening Trial (NLST) ที่ทำการศึกษาการตรวจคัดกรองมะเร็งปอดโดยใช้ LDCT เปรียบเทียบกับการทำเอกซเรย์ปอดปีละครั้งติดกันเป็นระยะเวลา 3 ปี มีผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดมะเร็งปอดเข้าร่วมโครงการทั้งสิ้น 53,454 คน จากสถาบันการแพทย์ 33 แห่งในสหรัฐอเมริกา ผลการศึกษาแสดงว่าการตรวจคัดกรองด้วย LDCT สามารถลดอัตราการเสียชีวิตในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงเหล่านี้ได้ กล่าวคือสามารถลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งปอดได้ร้อยละ 20 และลดอัตราการเสียชีวิตจากทุกสาเหตุร้อยละ 6.7 เมื่อเปรียบเทียบกับการทำเอกซเรย์ปอด [9] นั่นคือจะต้องตรวจคัดกรองผู้ที่มีความเสี่ยงสูง 256 คน ปีละครั้งติดกัน 3 ปี เพื่อลดการเสียชีวิตจากมะเร็งปอดได้ 1 คน ในช่วงระยะเวลา 6 ปี [19] นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่าการตรวจคัดกรองด้วย LDCT และภาพเอกซเรย์ปอดมีอัตราการเกิดผลบวกลวงสูง (ร้อยละ 96.4 ในกลุ่ม LDCT และร้อยละ 94.5 ในกลุ่มเอกซเรย์ปอด) [9] ทำให้การตรวจคัดกรองมะเร็งปอดด้วยวิธี LDCT ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความคุ้มทุน (cost-effectiveness) เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงและมีผลบวกลวงสูง ส่งผลให้ต้องมีการตรวจภาพรังสีเพิ่มเติมหรือมีหัตถการอื่นๆ ที่อาจมีภาวะแทรกซ้อนตามมาได้ และยังมีโอกาสได้รับปริมาณรังสีสะสมซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งชนิดที่สองอีกด้วย [10-12] นอกเหนือจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆ ที่ทำการศึกษาคล้ายกัน แต่อาจมีรายละเอียดต่างกันบ้างในแง่ของการคัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการ จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการ และวิธีการตรวจเปรียบเทียบ ซึ่งผลการศึกษาส่วนใหญ่ไปในทิศทางเดียวกัน อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่ไม่สามารถแสดงให้เห็นการลดอัตราการเสียชีวิตจากมะเร็งปอดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องมาจากกลุ่มประชากรที่ศึกษามีขนาดเล็กเกินไป [20]

จากที่กล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าการตรวจคัดกรองมะเร็งปอดยังมีข้อจำกัดมาก จึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองให้มีความไวและความแม่นยำมากขึ้น และควรทำได้ง่าย มีความคุ้มทุน สามารถนำไปใช้ได้ในทางเวชปฏิบัติทั่วไป มีการศึกษาการตรวจคัดกรองมะเร็งปอดด้วยวิธีไม่ลุกลาม ได้แก่ การตรวจทางเซลล์วิทยาของเซลล์เยื่อบุท่อหลอดลมในปอด การตรวจหาสารพันธุกรรมของเซลล์มะเร็งในเสมหะ การตรวจการแสดงออกของยีนในเสมหะ เป็นต้น [13] อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจ

ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดและยังอยู่ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ยังไม่นำมาใช้ในทางคลินิกในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งด้วยวิธีการต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการตรวจหาเซลล์มะเร็งในเลือด (circulating tumor cells) หรือสารพันธุกรรมในเลือด (cell-free DNA และ RNA) ตรวจหาการกลายพันธุ์ระดับแอนติบอดี ตรวจระดับสารบ่งชี้มะเร็งในเลือด [21] อย่างไรก็ตามในระยะต้นของการเกิดมะเร็งจะยังมีปริมาณเซลล์มะเร็งในร่างกายน้อย การตายหรือการขาดเลือดของมะเร็งไม่มาก ส่งผลให้มีระดับของสารบ่งชี้มะเร็งที่ต่ำ จึงเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้ตรวจคัดกรองหรือวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งระยะต้น [22]

คุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของเซลล์มะเร็งก็คือการหลบเลี่ยงกลไกทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยปกติเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมีหน้าที่หลักในการป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมต่างๆ เช่น การติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา รวมไปถึงเซลล์มะเร็งด้วย มีการศึกษาหลายฉบับพบว่าเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสามารถตรวจจับและกำจัดเซลล์มะเร็งได้ [23] เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่มีหน้าที่กำจัดเซลล์ที่ผิดปกติเหล่านี้เป็นกลุ่มแรก คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสเดี่ยวทรงกลม มีการพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดในไขกระดูก (hematopoietic stem cells) ดังแสดงในรูปภาพที่ 2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



(ดัดแปลงจากเอกสาร [24])

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

***รูปภาพ 2** แสดงการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด*

จากแผนภาพด้านบนแสดงให้เห็นว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวหลายชนิด ได้แก่ เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ทั้งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดที (ทีเซลล์; T cells), ลิมโฟไซต์ชนิดบี (บีเซลล์; B cells), เอ็นเคเซลล์ (natural killer cells; NK cells), โมโนไซต์ (monocytes), เซลล์เดนไดรติก (dendritic cells) จำนวนของเม็ดเลือดขาวเหล่านี้ในมนุษย์แต่ละคนจะมีความแตกต่างกัน โดยเฉลี่ยพบเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ร้อยละ 70-90 เอ็นเคเซลล์ร้อยละ 10-30 โมโนไซต์ร้อยละ 5-10 ส่วนเซลล์เดนไดรติกพบได้แค่ประมาณร้อยละ 1-2 [24, 25] รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตาราง 3 *แสดงชนิด ปริมาณ และหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด**

ชนิดของเซลล์เม็ดเลือดขาว	**จำนวน (ร้อยละ)**	**แอนติเจนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ (surface marker)**	**หน้าที่**
ลิมโฟไซต์ชนิดที CD4+	25-60	CD3+ CD4+	ส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยการหลั่งไซโตคายน์ไปกระตุ้นและเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ
ลิมโฟไซต์ชนิดที CD8+	5-30	CD3+ CD8+	ทำลายเซลล์มะเร็ง เซลล์ที่มีการติดเชื้อหรือเซลล์ที่ผิดปกติ
ลิมโฟไซต์ชนิดบี	5-10	CD19+	สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง
เอ็นเคเซลล์	10-30	CD56+ CD3-	ทำลายเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเป็นหลัก
โมโนไซต์	5-10	CD14+	ดักจับสิ่งแปลกปลอมด้วยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) นำเสนอแอนติเจนและหลั่งไซโตคายน์
เซลล์เดนไดรติก	1-2		นำเสนอแอนติเจนให้เซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที

*ดัดแปลงจากเอกสาร [24]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์เป็นลิมโฟไซต์ชนิดทีและลิมโฟไซต์ชนิดบีจะใช้ตำแหน่งที่ลิมโฟไซต์นั้นไปพัฒนาเป็นเซลล์ที่ทำงานได้และชนิดของตัวรับแอนติเจนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ ดังนี้

- *ลิมโฟไซต์ชนิดที* จะไปพัฒนาที่ต่อมไทมัสและจะมีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณทีเซลล์ (T cell receptor) ลิมโฟไซต์ชนิดทีจะมีการแสดงออกของ Cluster of differentiation 3 (CD3) และสามารถแบ่งลิมโฟไซต์ชนิดทีได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ เฮลเปอร์ทีเซลล์ (helper T cells) ซึ่งมีการแสดงออกของ CD4 และไซโตท๊อกซิกทีเซลล์ (cytotoxic T cells) ซึ่งจะมีการแสดงออกของ CD8

- *ลิมโฟไซต์ชนิดบี* จะพัฒนาในไขกระดูกและมีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณบีเซลล์ (B cell receptor) ลิมโฟไซต์ชนิดบีจะมีการแสดงออกของ CD19 บนผิวเซลล์ และจะทำหน้าที่ในการ

สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจน ทำให้สามารถจับกับแอนติเจนหรือเซลล์แปลกปลอมได้อย่างจำเพาะและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเป็นลำดับต่อไป

ส่วนเอ็นเคเซลล์จะมีการแสดงออกของ CD56 บนผิวเซลล์แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD3 แม้ว่าจะมีต้นกำเนิดเดียวกับลิมโฟไซต์ชนิดบีและชนิดทีก็ตาม โมโนไซต์เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีการแสดงออกของ CD14 บนผิวเซลล์ โดยเซลล์โมโนไซต์จะหมุนเวียนอยู่ในกระแสเลือดนาน 1-3 วัน หลังจากนั้นจะเคลื่อนตัวเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกายและจะพัฒนาต่อไปเป็นแมคโครฟาจ (macrophage) และเซลล์เดนไดรติกที่อยู่ในเนื้อเยื่อกระจายอยู่ในอวัยวะต่างๆ เพื่อดักจับแอนติเจนที่แปลกปลอมและนำส่งสัญญาณต่อไปให้เซลล์ลิมโฟไซต์และเกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเป็นลำดับต่อไป

เม็ดเลือดขาวมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยทั่วไปสามารถแบ่งกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเป็น 2 ระบบ ได้แก่

1. ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีติดตัวมาตั้งแต่กำเนิด จัดเป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมชนิดไม่จำเพาะ (non-specific) ได้แก่ ผิวหนัง เยื่อบุ น้ำเมือกหรือสารคัดหลั่งต่างๆ รวมไปถึงการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายด้วยกระบวนการเก็บกินเชื้อโรค (phagocytosis) และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ (inflammation) เพื่อทำลายจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมต่างๆ โดยเม็ดเลือดขาวที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันชนิดนี้ ได้แก่ เซลล์เดนไดรติก เอ็นเคเซลล์ แมคโครฟาจ นิวโทรฟิลล์ เบโซฟิลล์ อีโอซิโนฟิลล์ และมาสต์เซลล์ เป็นต้น

2. ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) หรือภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง (acquired immunity) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อทำลายแอนติเจนหรือเชื้อโรคอย่างจำเพาะเจาะจง หลังจากทำลายสิ่งแปลกแปลมไปแล้ว ภูมิต้านทานเหล่านี้จะมีอยู่ในร่างกายตลอดชีวิต เนื่องจากมีกระบวนการจดจำแอนติเจนที่แปลกปลอม (immunological memory) จากเซลล์ที่แปรสภาพไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่จดจำที่เรียกว่าเซลล์เมมโมรีหรือเซลล์ความจำ (memory cell) ซึ่งถ้าหากมีแอนติเจนชนิดเดิมเข้าสู่ร่างกายอีก เซลล์ความจำจะมีการตอบสนองและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้ทำงานได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ดังนี้

2.1 ภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell-mediated immune response) เป็นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ผ่านทางเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีที่จำเพาะต่อแอนติเจน (antigen-specific T lymphocytes) โดยเมื่อมีแอนติเจนแปลกปลอมในร่างกายจะถูกเซลล์แมคโครฟาจจับกิน และนำเสนอให้ลิมโฟไซต์ชนิดที เมื่อลิมโฟไซต์ชนิดทีตรวจจับแอนติเจนแล้วจะถูกกระตุ้นทำให้มีการเพิ่ม

จำนวนและพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำงานได้ดี ซึ่งได้แก่ ไซโตท๊อกซิกทีเซลล์ เฮลเปอร์ทีเซลล์ และซับ-เพรสเซอร์ทีเซลล์ (suppressor T cells)

- *ไซโตท๊อกซิกทีเซลล์หรือคิลเลอร์เซลล์ (killer cells)* มีหน้าที่ทำลายเซลล์ที่ผิดปกติหรือเซลล์ที่ติดเชื้อโดยการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoposis)

- *เฮลเปอร์ทีเซลล์* เป็นชนิดของลิมโฟไซต์ชนิดทีที่พบมากที่สุดและทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันโดยการหลั่งสารไซโตคายน์ ซึ่งจะทำหน้าที่แตกต่างกัน ได้แก่ กระตุ้นพลาสมาเซลล์ให้สร้างแอนติบอดี ดึงดูดแมคโครฟาจเข้าไปยังเนื้อเยื่อที่มีความเสียหายหรือมีการติดเชื้อ กระตุ้นแมคโครฟาจให้เก็บกินสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น ช่วยเพิ่มการทำงานของไซโตท๊อกซิกทีเซลล์ นอกจากนี้ยังอาจจะไปกระตุ้นการทำงานของซับเพรสเซอร์ทีเซลล์ได้อีกด้วย

- *ซับเพรสเซอร์ทีเซลล์ (suppressor T cells)* เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของไซโตท๊อกซิกทีเซลล์และป้องกันไม่ให้ลิมโฟไซต์ชนิดบีเปลี่ยนเป็นพลาสมาเซลล์ ซึ่งการควบคุมดังกล่าวส่งผลให้ระดับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม

2.2 ภูมิคุ้มกันแบบพึ่งแอนติบอดี (antibody-mediated or humoral immune response) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยใช้แอนติบอดี โดยเซลล์ที่สำคัญ ได้แก่ ลิมโฟไซต์ชนิดบีที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นพลาสมาเซลล์ ซึ่งพลาสมาเซลล์จะสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจน เมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจนแล้วจะเกิดการทำลายแอนติเจนผ่านกลไกต่างๆ เช่น ทำให้แอนติเจนเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่มีพิษ (neutralization) หรือจับกับแอนติเจนแล้วทำให้ถูกเก็บกินด้วยเซลล์แมคโครฟาจ (opsonization) เป็นต้น [26]

มะเร็งเป็นโรคที่มีความผิดปกติในระดับพันธุกรรมของเซลล์ ทำให้เซลล์มะเร็งมีความสามารถในการแบ่งตัวมากผิดปกติ รวมถึงการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียงและสามารถแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นๆ ได้ การที่เซลล์มะเร็งมีความผิดปกติของสารพันธุกรรมจะส่งผลให้มีการแสดงออกของแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์แตกต่างไปจากเซลล์ปกติด้วย โดยความแตกต่างนี้จะถูกตรวจพบได้ด้วยเซลล์เม็ดเลือดของระบบภูมิคุ้มกัน และจะมีการกระตุ้นให้เกิดการทำงานของภูมิคุ้มกันอย่างเป็นลำดับขั้นเพื่อกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติเหล่านี้ กลไกของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายที่ทำหน้าที่ต่อต้านเซลล์มะเร็งนี้เรียกว่า cancer immunoediting ซึ่งเป็นกระบวนการหลักในการควบคุมและกำจัดเซลล์มะเร็งในร่างกายสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ ดังนี้ [23, 27, 28]

1. ระยะกำจัด (elimination) เป็นระยะที่เซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำหน้าที่กำจัดเซลล์มะเร็งโดยเกี่ยวข้องกับทั้งระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เมื่อเซลล์มะเร็งมีการหลั่งสารไซโตคายน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จะกระตุ้นให้เอ็นเคเซลล์และแมคโครฟาจเคลื่อนที่เข้าสู่ก้อนมะเร็งและหลั่งสารอินเตอร์ลิวคิน-12 (interleukin-12) และอินเตอร์เฟียรอน-แกมมา (interferon gamma) กระตุ้นให้เอ็นเคเซลล์ทำงานได้ดีขึ้น เซลล์เดนไดรติกนำเสนอ

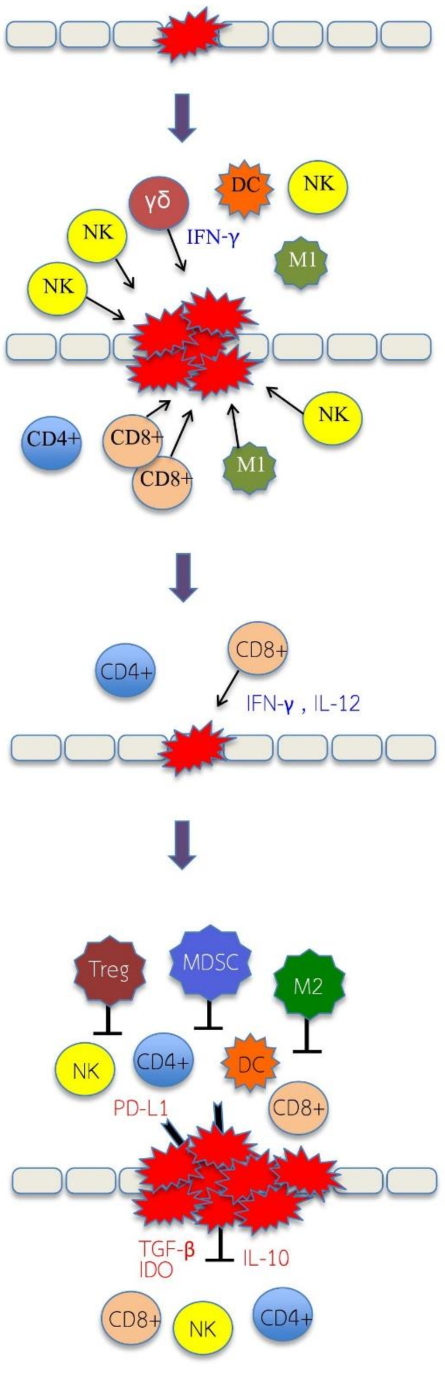
แอนติเจนให้ลิมโฟไซต์ กระตุ้นให้ลิมโฟไซต์เพิ่มจำนวน เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณก้อนมะเร็งและพัฒนาต่อไปเป็นลิมโฟไซต์ชนิดบีและทีที่ทำงานได้ รวมถึงกลายเป็นไซโตท๊อกซิกทีเซลล์ที่ไปทำลายเซลล์มะเร็งในที่สุด เมื่อผ่านกระบวนการนี้เซลล์มะเร็งจะถูกกำจัดไปเป็นส่วนใหญ่ แต่อาจจะเหลือเซลล์มะเร็งบางกลุ่มที่ไม่ถูกทำลายและเข้าสู่ระยะสมดุลต่อไป

2. ระยะสมดุล (equilibrium) เป็นระยะที่มีความสมดุลระหว่างมะเร็งที่มีการเจริญเติบโตกับการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้มีปริมาณเซลล์มะเร็งเพียงเล็กน้อยอยู่ในร่างกาย ซึ่งเป็นระยะที่ยังไม่มีอาการและอาการแสดงทางคลินิก โดยมะเร็งอาจจะอยู่ในระยะนี้เป็นเวลานานหลายปีได้

3. ระยะหลบหนี (escape) เกิดจากการที่มีเซลล์มะเร็งบางกลุ่มสามารถหลีกเลี่ยงกระบวน-การทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ การลดการแสดงออกของแอนติเจน การลดการแสดงออกของโมเลกุล major histocompatibility complex (MHC) บนผิวเซลล์ ทำให้หลบหนีการตรวจจับของลิมโฟไซต์ชนิดทีได้ นอกจากนี้เซลล์มะเร็งยังอาจสร้างสภาวะแวดล้อมให้ไม่เหมาะกับการทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ การหลั่งไซโตคายน์ที่มีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor–β (TGF-β), galectin หรือ indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) รวมถึงการเคลื่อนตัวของเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาในก้อนมะเร็ง ซึ่งได้แก่ regulatory T cells (Treg) และ myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) ทำให้เซลล์มะเร็งหลุดรอดจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

โดยภาพรวมกลไกต่างๆ เหล่านี้จะส่งผลให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนมากขึ้น ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการและอาการแสดงของมะเร็งในที่สุด รูปภาพที่ 3 แสดงขั้นตอนของการต่อต้านเซลล์มะเร็งของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



เซลล์ผิดปกติพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็ง

1. ระยะกำจัด (Elimination)
เซลล์เม็ดเลือดขาวตรวจเจอเซลล์มะเร็ง เกิดการกระตุ้นระบบการทำงานของระบบภูมิต้านทานของร่างกาย ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนตัวเข้าสู่บริเวณก้อนมะเร็ง หลั่งสารกระตุ้นการอักเสบ ได้แก่ interferon-gamma (IFN-γ), interleukin-12 (IL-12) ส่งผลให้เซลล์มะเร็งส่วนใหญ่ถูกกำจัด

2. ระยะสมดุล (Equilibrium)
มีความสมดุลระหว่างการเจริญเติบโตของมะเร็งและการกำจัดเซลล์มะเร็งด้วยระบบภูมิต้านทาน ทำให้มีปริมาณเซลล์มะเร็งเหลืออยู่น้อย

3. ระยะหลบหนี (Escape)
เซลล์มะเร็งมีกระบวนการหลีกเลี่ยงการถูกทำลายจากระบบภูมิต้านทาน มีการหลั่งไซโตคายน์ยับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาว ได้แก่ transforming growth factor-beta (TGF-β), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), interleukin-10 (IL-10) รวมถึงมีการแสดงออกของ PD-L1 และการเคลื่อนที่ของเซลล์กดการทำงานของระบบภูมิต้านทาน ได้แก่ regulatory T-cells (Treg), myeloid-derived suppressor cell (MDSC), M2 macrophage เข้าสู่บริเวณก้อนมะเร็ง ผลโดยรวมทำให้เซลล์มะเร็ง หลุดรอดจากการทำลายของระบบภูมิต้านทาน

(ตัวอักษรย่อในรูปภาพ: DC = dendritic cell; γδ = γδ T cell; IDO = indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN-γ = interferon γ; IL = interleukin; M1 = M1 macrophage; M2 = M2 macrophage; MDSC = myeloid-derived suppressor cell; NK = natural killer cell; PD-L1 = programmed death ligand 1; TGF-β = transforming growth factor β; Treg = regulatory T cell) ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง [23, 28]

***รูปภาพ 3** แสดงกระบวนการควบคุมและกำจัดเซลล์มะเร็งของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย*

โดยในขั้นตอนของการควบคุมและกำจัดเซลล์มะเร็งในร่างกายดังกล่าวข้างต้น เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมเซลล์มะเร็ง คือ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวจำพวกลิมโฟไซต์ที่ออกจากกระแสเลือดและเคลื่อนตัวเข้าสู่บริเวณก้อนมะเร็ง โดยเซลล์ส่วนใหญ่เป็นลิมโฟไซต์ชนิดที ลิมโฟไซต์ชนิดบีและเอ็นเคเซลล์ โดย TILs อาจจะพบอยู่ในเนื้อเยื่อรอบๆ มะเร็งหรืออยู่ในก้อนมะเร็งเองก็ได้ และมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมและกำจัดเซลล์มะเร็งในระยะกำจัดและระยะสมดุล การทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์เหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับการลุกลามของโรคมะเร็ง รวมไปถึงการตอบสนองต่อการรักษาด้วย โดยการศึกษาก่อนหน้าพบว่าการตรวจพบ TILs ในเนื้อเยื่อมะเร็งสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ดี ไม่ว่าจะเป็นผลหลังจากการผ่าตัดหรือการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด รวมไปถึงการตอบสนองต่อการให้ยาปรับภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) ได้แก่ ยาในกลุ่ม immune-checkpoint inhibitor อีกด้วย [29-31]

จะเห็นได้ว่าการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวมีบทบาทสำคัญในการตรวจจับ การควบคุมและกำจัดเซลล์มะเร็ง ซึ่งการทำงานจะเกี่ยวข้องกับทั้งระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ แต่อย่างไรก็ตามเซลล์มะเร็งจะมีกลไกหลบเลี่ยงกระบวนการดังกล่าวได้หลายวิธี ได้แก่ การปรับเปลี่ยนโมเลกุลบนผิวเซลล์ การหลีกเลี่ยงการจับของเซลล์เม็ดเลือดขาว การหลั่งไซโตคายน์ที่ยับยั้งการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นต้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเกิดตั้งแต่ระยะก่อนเป็นมะเร็ง (pre-malignant events) [32, 33] ทำให้เซลล์มะเร็งหลุดรอดจากการทำลายโดยเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้มีการเจริญเติบโต ลุกลามและแพร่กระจายจนทำให้ผู้ป่วยมีอาการและอาการแสดงทางคลินิกของโรคมะเร็งในที่สุด

นอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวที่อยู่ในเนื้อเยื่อมะเร็งดังกล่าวข้างต้นแล้วยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวที่อยู่ในกระแสเลือดของผู้ที่เป็นมะเร็งเช่นเดียวกัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดสะท้อนให้เห็นถึงกระบวนการต่อต้านทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเซลล์มะเร็ง [34] โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นตั้งแต่มีรอยโรคก่อนมะเร็ง และไม่ขึ้นกับปริมาณของเซลล์มะเร็งในร่างกาย ทำให้อาจจะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของมะเร็งระยะต้นได้ [35]

การตรวจการแสดงออกของยีน (gene expreesion) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดเป็นการตรวจหาความผิดปกติในขั้นตอนการถอดรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) โดยทั่วไปอาร์เอ็นเอ (RNA) มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนทั้งในสภาวะปกติและสภาวะที่มีพยาธิ-สภาพ พบว่าการแสดงออกของอาร์เอ็นเอมักจะผิดปกติในมะเร็งและอาจจะมีประโยชน์ในการวินิจฉัยหรือบ่งชี้การพยากรณ์โรคมะเร็งได้ [36-38]

การตรวจการแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดโดยใช้เมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอหรือเอ็มอาร์เอ็นเอ (messenger RNA; mRNA) มีประโยชน์ในการศึกษาทั้ง

การแสดงออกของยีนเดี่ยว (single gene expression methods) ไปจนถึงการแสดงออกของทั้งชุดสารพันธุกรรมทั้งหมด (whole-genome expression profiles) ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจที่เป็นการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบใหม่ ซึ่งมีความสามารถในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในปริมาณมาก (high-throughput method) ทำได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน และมีความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมสูง ทำให้การศึกษาการแสดงออกของยีนก้าวหน้าไปอย่างมาก [39] โดยมีข้อมูลการศึกษาการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดในกลุ่มโรคต่างๆ ได้แก่ กลุ่มโรคภูมิต้านตนเอง (autoimmune diseases) โรคหัวใจและหลอดเลือด การอักเสบ รวมถึงในมะเร็งชนิดต่างๆ อีกด้วย [40, 41] ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งไต มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา มะเร็งตับอ่อน มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งเต้านม [42-44] เป็นต้น โดยผลการศึกษามีความสอดคล้องกันโดยพบว่าการแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งมีความแตกต่างจากประชากรกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง ในบางรายงานพบว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนของเม็ด-เลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดมีความสัมพันธ์กับปริมาณของมะเร็งในร่างกาย [45] นอกจากนี้ยังสามารถพยากรณ์โรคและบ่งชี้ถึงอัตราการรอดชีวิตและระยะเวลาปลอดโรคของผู้ป่วยมะเร็งได้อีกด้วย [13, 41, 44, 46-48]

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก Showe และคณะ (2009) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนของเม็ด-เลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก 137 คน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 91 คนที่วินิจฉัยเป็นโรคปอดอื่นที่ไม่ใช่มะเร็ง ผลการศึกษาได้รายงานการแสดงออกของยีน 29 รูปแบบ (gene signature) ที่สามารถแยกกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์-ไม่เล็กออกจากกลุ่มควบคุมด้วยความแม่นยำร้อยละ 86 โดยมีความไวร้อยละ 91 และความจำเพาะร้อยละ 80 นอกจากนี้ยังรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวหลังการผ่าตัด โดยมีผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก 18 รายที่มีตัวอย่างเลือดก่อนการผ่าตัดเปรียบเทียบกับเลือดที่ตรวจที่เวลา 2-5 เดือนหลังการผ่าตัด ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยร้อยละ 78 มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวลดลงหลังจากผ่าตัด และมีผู้ป่วยร้อยละ 33 ที่ตรวจไม่พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวหลังจากการผ่าตัด ทางผู้วิจัยสรุปว่าการตรวจการแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดอาจช่วยวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะต้นในประชากรกลุ่มเสี่ยงได้ [13]

Zander และคณะ (2011) รายงานการตรวจการแสดงออกของยีนโดยใช้เลือด (whole blood) จากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กเปรียบเทียบกับประชากรกลุ่มควบคุม โดยผลการศึกษาพบว่าเลือดจากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กมีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยีนที่ผิดปกติส่วนใหญ่เป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immune-associated genes) [44]

Rotunno และคณะ (2011) ได้ศึกษาการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอจากเลือดและชิ้นเนื้อมะเร็งปอดชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมา (adenocarcinoma) เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปอดตำแหน่งอื่นที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง โดยพบว่ามีการแสดงออกของยีนในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะที่หนึ่งผิดปกติ 50 ตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบกับเลือดจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง ในจำนวนยีนที่ผิดปกติทั้งหมดนี้พบว่ามียีน 8 ชนิด (TGFBR3, RUNX3, TRGC2, TRGV9, TARP, ACP1, VCAN และ TSTA3) ที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อตำแหน่งที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง แสดงให้เห็นว่ากระบวนการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติมีความสอดคล้องกันทั้งในตำแหน่งที่เป็นมะเร็งปอดและในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก [41]

Chen และคณะ ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะแพร่กระจายที่ได้รับการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดชนิดซิสพลาติน (cisplatin) ร่วมกับเจมไซตาบีน (gemcitabine) ทั้งหมด 4 รอบการรักษาเปรียบเทียบกับประชากรกลุ่มควบคุมที่มีอายุ เพศและโรคประจำตัวใกล้เคียงกัน ผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดมีความแตกต่างกับประชากรกลุ่มควบคุมทั้งหมด 69 ตำแหน่ง และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งปอดระหว่างก่อนและหลังได้รับยาเคมีบำบัด พบว่ามีการแสดงออกของยีนต่างกัน 59 ตำแหน่ง นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับอินเตอร์ลิวคิน-4 (interleukin-4 pathway) มีความเกี่ยวข้องกับการที่โรคมะเร็งลุกลามและยังสัมพันธ์กับการได้รับยาเคมีบำบัดอีกด้วย โดยในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กจะมีการแสดงออกของยีน CXCR4 และ IL2RG ลดลง ในขณะที่ DOK2 และ S100A15 มีการแสดงออกมากขึ้น และการแสดงออกของยีนทั้งสี่ชนิดจะมีเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่ตรงกันข้ามหลังจากได้รับยาเคมีบำบัด [49]

จากการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนในเลือดเหล่านี้สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กในทุกระยะของโรค และยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนต่างๆ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดมีความสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนในชิ้นเนื้อมะเร็งของผู้ป่วยเอง ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจนำมาพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่จะช่วยในการวินิจฉัยหรือตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งระยะต้นได้ [13, 41, 44] เนื่องจากสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ระยะแรกของโรค มีการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับ

ชิ้นเนื้อมะเร็งในร่างกาย นอกจากนี้ยังให้ข้อมูลในแง่การพยากรณ์โรคและผลการรักษาอีกด้วย อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของการตรวจการแสดงออกของยีนก็คือ มีขั้นตอนการทำที่ซับซ้อน ต้องทำในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ ค่าใช้จ่ายสูง ได้ชุดข้อมูลขนาดใหญ่และแปลผลยาก ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ผล จึงทำให้นำไปใช้ในทางเวชปฏิบัติได้ยาก นอกจากนี้ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ได้อาจจะไม่ได้บ่งชี้ถึงระดับของโปรตีนและหน้าที่ของโปรตีนในเซลล์อีกต้วย [50]

โดยแท้จริงแล้วข้อมูลที่ต้องการนำไปใช้อาจจะไม่ใช่การตรวจหาลำดับของยีนทั้งหมด แต่เป็นการค้นหายีนเป้าหมาย (candidate genes) ที่มีการแสดงออกผิดปกติในภาวะที่จำเพาะ โดยในที่นี้ก็คือการหายีนเป้าหมายของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีการแสดงออกผิดปกติและส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วย ซึ่งความสัมพันธ์ของระดับของ RNA กับโปรตีนขึ้นอยู่กับกระบวนการการแปลรหัส (translation) การปรับแต่งโปรตีนรวมไปถึงการย่อยสลายโปรตีนด้วย [51] ถึงแม้ว่าการศึกษาก่อนหน้าจะแสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของระดับของการแสดงออกของ RNA และโปรตีนดังกล่าวอาจจะไม่คงที่เสมอไป แต่ระดับของ RNA ก็บ่งชี้ถึงระดับของโปรตีนที่จำเพาะในชิ้นเนื้อที่ตรวจได้ [52, 53] โดยทั่วไปการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนสามารถทำได้ง่ายกว่า มีกระบวนการทำที่ไม่ซับซ้อนและยังบ่งชี้ถึงระดับของการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่สภาวะปกติ โดยการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวนี้ สามารถตรวจด้วยวิธีการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) หรือวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (immunofluorescence) ได้ ซึ่งมีกระบวนการทำที่ง่ายกว่า ลดขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทางพยาธิวิทยาทั่วไป โดยการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์จะใช้สารเรืองแสง (fluorescent dye) ติดกับแอนติบอดีที่ต้องการศึกษาและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีข้อดีกว่าการย้อมติดสีธรรมดา เนื่องจากการติดสีฟลูออเรสเซนต์จะทำให้ได้ภาพที่มีความคมชัดกว่า ส่งผลให้สามารถระบุการติดสีได้แม่นยำกว่า รวมไปถึงสามารถวัดค่าการติดสีโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วัดความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ โดยในปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงการตรวจการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์เม็ด-เลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอด

ในการศึกษานี้ทางผู้วิจัยต้องการศึกษาหาความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนที่สัมพันธ์กับยีนที่ผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอด โดยมุ่งเป้าไปที่การแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทาน (immune-related protein expression) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด เนื่องจากเป็นกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการตรวจจับและกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่างๆ รวมถึงเซลล์มะเร็งในร่างกาย โดยเมื่อเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ถูกกระตุ้นจากแอนติเจนที่แปลกปลอมบนเซลล์มะเร็ง จะเกิดการพัฒนาให้มีการแสดงออก

ของโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนดังกล่าว ทำให้มีการตรวจจับและเกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเป็นลำดับขั้นเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งต่อไป โดยขั้นตอนการเปลี่ยน-แปลงดังกล่าวจะเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ทางผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาถึงการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กโดยวิธีการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ เพื่อดูความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจเมื่อเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดขาวจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มีโรคมะเร็งปอด ซึ่งการตรวจพบความแตกต่างดังกล่าวอาจจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจคัดกรองหรือช่วยวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กในอนาคตได้ นอกจากนี้ยังอาจจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ติดตามระหว่างการรักษามะเร็งได้อีกด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุม (case-control study)

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

<u>ประชากรที่ศึกษา</u> (Study Population): ประชากรไทยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กรายใหม่ที่ได้รับการวินิจฉัยที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และยังไม่ได้รับการรักษามาก่อน

<u>ประชากรกลุ่มควบคุม</u> (Control Population): อาสาสมัครที่ไม่มีประวัติและอาการแสดงของมะเร็งปอด และมีภาพถ่ายเอกซเรย์ทรวงอกปกติภายในระยะเวลา 3 เดือนก่อนเข้าร่วมโครงการ

<u>วิธีการเข้าถึงอาสาสมัคร</u> (Approach to participant):

- เป็นผู้ป่วยที่อยู่ในความดูแลของสาขามะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
- ประชากรกลุ่มควบคุม เป็นผู้ที่มาเจาะเลือดเพื่อตรวจสุขภาพหรือเตรียมตัวก่อนทำหัตถการ เช่น การผ่าตัดที่ไม่เกี่ยวกับโรคมะเร็ง การตรวจส่องกล้อง เป็นต้น

<u>เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย</u> (Inclusion criteria):

1. ผู้ป่วยรายใหม่ที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก โดยใช้เกณฑ์การแบ่งระยะของโรคตาม American Joint Committee on Cancer classification, 8^{th} edition
2. อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี
3. มีผลชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยายืนยันว่าเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก
4. ลงนามให้ความยินยอมเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อเข้าร่วมงานวิจัย

<u>เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย</u> (Exclusion criteria)

1. เคยได้รับการรักษาด้วยยาที่ออกฤทธิ์ทั่วร่างกายมาก่อน ซึ่งได้แก่ เคมีบำบัด ยาโมเลกุลเล็กที่ออกฤทธิ์มุ่งเป้า (small molecule targeted therapy) ยาปรับภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) รวมถึงยาในกลุ่ม immune-checkpoint inhibitor เช่น anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti-PD-L1 เป็นต้น
2. มีประวัติเป็นมะเร็งชนิดอื่นภายในระยะเวลา 5 ปีก่อนเข้าร่วมการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. ได้รับการรักษาด้วยยากลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ที่ออกฤทธิ์ทั่วร่างกายหรือยาที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันกลุ่มต่างๆ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (หมายเลขอ้างอิง IRB No.211/61) และดำเนินการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากล และได้ขึ้นทะเบียนงานวิจัยแบบทดลองทางคลินิก (Thai Clinical Trials Registry; TCTR) ของเครือข่ายวิจัยกลุ่มสถาบันแพทยศาสตร์แห่งประเทศไทย ภายใต้การกำกับมูลนิธิส่งเสริมวิจัยทางการแพทย์ (หมายเลขอ้างอิง TCTR20190508003)

ตัวชี้วัดการศึกษาวิจัย (Research Outcome)

- ตัวชี้วัดปฐมภูมิ

การแสดงออกโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด โดยวัดจากการติดสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังขยาย 63x/1.4 oil

- ตัวชี้วัดทุติยภูมิ

จำนวนและความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ย้อมโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามแพร่กระจายเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดขาวจากอาสาสมัครที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอดโดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติ (flow cytometry)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 ขนาดตัวอย่างและการคำนวณ

การศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่อง (pilot study) วางแผนทำในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กจำนวน 30 ตัวอย่างและในกลุ่มควบคุมอีก 30 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างไปข้างหน้า (prospective)

3.4 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

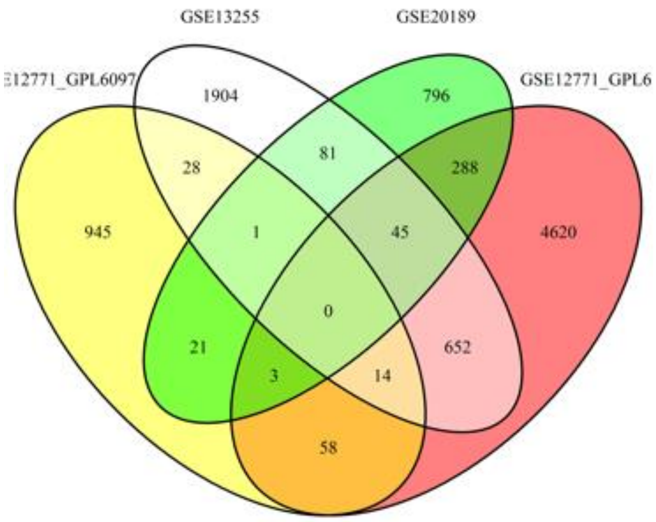
<u>ขอคำยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย</u> แพทย์ผู้ทำวิจัยอธิบายข้อมูลให้กับอาสาสมัคร แจกเอกสารข้อมูลและแบบขอความยินยอมให้อาสาสมัครนำกลับไปพิจารณาก่อนตัดสินใจโดยอิสระ ส่วนประชากรกลุ่มควบคุม ทางแพทย์ผู้วิจัยจะอธิบายข้อมูลของโครงการวิจัย และขออนุญาตเก็บตัวอย่างเลือดเพิ่มเติมจากการตรวจเลือดปกติ

วิธีการวิจัย/วิธีดำเนินการวิจัย การศึกษานี้จะแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ศึกษาหายีนและโปรตีนเป้าหมายที่สนใจ โดยทำการศึกษาหายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามแพร่กระจาย โดยใช้การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดด้วยวิธีไมโครแอเรย์ (microarrays) ซึ่งมีข้อดีคือเป็นการศึกษาการแสดงออกของสาร-พันธุกรรมทั้งระบบ (Genome-wide gene expression profiling) จึงเป็นการเปิดโอกาสการศึกษาให้ค้นพบความผิดปกติใหม่ได้ ใช้สารตั้งต้นกรดไรโบนิวคลีอิกหรืออาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid; RNA) ในตัวอย่างไม่มากและมีความไว (sensitivity) มากกว่าการตรวจด้วยวิธีการดั้งเดิม (ซึ่งได้แก่ วิธี northern blot, ribonuclease protection assay, In-situ hybridization, spotted cDNA arrays เป็นต้น) โดยการศึกษาวิจัยนี้จะใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดด้วยวิธีไมโครแอเรย์จากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กที่มีการศึกษามาก่อนหน้าแล้ว โดยค้นจากฐานข้อมูลผ่านระบบเครือข่ายทางคอมพิวเตอร์ Gene Expression Omnibus (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) และได้คัดเลือกชุดข้อมูลมาจากการศึกษาที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 4 ชุด ได้แก่ GSE12771, GSE13255, GSE20189 และ GSE39345 [13, 41, 44, 49] และนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Connection Up- and Down-Regulation Expression Analysis of Microarrays (CU-DREAM) ซึ่งเป็นโปรแกรมวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเปรียบเทียบชุดข้อมูลระหว่างการศึกษาที่ต่างกันได้ ทำให้สามารถค้นพบยีนเป้าหมายที่ผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลกลุ่มควบคุม [54] ตัวอย่างในที่นี้ก็คือการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งปอด เมื่อวิเคราะห์หาลำดับยีนเป้าหมายที่มีการแสดงออกผิดปกติสูงสุดได้แล้วจะนำไปสู่การวิจัยขั้นตอนที่สอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โดยทางผู้วิจัยได้ใช้โปรแกรม CU-DREAM วิเคราะห์ชุดข้อมูลทั้ง 4 ชุดจากฐานข้อมูลดังที่กล่าวข้างต้น เพื่อหาการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติที่พบร่วมกันจากชุดข้อมูลทั้งหมดและนำข้อมูลที่ได้รวมกับความถี่ที่พบจากแต่ละการศึกษามาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรมอาร์ (program R) และนำเสนอข้อมูลในแผนภาพเวนน์ (Venn’s Diagram) [55] ซึ่งในที่นี้แผนภาพจะแสดงความสัมพันธ์ของยีนเป้าหมายที่มีการแสดงออกผิดปกติจากแต่ละชุดข้อมูล ถ้าหากมีความผิดปกติของยีนเดียวกันจะแสดงในพื้นที่ที่ซ้อนทับกัน ดังแสดงในภาพที่ 4



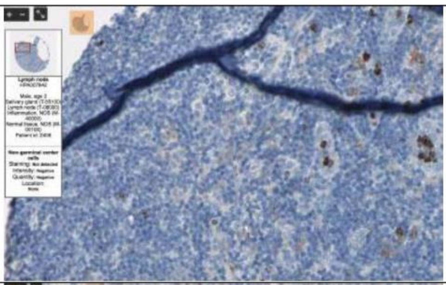
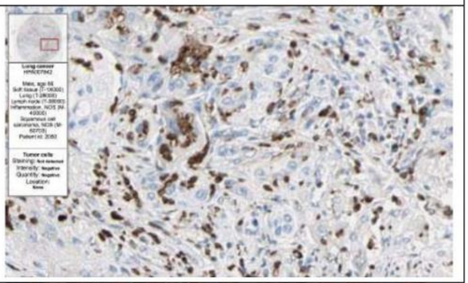
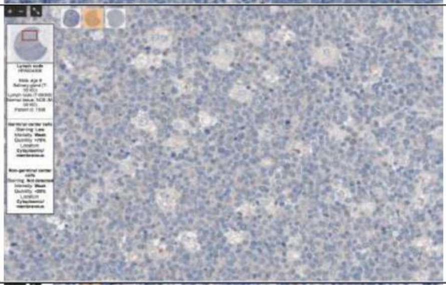
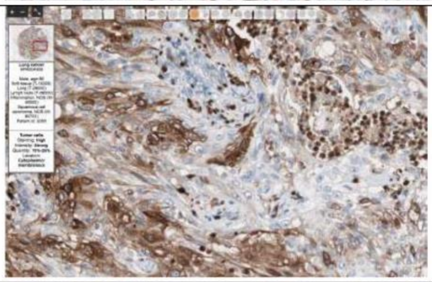
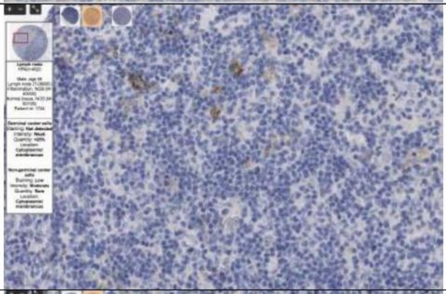
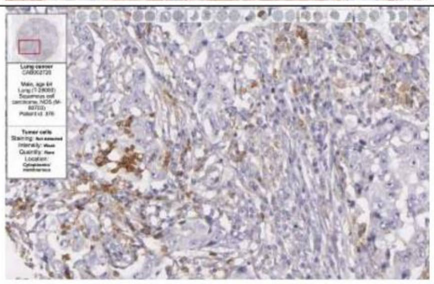
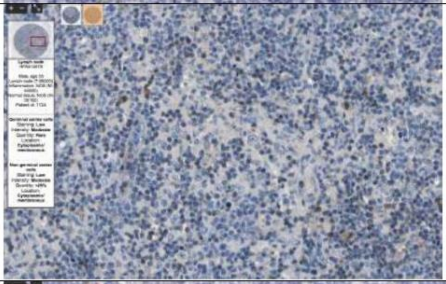
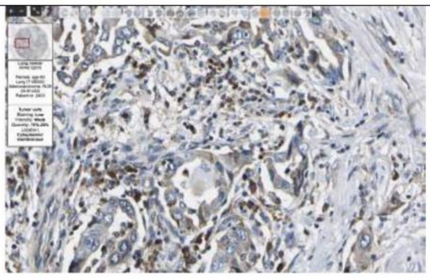
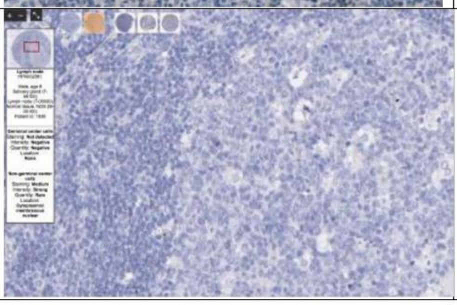
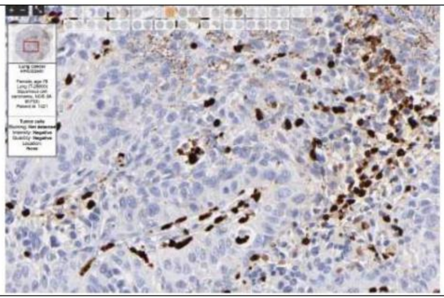
รูปภาพ 4 *แผนภาพเวนน์แสดงความสัมพันธ์ของจำนวนยีนที่ผิดปกติจากชุดข้อมูลไมโครแอเรย์ 4 ชุด*

จากแผนภาพด้านบน ตัวเลขในแต่ละพื้นที่คือจำนวนของยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในชุดข้อมูลนั้นๆ ถ้าหากเป็นพื้นที่ที่มีการซ้อนทับกันแสดงว่ามีการแสดงออกของยีนตัวเดียวกัน ดังนั้นจากการวิเคราะห์ข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติร่วมกันในแต่ละการศึกษา โดยในการศึกษานี้ทางทีมผู้วิจัยสนใจยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและมีการแสดงออกที่ไปในทิศทางที่เพิ่มขึ้น จึงนำยีนเป้าหมายที่สนใจที่พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากการศึกษาด้วยวิธีไมโครแอเรย์อย่างน้อยจาก 2 ฐานข้อมูลมาคัดเลือกเฉพาะยีนที่ทำงานเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้ฐานข้อมูลการจำแนกประเภทของโปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องด้วยระบบของ PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) classification system ผ่านระบบเครือข่ายทางคอมพิวเตอร์ (http://www.pantherdb.org) [56, 57] ทำให้สามารถคัดเลือกยีนที่สนใจที่ทำงานเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันได้ทั้งหมด 75 ยีน อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลการแสดงออกของยีนจากการตรวจการแสดงออกของอาร์เอ็นเอ (RNA expression) แต่วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อนำไปสู่การพัฒนาตัวชี้วัดชีวโมเลกุลในทางคลินิกเพื่อให้ง่ายต่อการนำไปใช้ จึงมุ่งศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีนโดยนำยีนทั้ง 75 ยีนมาทำการตรวจสอบการแสดงออกระดับโปรตีนของยีนดังกล่าวจากฐานข้อมูล The Human Protein Atlas (https://www.proteinatlas.org/) ผ่านระบบเครือข่ายทางคอมพิวเตอร์ ซึ่งจากฐานข้อมูลดังกล่าวจะสามารถค้นหาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจโดยวิธีการย้อมอิมมูโนพยาธิวิทยาด้วยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง [58] ทางผู้วิจัยได้เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์มะเร็ง เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่อยู่ในก้อนมะเร็ง (Tumor-infiltrating lymphocytes; TILs) รวมไปถึงเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในต่อมน้ำเหลืองที่มาจากคนที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง

(non-malignant lymph nodes) และคัดเลือกโปรตีนที่สนใจที่มีการแสดงออกมากบนเซลล์เม็ด-เลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่อยู่ในก้อนมะเร็ง แต่ไม่มีการแสดงออกหรือแสดงออกน้อยในเซลล์เม็ด-เลือดขาวปกติที่อยู่ในต่อมน้ำเหลือง จากกระบวนการดังกล่าวข้างต้น ทางผู้วิจัยได้คัดเลือกโปรตีนที่สนใจทั้งหมด 5 ตัว ได้แก่ CLEC4A, CLEC4D, C5AR1, NLRP3 และ S100A12 ดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 4 *แสดงการย้อมโปรตีนที่จำเพาะต่อยีนแต่ละชนิดของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ในชิ้นเนื้อมะเร็งปอดเปรียบเทียบกับในต่อมน้ำเหลืองที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง*

โปรตีน	ต่อมน้ำเหลืองที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง	ชิ้นเนื้อมะเร็งปอด
CLEC4A		
CLEC4D		
C5AR1		
NLRP3		
S100A12		

(ที่มา: The Human Protein Atlas [https://www.proteinatlas.org/])

ตาราง 5 *แสดงการแบ่งหมวดหมู่ของยีน CLEC4A, CLEC4D, C5AR1, NLRP3 และ S100A12 ในมนุษย์โฮโมเซเปียนส์ (Homo sapiens species) โดยแบ่งตาม PANTHER classification system**

ยีน	**PANTHER family**	**PANTHER subfamily**	**กลุ่มของโปรตีน (Protein class)**	**Pathway categories**
CLEC4A	C-type lectin superfamily member	C-type lectin domain family 4 member A	Cell adhesion molecule, immunoglobulin receptor superfamily	ไม่ระบุ
CLEC4D	C-type lectin superfamily member	C-type lectin domain family 4 member D	Cell adhesion molecule, immunoglobulin receptor superfamily	ไม่ระบุ
C5AR1	Chemotactic receptor	C5A anaphylatoxin chemotactic receptor 1	G-protein coupled receptor	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway
NLRP3	Family not named	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ
S100A12	S100 calcium-binding protein	Protein S100-A12	Calmodulin signaling molecule	ไม่ระบุ

* PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) classification system (ที่มา: http://www.pantherdb.org)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เมื่อได้โปรตีนข้างต้นที่เป็นตัวแทนของยีนเป้าหมายที่สนใจแล้วจะนำไปสู่กระบวนการวิจัยขั้นที่สอง

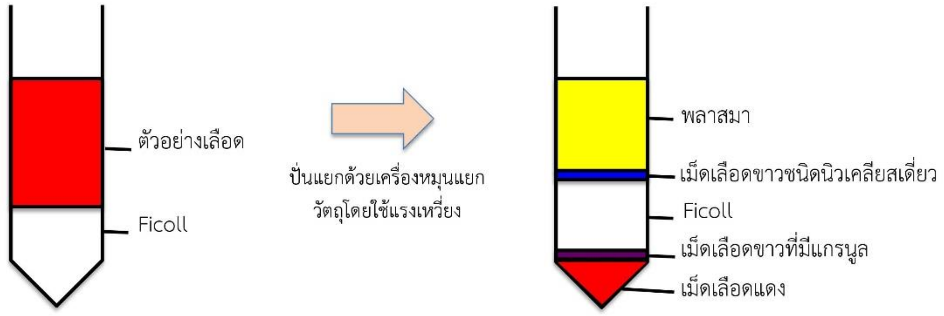
2. การย้อมพิเศษด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการที่มียีนเป้าหมายผิดปกติ ทั้งนี้เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นตัวแทนของยีนที่ผิดปกติในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก โดยขั้นตอนการทำวิจัยมีรายละเอียดดังนี้

เก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครทั้งกลุ่มที่ได้รับวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอด โดยเก็บเลือดปริมาณทั้งหมด 25 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่เคลือบสาร Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัวและส่งไปยังห้องปฏิบัติการ

คัดแยกเม็ดเลือดขาวชนิดเดี่ยวในกระแสเลือดจากตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร

ทำการคัดแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจากเลือดที่ได้มาจากอาสาสมัครด้วยวิธีการปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนแยกวัตถุโดยใช้แรงเหวี่ยง (density gradient centrifugation) โดยใช้ความเร็ว 1600 xg ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนพลาสมาออกและเจือจาง (dilute) ด้วยสารละลายชนิด phosphate-buffered saline (PBS) พีเอช 7.2 ในสัดส่วนหนึ่งต่อหนึ่งในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร และดูดใส่สารคัดแยก Ficoll–Paque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Canada) ซึ่งเป็น density gradient medium ที่มีความหนาแน่น 1.077 กรัมต่อมิลลิลิตร และปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนแยกวัตถุโดยใช้แรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้หลักการแยกเซลล์จากความหนาแน่นของเซลล์แสดงในรูปภาพที่ 5



รูปภาพ 5 *แสดงการแยกเซลล์จากความหนาแน่นของเซลล์โดยการปั่นแยกตัวอย่างเลือดด้วยเครื่องหมุนแยกวัตถุโดยใช้แรงเหวี่ยง*

ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจะมีความหนาแน่นน้อย จึงลอยอยู่ส่วนบนที่เป็นชั้นรอยต่อ (buffy coats) ระหว่างชั้นของพลาสมากับชั้นของสารคัดแยก Ficoll ทำให้แยกจากส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีแกรนูล (granulocytes) ได้แก่ นิวโทรฟิล เบโซฟิล อีโอ-ซิโนฟิล ซึ่งมีความหนาแน่นมากกว่าจึงตกไปอยู่ด้านล่าง ดูดส่วนชั้นรอยต่อดังกล่าวใส่หลอดทดลองใหม่และผสมด้วย PBS ปริมาณ 10 มิลลิลิตรก่อนปั่นแยกโดยใช้แรงเหวี่ยง 300 xg นาน 10 นาที

หลังจากนั้นดูดส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatent) ทิ้งไปและผสมกับ PBS และปั่นแยกที่แรงเหวี่ยง 300 xg นาน 10 นาทีอีกครั้ง กระบวนการดังกล่าวจะแยกเกล็ดเลือดออกไป สุดท้ายจะได้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่สามารถไปวิเคราะห์ต่อและสามารถเก็บได้นานในถังไนโตรเจนเหลว [25]

<u>ขั้นตอนย้อมตัวอย่างควบคุมบวก (set up condition)</u>

ย้อมชิ้นเนื้อควบคุมบวก (positive control) โดยใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่รักษาสภาพในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน (Formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples) และใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome) ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตรและไว้บนแผ่นสไลด์แก้ว ในการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อควบคุมในแต่ละแอนติบอดีโดยยึดตามคำแนะนำจากบริษัทและคู่มือการย้อมชิ้นเนื้อ โดยใช้ชิ้นเนื้อจากม้ามของมนุษย์สำหรับ anti-C5AR1 antibody และ anti-CLEC4D antibody ชิ้นเนื้อจากกระเพาะอาหารสำหรับ anti-CLEC4A antibody ชิ้นเนื้อจากต่อมทอนซิลสำหรับ anti-NLRP3 antibody และชิ้นเนื้อจากไขกระดูกสำหรับ anti-S100A12 antibody ในขั้นตอนการคืนสภาพแอนติเจน (antigen retrieval) จะนำแผ่นสไลด์แก้วไปแช่ในสารละลายโซเดียมซิเตรท (10 mM sodium citrate buffer) พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 20 นาที หลังจากนั้นนำสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้สไลด์เย็นตัวลงและล้างด้วย distilled water นาน 5 นาที ก่อนจะใส่แอนติบอดีชนิดที่หนึ่งที่เจือจางด้วย 1% Fetal Bovine Serum (FBS) ให้มีความเข้มข้น 1:200 หลังจากใส่แอนติบอดีที่ต้องการตรวจบนสไลด์ตัวอย่างแล้วจะนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน (overnight) หลังจากนั้นล้างสไลด์ด้วย 1x PBS อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาทีเพื่อกำจัดแอนติบอดีส่วนเกินออก แล้วใส่แอนติบอดีชนิดที่สองที่ติดกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorochrome-conjugated antibody) โดยในการศึกษานี้ใช้ Anti-Rabbit IgG Fab2 Alexa Fluor® 488 Molecular Probes เจือจางด้วย 1% FBS ใน PBS ให้มีความเข้มข้น 1:200 ใส่บนสไลด์และแช่ไว้ 1 ชั่วโมงในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นล้างสไลด์ด้วย 1x PBS อีก 3 ครั้ง ก่อนจะใส่ Anti-CD45 antibody (MEM-28) (#AB8216, Abcam) ที่เจือจางด้วย 1% FBS ใน PBS จนได้ความเข้มข้น 1:500 ใส่บนสไลด์และแช่ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 คืน แล้วล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกก่อนจะใส่ Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647) preabsorbed (#AB150119, Abcam) ที่ความเข้มข้น 1:500 แช่เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และล้างสไลด์ก่อนจะย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst 33342 (#4082, Cell Signaling Technology) ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแล้วล้างออกด้วย PBS นาน 10 นาทีทั้งหมด 3 ครั้ง ทำสไลด์ให้แห้ง หลังจากนั้นใส่ PRoLong® Gold Antifade Reagent (#9071, Cell Signaling

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Technology) ก่อนปิดด้วย coverslip แล้วใช้น้ำยาทาเล็บชนิดใสป้ายรอบ coverslip ทั้ง 4 ด้าน เก็บสไลด์ไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถนำสไลด์ไปตรวจดูการย้อมติดสีฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ และบันทึกการติดสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังขยาย 63x/1.4 oil เพื่อวัดการติดสีฟลูออเรสเซนต์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์ผล

<u>การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากเลือด</u>

ย้อมดูการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์โดยนำเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ที่ได้จากการคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวตามกระบวนการข้างต้นใส่ในถาดหลุมก้นรูปตัววีชนิด 96 หลุม (96-well V-bottom plate) ปริมาณ 2 x 10^6 เซลล์ต่อหลุม และนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนแยกวัตถุโดยใช้แรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนของเหลวเหนือตะกอนทิ้งไปและล้างด้วยสารละลาย PBS ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ในการศึกษานี้จะทำการย้อมด้วยแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ Anti-C5AR1 antibody (Cat. No. HPA014520, Sigma), Anti-CLEC4A antibody (Cat. No. HPA007842, Sigma), Anti-NLRP3 antibody (Cat. No. HPA012878, Sigma), Anti-CLEC4D antibody (Cat. No. HPA004906, Sigma) และ Anti-S100A12 antibody (Cat. No. HPA002881, Sigma) โดยจะทำการเจือจางแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งด้วยสัดส่วน 1:500 โดยใช้สารละลาย 3% FBS /1x PBS ใส่ในหลุมและแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS ปริมาณ 50 ไมโครลิตร อีก 3 ครั้ง และใส่แอนติบอดีชนิดที่สองโดยใช้ Anti-Rabbit IgG Fab2 Alexa Fluor® 488 Molecular Probes (Cat. No. 4412S, Cell Signaling Technology) ที่ความเข้มข้น 1:200 แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในความมืดนาน 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย PBS และใส่แอนติบอดี Alexa Fluor® 647 anti-human CD45 antibody (Cat. No. 368538, BioLegend) และ APC anti-mouse CD3 antibody (Cat. No. 100312, BioLegend) ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ติดสารเรืองแสงและจำเพาะกับ CD45 และ CD3 ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นที่ 1:200 แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในความมืดนาน 30 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย PBS เพื่อกำจัดแอนติบอดีส่วนเกินออก หลังจากนั้นผสมตะกอนเซลล์ให้เข้ากับสารละลาย PBS และนำไปตรวจต่อด้วยวิธีตรวจแยกเซลล์โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติ (flow cytometry) โดยใช้เครื่อง FlowSight Imaging Flow Cytometry (Amnis, USA) และวิเคราะห์ผลด้วย IDEAS software version 6.2 (Amnis, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. วิเคราะห์ผล โดยการเปรียบเทียบการแสดงของออกโปรตีนบนเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวด้วยเครื่องตรวจและวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก 30 คนและอาสาสมัครกลุ่มควบคุม 30 คน

การจัดการกับตัวอย่างทางชีวภาพที่เหลือ

สำหรับตัวอย่างเลือดและเซลล์เม็ดเลือดที่เหลือจากการวิจัยครั้งนี้จะถูกเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อการวิเคราะห์สารบ่งชี้มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กในอนาคตเป็นระยะเวลา 20 ปี แต่ถ้าหากอาสาสมัครไม่ยินยอมให้เก็บตัวอย่างเลือดก็จะทำลายตัวอย่างทิ้งตามขั้นตอนที่กำหนดไว้ในห้องปฏิบัติการของสถาบัน

3.5 การรวบรวมข้อมูล

เก็บข้อมูลทางคลินิกพื้นฐานในเวลาที่อาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยเก็บบันทึกข้อมูลของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัยดังนี้

1. บันทึกข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยและอาสาสมัครกลุ่มควบคุม ได้แก่ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง ภูมิลำเนา ประวัติการสูบบุหรี่ ประวัติโรคประจำตัว ประวัติมะเร็งชนิดอื่น ประวัติมะเร็งของบุคคลอื่นในครอบครัว
2. บันทึกข้อมูลทางคลินิกของโรคมะเร็งปอดในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นมะเร็งปอด ได้แก่ ระดับสมรรถภาพร่างกายโดยใช้เกณฑ์ ECOG Performance Status ตำแหน่งของก้อนมะเร็ง ขนาดของก้อนมะเร็ง จำนวนของต่อมน้ำเหลืองและตำแหน่งที่มีการลุกลามของมะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ
3. บันทึกข้อมูลทางพยาธิวิทยา ได้แก่ ชนิดของมะเร็งจากผลทางพยาธิวิทยา

ระยะทางคลินิกของมะเร็งปอดประเมินโดยใช้เกณฑ์ tumor-node-metastasis [TNM] system และใช้ผลการประเมินจากเอกซเรย์คอมพิวเตอร์และแฟ้มประวัติของอาสาสมัครในระบบคอมพิวเตอร์ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผู้ดำเนินการวิจัยเป็นผู้เก็บข้อมูลและบันทึกข้อมูลใน Data collection sheet (เอกสารแนบในภาคผนวก)

3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย

- คุณภาพของเลือดตัวอย่างที่ได้จากอาสาสมัคร กระบวนการเก็บเลือดที่อาจทำให้การคัดแยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวจากเลือดไม่มีคุณภาพหรือปริมาณไม่เพียงพอ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อคุณภาพของการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่ต้องการศึกษาได้ การป้องกันทำได้โดยเก็บตัวอย่างเลือดปริมาณไม่น้อยกว่า 4 มิลลิลิตรเก็บใส่หลอดชนิด EDTA และส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวทันที
- อาสาสมัครอาจมีภาวะแทรกซ้อนจากการเจาะเลือดได้ ซึ่งได้แก่ เลือดออกหรือจ้ำเลือดบริเวณตำแหน่งที่เจาะเลือด อาการปวด เป็นต้น ซึ่งความเสี่ยงที่เกิดขึ้นไม่ได้มากกว่ากระบวนการรักษาตามปกติในเวชปฏิบัติ การป้องกันทำได้โดยการให้ข้อมูลก่อนการเจาะเลือด สังเกตและระวังการเกิดภาวะแทรกซ้อน ถ้าหากมีภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้นจะดำเนินการรักษาตามมาตรฐาน
- อาสาสมัครจะไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากการวิจัย แต่ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะนำไปวิเคราะห์และพัฒนาหาสารชีวภาพบ่งชี้มะเร็งจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือด เพื่ออาจจะช่วยในการตรวจคัดกรองและ/หรือวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กในอนาคต

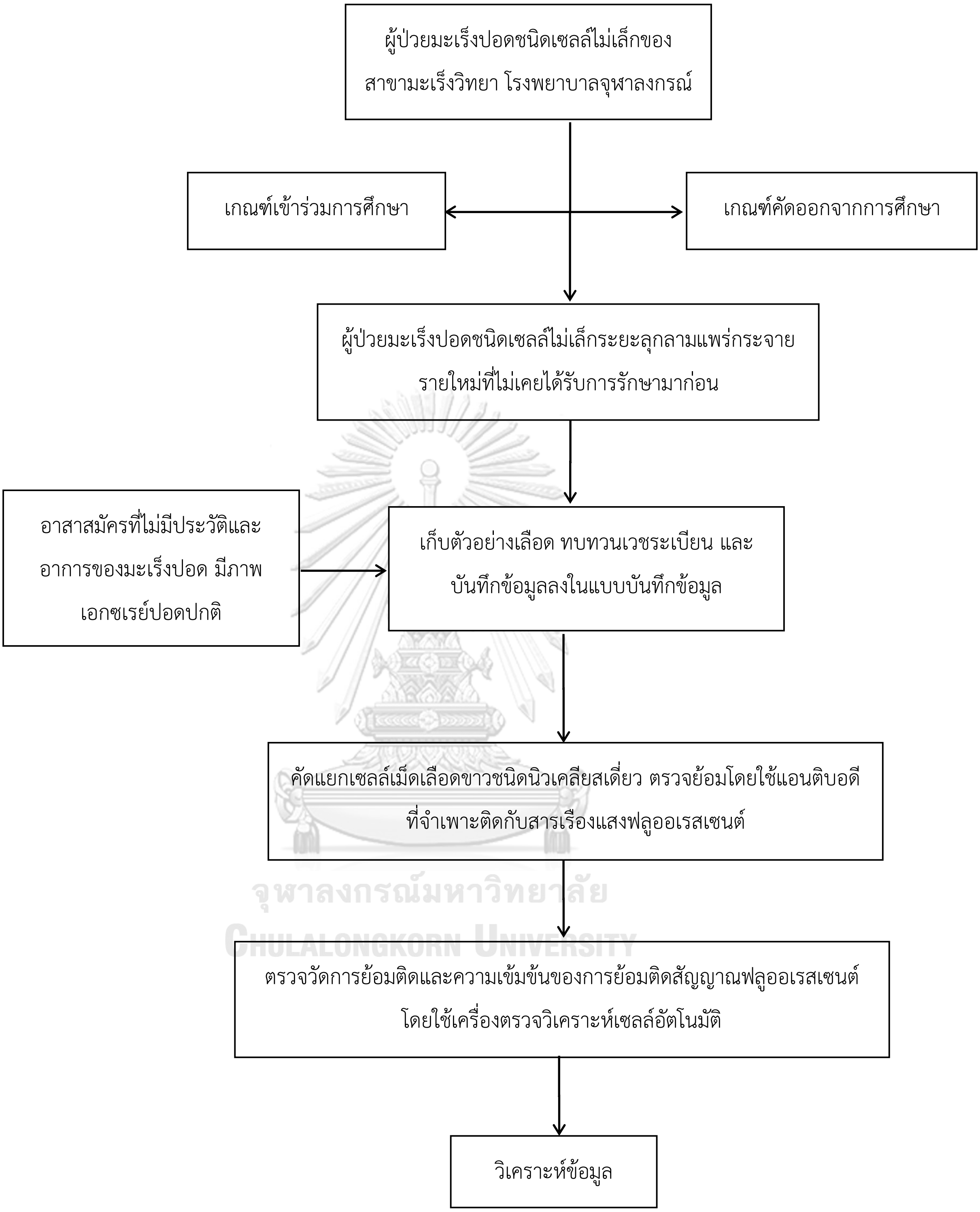
3.7 การเปิดเผยข้อมูลแสดงตัวตนของผู้ป่วย

การเคารพความเป็นส่วนตัวและการเก็บรักษาความลับของข้อมูลของอาสาสมัคร ไม่มีการเก็บข้อมูลส่วนตัวของอาสาสมัคร ใช้รหัสของอาสาสมัครแทนชื่อสกุลจริง ข้อมูลจะถูกบันทึกในคอมพิวเตอร์ที่มีรหัสสำหรับเปิดเครื่อง สำหรับการวิเคราะห์และนำเสนอข้อมูลหรือตีพิมพ์ผลการวิจัยจะแสดงผลแบบกลุ่มในภาพรวมของผลการวิจัย ไม่นำเสนอผลเจาะจงอาสาสมัครเฉพาะราย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

นำเสนอข้อมูลที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ (categorical variables) ได้แก่ กลุ่มอายุ เพศ ระดับสมรรถภาพร่างกาย จะแสดงข้อมูลเป็นจำนวนนับและร้อยละ ส่วนข้อมูลที่เป็นตัวแปรค่าต่อเนื่อง (continuous variable) ของการแสดงออกของโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กเปรียบเทียบกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุม จะนำเสนอในรูปแบบ (1) จำนวนร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง (2) ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของการติดสีฟลูออเรสเซนต์ของแอนติบอดีที่จำเพาะ โดยการคำนวณทางสถิติทั้งหมดใช้ R program language version 3.5.1 [59] ใช้ Mann-Whitney U –test ทดสอบความแตกต่างของจำนวนและความเข้มข้นของการย้อมติดสีฟลูออเรสเซนต์ของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กเปรียบเทียบกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุม นำเสนอข้อมูลด้วยการสร้าง histogram และ density plot โดยใช้ R program และถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า p value < 0.05



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปภาพ 6 *แสดงแนวทางการวิจัย*

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา

ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามแพร่กระจายที่คลินิกมะเร็งวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่อยู่ในเกณฑ์เข้าร่วมการศึกษาและเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยครั้งนี้จำนวน 30 คน และมีอาสาสมัครที่ไม่ได้วินิจฉัยเป็นมะเร็งปอดเข้าร่วมการศึกษาอีกจำนวน 30 คน โดยอาสาสมัครซึ่งเป็นประชากรกลุ่มควบคุมในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นผู้ที่มาเจาะเลือดตรวจสุขภาพ หรือมาเจาะเลือดก่อนทำหัตถการต่างๆ ได้แก่ การส่องกล้องหรือการผ่าตัดที่ไม่เกี่ยวกับโรคมะเร็ง เป็นต้น ซึ่งจะคัดกรองอาสาสมัครเฉพาะผู้ที่ไม่ได้มีประวัติการเป็นมะเร็ง ไม่มีอาการหรืออาการแสดงของโรคมะเร็งปอดร่วมกับมีผลเอ็กซเรย์ปอดเป็นปกติภายในระยะเวลา 3 เดือนก่อนเข้าร่วมการศึกษา

4.2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

ผู้ป่วยกลุ่มโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามแพร่กระจายจำนวน 30 คนที่เข้าร่วมการศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีค่ามัธยฐานของอายุเท่ากับ 65 ปี เพศชายจำนวน 12 คน (ร้อยละ 40) ผู้ป่วยเกือบทั้งหมดมีระดับสมรรถภาพร่างกายอยู่ในเกณฑ์ดีถึงดีมาก (ECOG 0-1) มีประวัติน้ำหนักลดมากกว่าร้อยละ 5 จำนวน 8 คน (ร้อยละ 27) ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่มีประวัติสูบบุหรี่มาก่อน (ร้อยละ 73) ส่วนอาสาสมัครในกลุ่มควบคุมมีค่ามัธยฐานอายุ 60.5 ปี เพศชายจำนวน 9 คน (ร้อยละ 30) และอาสาสมัครเกือบทั้งหมดไม่มีประวัติการสูบบุหรี่มาก่อน รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 6

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตาราง 6 *แสดงข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ*

ข้อมูลทั่วไป	ผู้ป่วยมะเร็งปอด (จำนวน 30 คน)	อาสาสมัครกลุ่มควบคุม (จำนวน 30 คน)
อายุผู้ป่วย		
- ค่ามัธยฐานอายุ, ปี (พิสัย)	65 (39-83)	60.5 (30-86)
- กลุ่มอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 60 ปี	20 (67)	16 (53)
- กลุ่มอายุน้อยกว่า 60 ปี	10 (33)	14 (47)
มะเร็งปอดระยะที่ **4,** จำนวน (ร้อยละ)	30 (100)	-

ข้อมูลทั่วไป	ผู้ป่วยมะเร็งปอด (จำนวน 30 คน)	อาสาสมัครกลุ่มควบคุม (จำนวน 30 คน)
เพศ, จำนวน (ร้อยละ)		
- เพศชาย	12 (40)	9 (30)
- เพศหญิง	18 (60)	21 (70)
ระดับสมรรถภาพร่างกาย, จำนวน (ร้อยละ)		
0	3 (10)	-
1	26 (87)	
2	1 (3)	
น้ำหนักลด, จำนวน (ร้อยละ)		
น้ำหนักลดมากกว่าร้อยละ 5	8 (27)	-
ประวัติการสูบบุหรี่, จำนวน (ร้อยละ)		
- ยังสูบบุหรี่อยู่	5 (17)	0
- เลิกสูบบุหรี่แล้ว	3 (10)	2 (7)
- ไม่เคยสูบบุหรี่	22 (73)	28 (93)
ประเภททางพยาธิวิทยาของมะเร็งปอด, จำนวน (ร้อยละ)		
- Adenocarcinoma	26 (87)	-
- Squamous cell carcinoma	1 (3)	
- NSCLC, NOS	3 (10)	
ชนิดของยีนกลายพันธุ์ก่อมะเร็ง (driver mutation), จำนวน (ร้อยละ)		
- Exon 19 deletion	4 (13)	-
- L858R mutation	6 (20)	
- ALK rearrangement	3 (10)	
- EGFR WT, ALK negative	8 (27)	
- ไม่ทราบ	9 (30)	

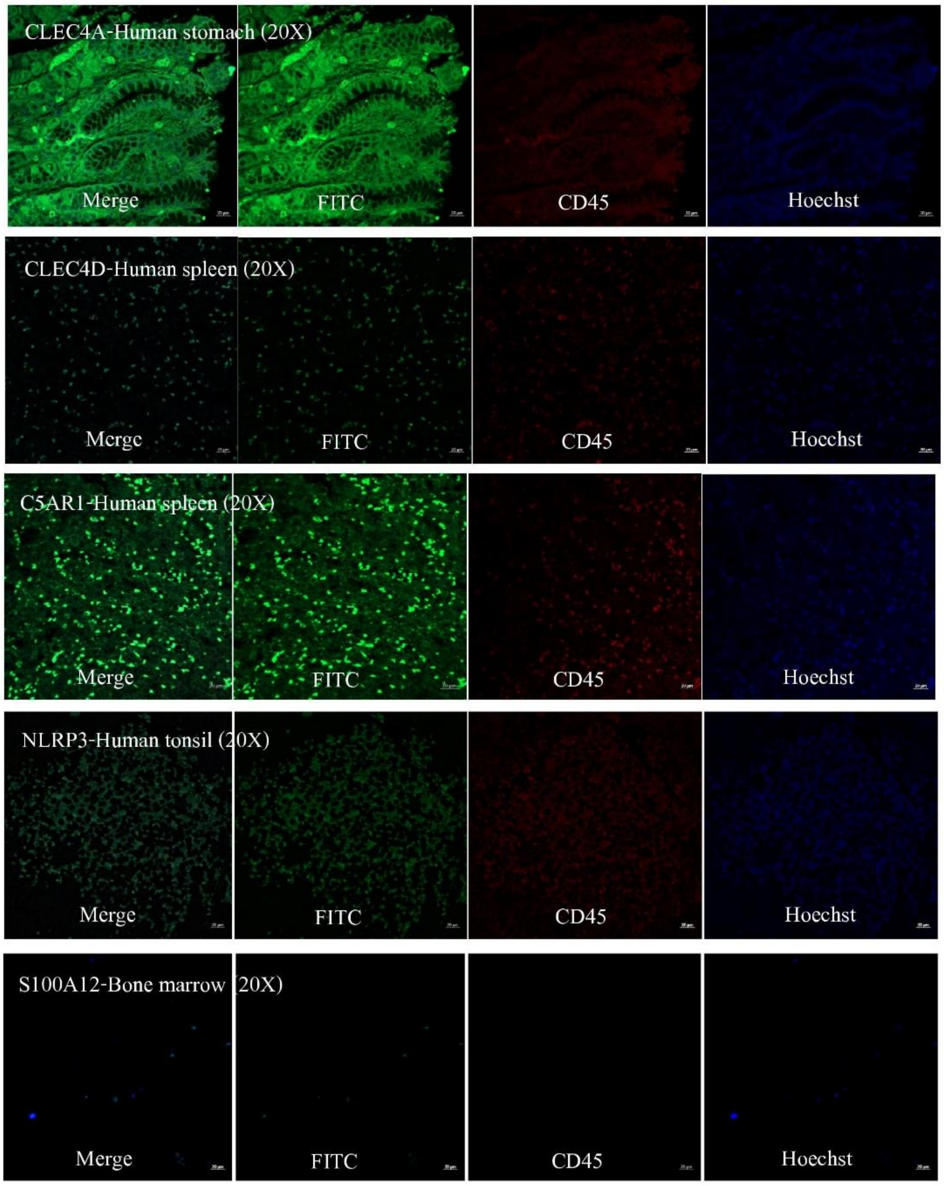
ALK, Anaplastic Lymphoma Kinase; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; NOS, Not Otherwise Specified; NSCLC, non-small cell lung cancer; WT, wild type

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.3 ผลเปรียบเทียบปัจจัยที่นำมาศึกษา

การย้อมสีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ตัวอย่างชิ้นเนื้อเพื่อเป็นตัวควบคุมบวก

เพื่อเป็นการตรวจสอบขั้นตอนของการย้อมสีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่สนใจ ทางผู้วิจัยได้ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับโปรตีนที่สนใจร่วมกับการใช้แอนติบอดีชนิดที่สองที่ติดสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ย้อมชิ้นเนื้อที่เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ตามคำแนะนำของบริษัทที่จำหน่ายแอนติบอดี รูปภาพที่ 7 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ในการย้อมแอนติบอดีบนชิ้นเนื้อควบคุมบวก (ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังขยาย 20 เท่า)

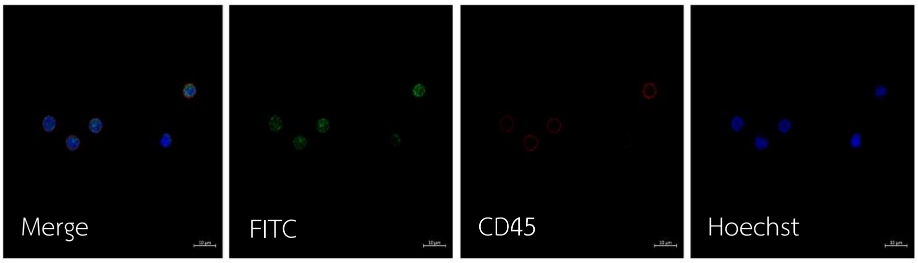


รูปภาพ 7 *แสดงการย้อมติดแอนติบอดีของชิ้นเนื้อควบคุมบวก*

โดยในการศึกษานี้ใช้ชิ้นเนื้อจากม้ามของมนุษย์สำหรับ anti-C5AR1 antibody และ anti-CLEC4D antibody ชิ้นเนื้อจากกระเพาะอาหารสำหรับ anti-CLEC4A antibody ชิ้นเนื้อจากต่อมทอนซิลสำหรับ anti-NLRP3 antibody และชิ้นเนื้อจากไขกระดูกสำหรับ anti-S100A12 antibody การติดของแอนติบอดีดังกล่าวสามารถเห็นได้ด้วยการย้อมแอนติบอดีชนิดที่สองที่ติดกับ FITC (fluorescein isothiocyanate) ซึ่งให้แสงฟลูออเรสเซนต์สีเขียว และใช้ Hoechst 33342 ซึ่งเป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์สีฟ้าย้อมสารพันธุกรรมในนิวเคลียสของเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 7

<u>การย้อมสีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือด</u>

เพื่อเป็นการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด ทางผู้วิจัยได้ใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนที่สนใจที่เป็นตัวแทนของการแสดงออกของยีนที่คัดเลือกมาย้อมด้วยวิธีทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ โดยในการศึกษานี้จะใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CLEC4A, CLEC4D, C5AR1, NLRP3 และ S100A12 ย้อมเซลล์เม็ดเลือดขาวที่คัดแยกมาจากตัวอย่างเลือดที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กและอาสาสมัครที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอดแล้วนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้ CD3 และ/หรือ CD45 เป็นตัวที่ช่วยคัดเลือกชนิดของกลุ่มเซลล์ โดย CD3 หรือ cluster of differentiation 3 เป็นตัวรับสัญญาณบนผิวลิมโฟไซต์ชนิดที มีหน้าที่กระตุ้นทำให้ไซโตท๊อกซิกทีเซลล์ (CD8+) และเฮลเปอร์ทีเซลล์ (CD4+) ทำงานได้ดีขึ้น ส่วน CD45 (cluster of differentiation 45) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า leukocyte common antigen จะพบได้บนผิวเม็ดเลือดขาวทุกชนิด ดังนั้นการย้อมแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่สนใจพร้อมกับใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD3 และ/หรือ CD45 จะทำให้ดูการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่ต้องการศึกษาได้ รูปภาพที่ 8 แสดงผลการย้อมโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ที่กำลังขยาย 63 เท่า (oil immersion) ความยาวเส้นสเกลบาร์เท่ากับ 10 ไมโครเมตร



FITC = fluorescein isothiocyanate

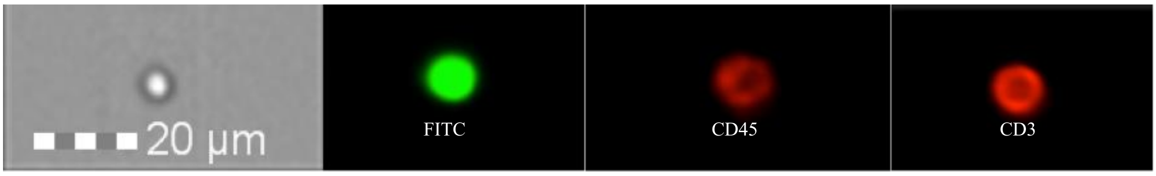
***รูปภาพ 8** แสดงการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก*

<u>การตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของฟลูออเรสเซนต์ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติ (Flow cytometry)</u>

เนื่องจากขั้นตอนในการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเลือดและย้อมด้วยกระบวนการอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์แล้วตรวจความเข้มข้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์เป็นกระบวนการที่ละเอียดซับซ้อนและใช้เวลาในการตรวจมาก ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญและห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมืออุปกรณ์พร้อม นอกจากนี้การวัดปริมาณเซลล์และความเข้มข้นของสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ยังมีความแปรปรวนได้มาก เนื่องจากเป็นการคัดเลือกตัวแทนเซลล์จำนวนหนึ่งจากตัวอย่างเลือดแต่ละตัวอย่าง ดังนั้นจึงได้มีความพยายามปรับกระบวนการขั้นตอนการตรวจวัดนี้เพื่อให้สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็วมากขึ้น และสามารถตรวจนับเซลล์ปริมาณที่มากขึ้นเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือมากขึ้นด้วย

หลังจากที่ทางผู้วิจัยได้ปรับวิธีการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่สนใจให้เหมาะกับเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือดได้แล้ว จึงได้ใช้การตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติแทนการใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งข้อดีของการใช้เครื่องวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติที่เหนือกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ได้แก่ สามารถตรวจวัดเซลล์จำนวนมากจากตัวอย่างได้ในเวลาที่น้อยกว่า ได้ข้อมูลในเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) ลดอคติที่เกิดจากการเลือกเซลล์กลุ่มตัวแทนของแต่ละตัวอย่างไม่เหมาะสม สามารถตรวจวัดเซลล์ที่มีการย้อมติดสีฟลูออเรสเซนต์มากกว่าหนึ่งสีพร้อมกันได้ ทำให้สามารถวัดความเข้มข้นและปริมาณของฟลูออเรสเซนต์เฉพาะในกลุ่มชนิดของเซลล์ที่สนใจได้พร้อมกัน โดยในการศึกษานี้ทางผู้วิจัยได้เลือกใช้ CD3 และ/หรือ CD45 เป็นตัวคัดเลือกชนิดของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย การตรวจด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์แสดงในรูปภาพที่ 9

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



FITC = fluorescein isothiocyanate

รูปภาพ 9 *แสดงเม็ดเลือดขาวที่ย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์จากการตรวจด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติ*

โดยในรูปภาพที่ 9 เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดที่ย้อมติดแอนติบอดีที่สนใจและแสดงออกด้วย FITC ที่ใช้เป็นแอนติบอดีชนิดที่สอง และมีการแสดงออกของ CD45 และ CD3 ที่บ่งบอกว่าเป็นลิมโฟไซต์ชนิดที (ความยาวเส้นสเกลบาร์ 20 ไมโครเมตร)

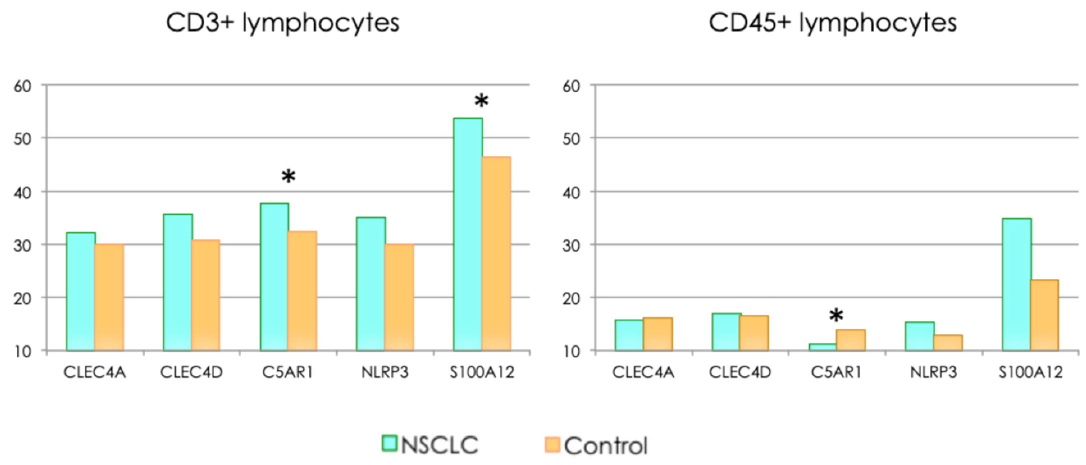
จากการใช้เทคนิคการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของแอนติบอดีหลายชนิดพร้อมกันและใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติโดยใช้เครื่อง FlowSight Imaging Flow Cytometry (Amnis, USA) เพื่อดูการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจบนชนิดของกลุ่มเซลล์ที่ต้องการศึกษาโดยในที่นี้เลือกใช้ CD3 และ CD45 ในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์ เครื่องจะตรวจจับเซลล์ที่มีการย้อมติดแอนติบอดีต่อ CD3 หรือ CD45 ร่วมไปกับแอนติบอดีที่สนใจศึกษาทั้ง 5 ชนิด พบว่าเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กและอาสาสมัครกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจทั้ง 2 กลุ่ม แต่ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดมีแนวโน้มจะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจสูงกว่าอาสาสมัครกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอด ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปภาพที่ 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตาราง 7 *แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด*

กลุ่มประชากรย่อยของเม็ดเลือดขาว	แอนติบอดี	จำนวนเซลล์ (ร้อยละ)*		*p*-value
		ผู้ป่วยมะเร็งปอด	กลุ่มควบคุม	
CD3+	CLEC4A	32.15	29.93	0.39
	CLEC4D	35.53	30.73	0.57
	C5AR1	37.61	32.31	<0.001
	NLRP3	35.04	29.8	0.99
	S100A12	53.67	46.33	<0.001
CD45+	CLEC4A	15.61	16.03	0.91
	CLEC4D	16.81	16.41	0.81
	C5AR1	11.1	13.88	<0.001
	NLRP3	15.25	12.81	0.51
	S100A12	34.75	23.26	0.77

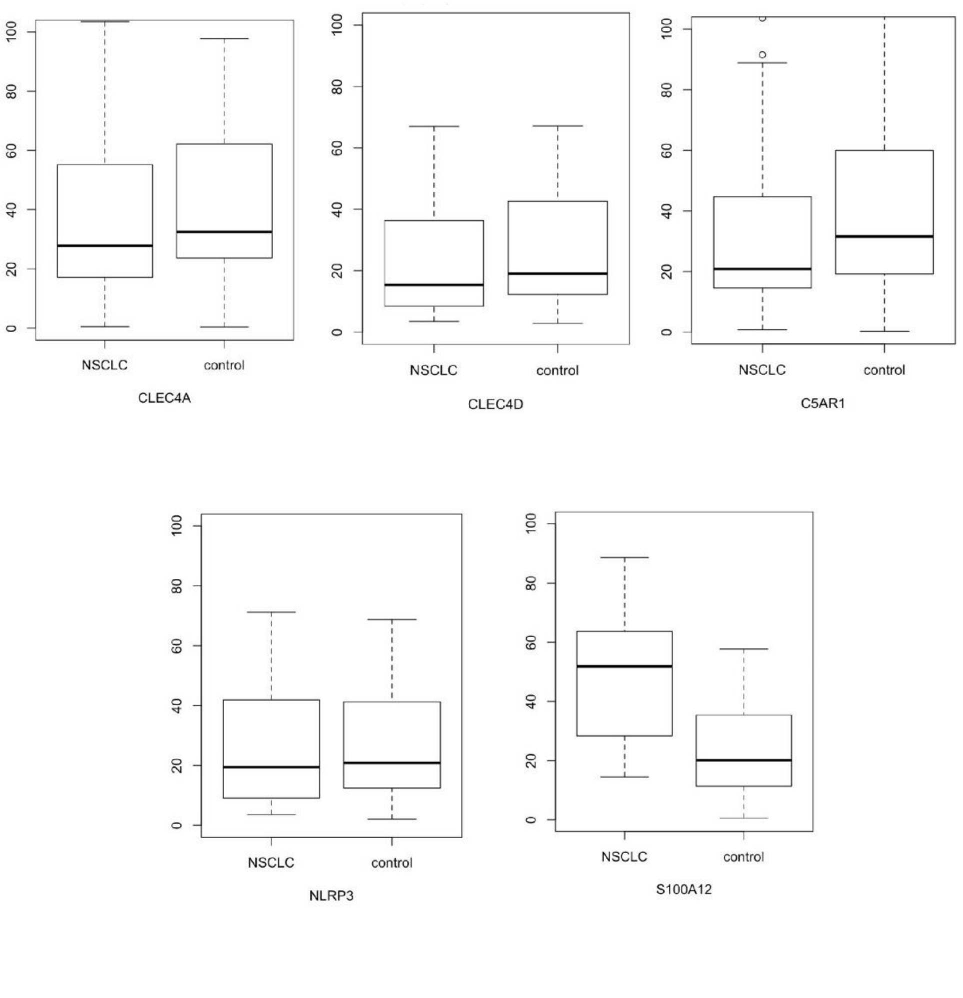
*จำนวนร้อยละของเซลล์คำนวณจากจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่มีการย้อมติดแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงร่วมกับ CD3 หรือ CD45 แล้วนำไปหารด้วยจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่มีการย้อมติด CD3 หรือ CD45 แล้วคูณด้วย 100 (ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากตัวอย่างเลือดที่ได้จากผู้ป่วยและอาสาสมัครที่เข้าโครงการวิจัยทุกคน)



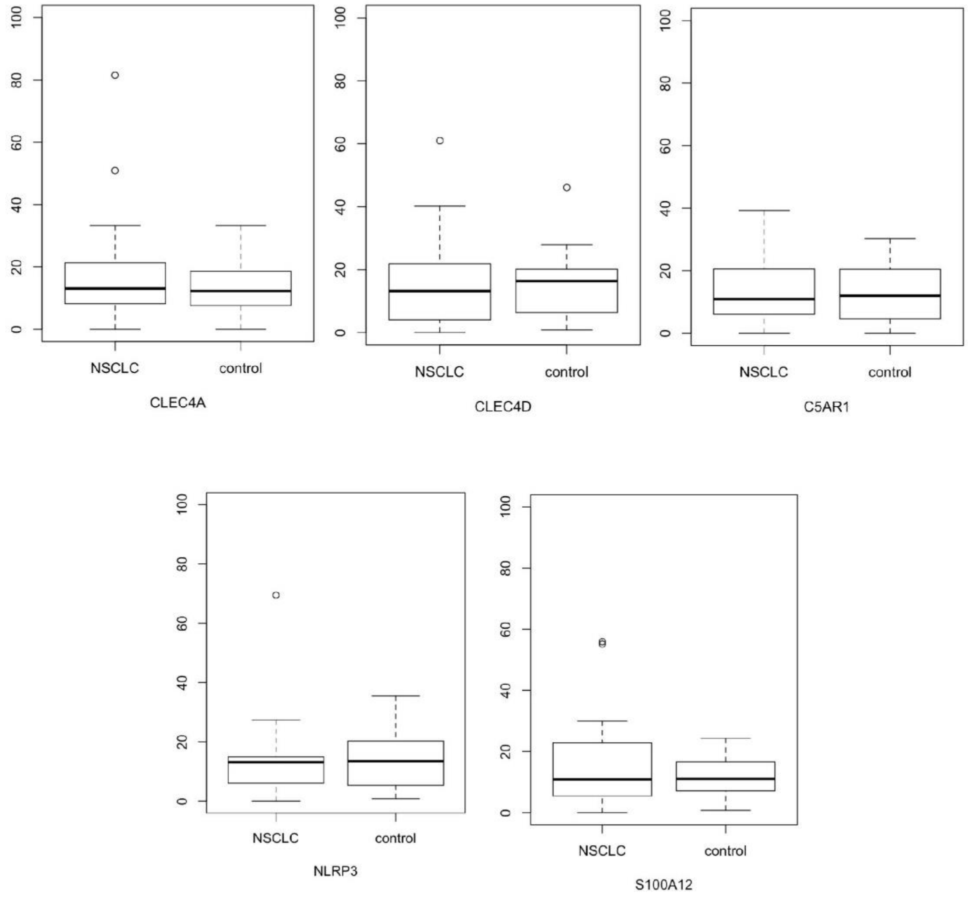
รูปภาพ 10 *แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือด*

ทั้งนี้ถ้าคิดร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดโดยดูแยกชนิดของโปรตีนที่สนใจจากตัวอย่างเลือดแต่ละตัวอย่างจะสามารถแสดงได้ดังรูปภาพที่ 11 และ 12

รูปภาพ 11 *แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ชนิดทีที่มีการแสดงออกของ CD3 โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนร้อยละของแต่ละตัวอย่างเลือดที่ได้จากอาสาสมัคร*



รูปภาพ 12 *แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชาวที่มีการแสดงออกของ CD45 โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวนร้อยละของแต่ละตัวอย่างเลือดที่ได้จากอาสาสมัคร*

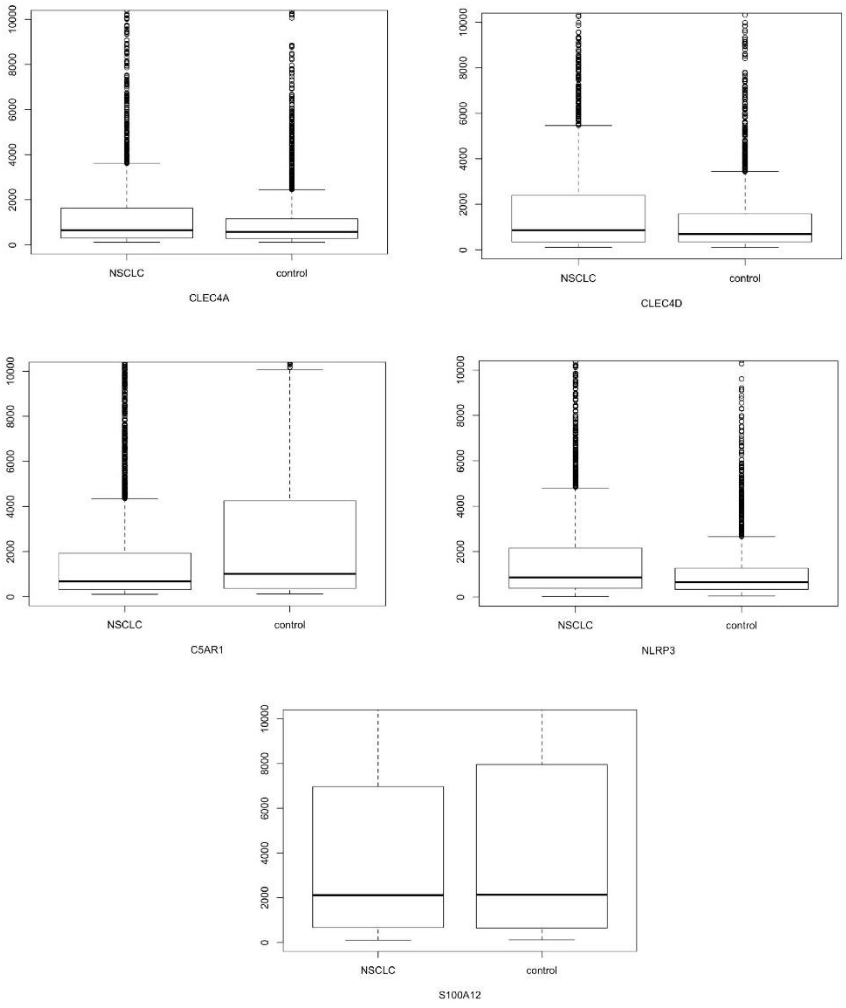


CHULALONGKORN UNIVERSITY

นอกเหนือจากการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อแอนติบอดีที่ตรวจแล้ว เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและจำนวนเซลล์อัตโนมัติยังสามารถวิเคราะห์ความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ติดอยู่กับแอนติบอดีที่จำเพาะบนเซลล์ที่ตรวจได้อีกด้วย ในการศึกษานี้ทางผู้วิจัยได้ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่สนใจที่ต้องการศึกษา ได้แก่ anti-CLEC4A, anti-CLEC4D, anti-C5AR1, anti-NLRP3 และ anti-S100A12 antibodies เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวบนเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวที่แยกมาจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุม โดยตั้งค่าเครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติให้คัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่ติดแอนติบอดีต่อ CD3 ซึ่งจะเป็นการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดที หลังจากนั้นเครื่องจะวัดความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีที่

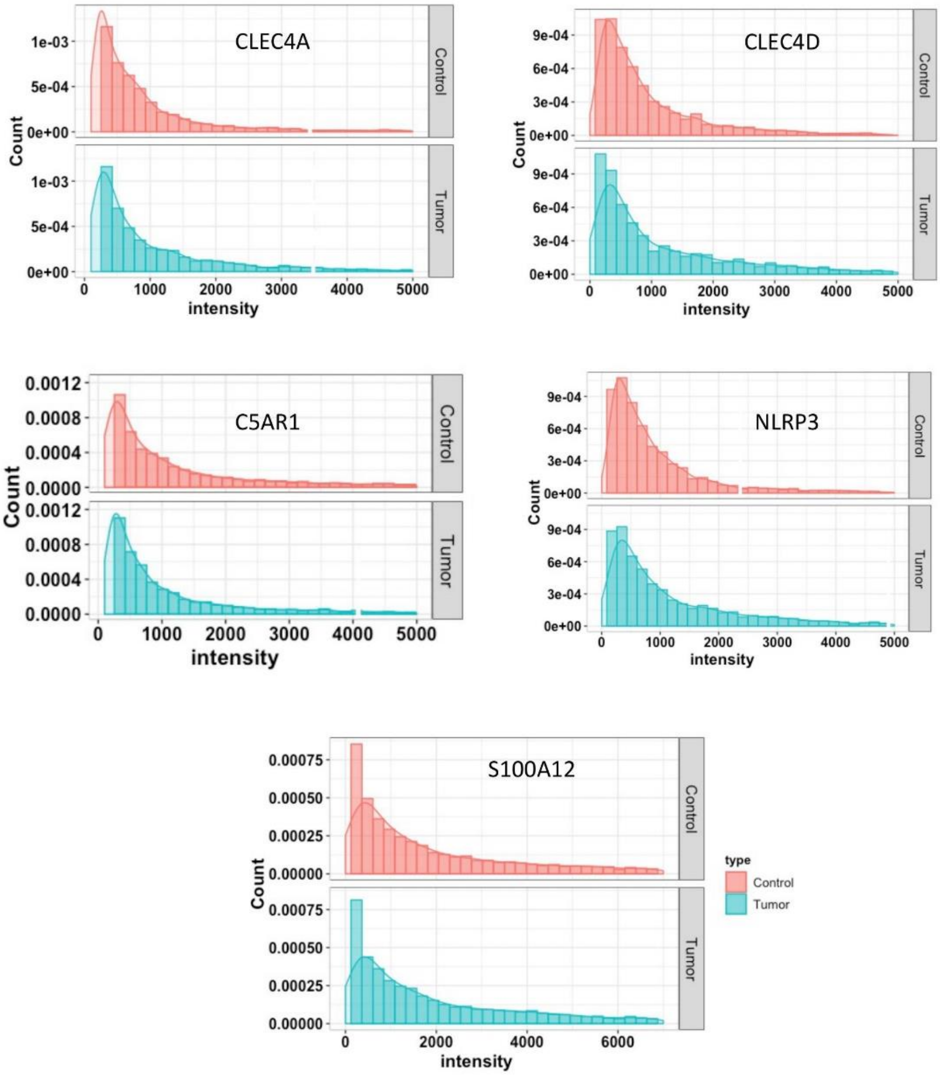
ต้องการศึกษา ซึ่งก็พบว่าลิมโฟไซต์ชนิดทีของผู้ป่วยมะเร็งปอดและอาสาสมัครกลุ่มควบคุมมีการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการศึกษาเช่นเดียวกัน โดยค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์แสดงดังในรูปภาพที่ 13

รูปภาพ 13 *แสดงค่าความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่สนใจศึกษาแต่ละชนิดบนเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดที (CD3+ lymphocytes) จากผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะแพร่กระจายและอาสาสมัครกลุ่มควบคุม*



โดยเมื่อดูรูปแบบของสัญญาณความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่สนใจบนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดทีสามารถแสดงดังในรูปภาพที่ 14

รูปภาพ 14 *แสดงรูปแบบการกระจายของจำนวนและความเข้มข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่จำเพาะบนเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดที*



เนื่องจากค่าความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้จากเครื่องตรวจวัดและวิเคราะห์เซลล์อัตโนมัติมีค่าการกระจายที่ไม่ปกติ และค่าของข้อมูลมีความแตกต่างกันมาก จึงใช้ค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (geometric mean) ของแต่ละตัวอย่างเลือดซึ่งจะเป็นตัวแทนของข้อมูลที่ดีกว่าค่าเฉลี่ยเลขคณิตปกติ ค่าเฉลี่ยเรขาคณิตของปริมาณความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่สนใจบนเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดทีแสดงในตารางที่ 8

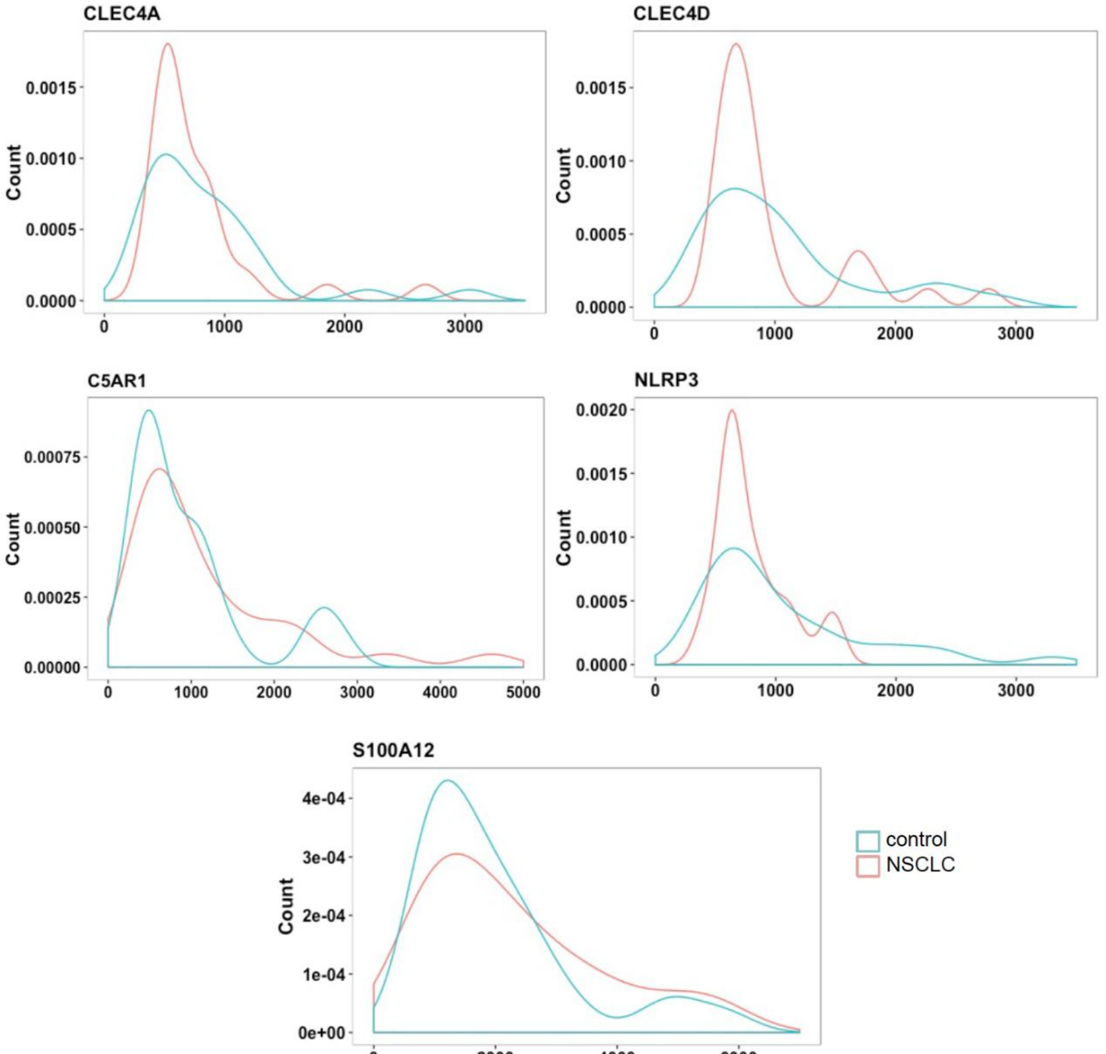
ตาราง 8 *แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่ตรวจด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง*

แอนติบอดี	ผู้ป่วยมะเร็งปอด		กลุ่มควบคุม		*p*-value
	ค่าเฉลี่ย*	ค่าความคลาดเคลื่อน	ค่าเฉลี่ย*	ค่าความคลาดเคลื่อน	
CLEC4A	810.06	428.4	698.38	344.0	<0.001
CLEC4D	1,091.52	522.5	916.02	454.4	<0.001
C5AR1	919.67	256.6	1,428.75	407.0	<0.001
NLRP3	1,030.49	458.6	742.95	203.5	<0.001
S100A12	2,219.30	327.0	2,502.44	429.5	0.03

*ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ โดยวิเคราะห์เฉพาะเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีซึ่งเป็นกลุ่มประชากรของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD3 เป็นบวก การวัดใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติ ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยเรขาคณิต (Geometric mean) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error) จากตัวอย่างเลือดที่ได้จากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กและอาสาสมัครกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นมะเร็งที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกคน

ในขั้นตอนของการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้การตั้งค่าตัวขยายสัญญาณ (amplifiers) เท่ากันในทุกการทดลองของเลือดทุกตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่สนใจบนเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีดังแสดงในตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามแพร่กระจายมีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างไปจากกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอด โดยในกลุ่มมะเร็งปอดจะมีการแสดงออกของ CLEC4A, CLEC4D และ NLRP3 ที่เพิ่มขึ้น แต่มีการแสดงออกของ C5AR1 และ S100A12 ลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของการทำงานของเม็ดเลือดขาวในสภาวะที่มีมะเร็งในร่างกาย การเปรียบเทียบความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่สนใจแต่ละชนิดบนลิมโฟไซต์ชนิดทีระหว่างกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กกับอาสาสมัครที่ไม่ได้เป็นมะเร็งแสดงดังรูปภาพที่ 15

รูปภาพ 15 *แสดงความแตกต่างของรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กและอาสาสมัครกลุ่มควบคุม โดยวัดเฉพาะในลิมโฟไซต์ชนิดที่ซึ่งติดสัญญาณ CD3 เป็นบวก*



บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

การศึกษานี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก โดยใช้ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กรายใหม่ที่ยังไม่ได้รับการรักษาและอาสาสมัครกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอดจำนวนกลุ่มละ 30 คน เครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรวบรวมข้อมูลประกอบด้วยแบบบันทึกข้อมูลพื้นฐานทั่วไป ข้อมูลทางพยาธิวิทยา ผลของการย้อมโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ จำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจ รวมถึงความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่สนใจแต่ละชนิดบนเซลล์เม็ดเลือดขาว ผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กมีความแตกต่างกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอด จากการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณทางระบบภูมิคุ้มกันที่สนใจศึกษา ซึ่งได้แก่ CLEC4A, CLEC4D, C5AR1, NLRP3 และ S100A12 พบว่าผู้ป่วยมะเร็งปอดมีจำนวนเม็ดเลือดขาวที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจดังกล่าวสูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากจำนวนของเซลล์ที่มีการแสดงออกมากกว่าแล้วยังพบว่าค่าความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของการย้อมโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวก็มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอดเช่นกัน ดังนั้นการวัดการแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้บนเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดอาจจะช่วยแยกผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กออกจากกลุ่มควบคุมได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการสะสมของความผิดปกติของสารพันธุกรรมซึ่งส่งผลให้เกิดแอนติเจนที่แตกต่างไปจากเซลล์ปกติ (neoantigen) [47] การเปลี่ยนแปลงของแอนติเจนหรือโปรตีนบนผิวเซลล์ดังกล่าวจะไปกระตุ้นลิมโฟไซต์ชนิดทีให้ทำงานได้ดีขึ้น ส่งผลกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยมะเร็ง [60] ซึ่งกลไกการทำงานของลิมโฟไซต์ชนิดทีในการต่อต้านมะเร็งนี้สะท้อนให้เห็นถึงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเซลล์มะเร็ง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันบนเซลล์ลิมโฟไซต์เพื่อจำแนกผู้ป่วยมะเร็งออกจากผู้ที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง โดยในการศึกษานี้ทางผู้วิจัยได้คัดเลือกโปรตีนที่สนใจมา 5 ชนิด โดยอ้างอิงจากงานตีพิมพ์ก่อนหน้าที่ศึกษาถึงการแสดงออกของยีนของมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ซึ่งโปรตีนที่คัดเลือกมาทุกตัวมีบทบาทการทำงานที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทั้งภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและ/หรือภูมิคุ้มกับแบบจำเพาะ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์

ไม่เล็กมีการแสดงออกของโปรตีน CLEC4A, CLEC4D และ NLRP3 ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีน C5AR1 และ S100A12 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง

โปรตีน CLEC4A และ CLEC4D เป็นโปรตีนในกลุ่ม C-type lectin/C-type lectin-like domain (CTL/CTLD) superfamily หน้าที่หลักของโปรตีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการยึดเซลล์ (cell adhesion) การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (cell-cell signaling) การหมุนเวียนของสารไกลโคโปรตีน (glycoprotein turnover) และยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ส่วนยีน NLRP3 จะถอดรหัสได้เป็น pyrin-like protein ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม NALP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) inflammasome complex โดยกลุ่มของโปรตีนเหล่านี้มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการอักเสบ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและกระตุ้นเซลล์ให้ตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) การที่ลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยมะเร็งปอดมีการแสดงออกของโปรตีน CLEC4A, CLEC4D และ NLRP3 ที่เพิ่มขึ้นอาจจะแสดงให้เห็นถึงกระบวนการต่อต้านเซลล์มะเร็งของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย

อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่าการระดับการแสดงออกของโปรตีน C5AR1 และ S100A12 ลดลงในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก ซึ่งแตกต่างจากที่คาดการณ์ไว้ก่อนเริ่มการศึกษา โดย C5AR1 (complement component 5a receptor 1) หรือ CD88 เป็นตัวรับชนิด G protein-coupled receptor ของคอมพลีเมนต์ C5a ซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวรับของคอมพลีเมนต์และปรับแต่งการตอบสนองที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบด้วยการส่งสัญญาณผ่านคีโมคายน์ (chemokine) และไซโตคายน์ (cytokine) โดยโมเลกุลที่มากระตุ้น คือ คอมพลีเมนต์ C5a ซึ่งเป็นสารที่ชักนำให้เกิดกระบวนการอักเสบได้มาก การศึกษาของ Markiewski และคณะ (2008) พบว่าการส่งสัญญาณผ่าน C5AR มีส่วนช่วยในการทำให้มะเร็งเติบโตขึ้นโดยไปยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่ต่อต้านต่อแอนติเจนของมะเร็ง นอกจากนี้ยังทำให้ myeloid-derived suppressor cell (MDSCs) เคลื่อนที่เข้ามาในก้อนมะเร็ง ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีหน้าที่ยับยั้งกระบวนการทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ผลโดยภาพรวมทำให้ยับยั้งการทำงานของลิมโฟไซต์ชนิดทีที่เป็นไซโตท๊อกซิกทีเซลล์ (CD8+ T cell) [61, 62] โดยทั่วไปแล้วมนุษย์จะมีการแสดงออกของยีน C5AR1 มากขึ้นในกลุ่มเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic cells) โดยเฉพาะในกลุ่มของเซลล์มัยอีลอยด์ที่มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น แต่จะพบการแสดงออกที่น้อยลงในกลุ่มเซลล์ลิมฟอยด์ Karsten และคณะ (2015) ได้ทำการศึกษาทดลองในหนูพบว่าไม่มีการแสดงออกของ C5AR1 ในกลุ่มเฮลเปอร์ทีเซลล์ (helper T cells, CD4+ T cells) ทั้งในการศึกษาที่ทำในหลอดทดลองและในร่างกายสัตว์ทดลอง [63] อย่างไรก็ตาม Arbore และคณะ (2016) ได้แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนของ C5AR1 ในเฮลเปอร์ทีเซลล์ของมนุษย์ โดยเฮลเปอร์ทีเซลล์ในสภาวะปกติ

จะมีการหลั่งฮอร์โมนจำพวก autocrine ไปทำให้การกระตุ้นการส่งสัญญาณของ C5AR มีความสมดุลเพื่อควบคุมการทำงานของ NLRP3 inflammasome [64] ดังนั้นการสร้างไซโตคายน์ของลิมโฟไซต์ชนิดทีจึงมีบทบาทสำคัญในกระบวนการของระบบภูมิคุ้มกัน และส่งผลต่อกระบวนการอักเสบในโรคต่างๆ ของร่างกายมนุษย์ ในปัจจุบันยังไม่ทราบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนของไซโตคายน์ต่อการเกิดมะเร็งในมนุษย์ ทางผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าการส่งสัญญาณผ่าน C5AR1 เป็นหนึ่งในกระบวนการควบคุมที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการป้องกันไม่ให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานมากเกินไป (immnue overactivation) และการแสดงออกของโปรตีน C5AR1 ที่ลดลงในลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กอาจจะเป็นหนึ่งในกระบวนการที่ต่อต้านการดื้อต่อระบบภูมิคุ้มกันในสภาพแวดล้อมระดับจุลภาคของมะเร็ง (tumor microenvoronement)

S100A12 หรือ S100 calcium-binding protein A12 เป็นโปรตีนในกลุ่ม S100 protein subfamily เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า calgranulins ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเม็ดเลือดขาวกลุ่มมัยอีลอยด์และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวัฏจักรของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ (cell differentiation) โดยโปรตีนกลุ่มนี้จะมีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน [65] และมีหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นกระบวนการอักเสบในร่างกายและยังเกี่ยวข้องกับโรคที่มีการอักเสบของอวัยวะต่างๆ รวมถึงโรคมะเร็งอีกด้วย [66] การศึกษาก่อนหน้าพบว่าโปรตีน S100A12 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเม็ดเลือดขาวกลุ่มมัยอีลอยด์แต่มีการแสดงออกที่น้อยในกลุ่มของเซลล์ลิมโฟไซต์และโมโนไซต์ ในปัจจุบันรายงานการแสดงออกของ S100A12 ของมะเร็งชนิดก้อนในมนุษย์ยังมีความขัดแย้งกัน Thierolf และคณะ (2008) รายงานว่าการแสดงออกของยีน S100A12 เพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยมะเร็งลำไส้ใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับอาสาสมัครกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง [67] อีกการศึกษาของ Huang และคณะ (2014) พบว่าการแสดงออกของ S100A12 อาจจะเป็นสารบ่งชี้การพยากรณ์โรคในการประเมินการกลับเป็นซ้ำหรือแพร่กระจายลุกลามของมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma) หลังการรักษาด้วยการผ่าตัด [68] ในทางกลับกันการศึกษาของ Gunaldi และคณะ (2015) ไม่พบความแตกต่างของระดับ S100A12 ในซีรั่ม (serum) ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรกลุ่มปกติ [69] นอกจากนี้มีการศึกษาของ calgranulins ที่สัมพันธ์กับเม็ดเลือดขาวกลุ่มมัยอีลอยด์ (myeloid-associated calgranulins) ซึ่งได้แก่ S100A8, S100A9 และ S100A12 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพที่ปอด ได้แก่ มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก โรคถุงลมโป่งพองเรื้อรัง เปรียบเทียบประชากรกลุ่มควบคุมที่ไม่มีโรคปอด ผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มนี้บนเม็ดเลือดขาวกลุ่มที่มีแกรนูล (granulocytes) และโมโนไซต์ของผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพที่ปอดไม่แตกต่างกับประชากรกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ในการศึกษาเดียวกันยังแสดงให้เห็นว่าระดับของ S100A12 ในซีรั่มที่ตรวจด้วยวิธีอีไลซา (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) ของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน [70] จากรายงานการศึกษาข้างต้นและผลการวิจัยครั้ง

นี้แสดงให้เห็นว่าการวัดระดับของ S100A12 ยังมีข้อจำกัดในแง่ประโยชน์ด้านการนำไปใช้เป็นสารบ่งชี้ในผู้ป่วยมะเร็งปอด

การพัฒนาสารบ่งชี้ทางชีวภาพของมะเร็งในปัจจุบัน ได้แก่ การตรวจหาเซลล์มะเร็งในเลือด (circulating tumor cells, CTC) ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ที่สามารถบ่งบอกการพยากรณ์โรคและผลการรักษามะเร็งได้ [71, 72] นอกจากนี้ระดับของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของมะเร็งในเลือด (circulatory cell-free fragments of DNA, cfDNA) ก็มีความสัมพันธ์กับปริมาณมะเร็งในร่างกายและการพยากรณ์ของโรคมะเร็ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับของชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของมะเร็งในเลือดอาจจะช่วยพยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาและใช้ติดตามความหลากหลายในระดับโมเลกุลของมะเร็ง (molecular heterogeneity of tumor) [73] แต่อย่างไรก็ตามการตรวจหาเซลล์มะเร็งในเลือดหรือการวัดระดับชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของมะเร็งในเลือดยังมีข้อจำกัดในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งระยะต้นเนื่องจากมีปริมาณเซลล์มะเร็งหรือสารพันธุกรรมของมะเร็งในกระแสเลือดน้อย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์และเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติ ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของการตรวจวิเคราะห์สัญญาณฟลูออเรสเซนต์จากวิธีการตรวจทั้ง 2 เทคนิค ดังนั้นการใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติน่าจะมีความเหมาะสมต่อการวัดปริมาณและความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของการย้อมแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงบนเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยทั่วไปการวัดการแสดงออกของโปรตีนบนกลุ่มประชากรที่จำเพาะของเซลล์ด้วยวิธีตามแบบแผนดั้งเดิมจำเป็นจะต้องคัดแยกเซลล์ให้ได้กลุ่มประชากรของเซลล์ที่ต้องการก่อนที่จะวัดการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคอีไลซาหรือวัดการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอซึ่งมีกระบวนการทำที่ซับซ้อนและใช้เวลามากกว่า ในการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า การใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติสามารถตรวจวัดปริมาณและความเข้มข้นของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของแอนติบอดีที่สนใจในเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่ต้องการศึกษาได้ด้วยเทคนิคการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ของแอนติบอดีควบคู่กัน ซึ่งการย้อมโดยใช้เทคนิคของอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์แบบ indirect immunofluorescence จะทำให้สามารถติดฉลากเซลล์และแอนติเจนด้วยแอนติบอดีที่ติดสารเรืองแสงที่แตกต่างกันได้ เมื่อเซลล์ที่ถูกติดฉลากด้วยแอนติบอดีที่มีสารเรืองแสงและทำให้แขวนลอยในของเหลวไหลผ่านระบบในตัวเครื่อง แสงเลเซอร์จะตกกระทบกับเซลล์แต่ละเซลล์ทำให้เกิดลำแสงหลายรูปแบบ ซึ่งลำแสงเหล่านี้จะถูกแยกออกจากกันด้วยตัวกรองแสง (filters) แล้วลำแสงต่างๆ จะถูกรวบรวมและตรวจสอบด้วยตัวรับสัญญาณ (detector) ที่จะเปลี่ยนสัญญาณแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้าที่เก็บข้อมูลและวิเคราะห์ได้ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ ด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เทคนิคของการคัดแยกแสง (gating technique) ทำให้สามารถวัดแอนติเจนที่จำเพาะบนผิวเซลล์ของกลุ่มประชากรของเซลล์ที่สนใจได้ในระดับเซลล์เดี่ยว [74] ซึ่งจากการศึกษานี้ที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบของสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ของการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้การแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในการแยกผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กออกจากคนที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง การตรวจแอนติเจนที่จำเพาะบนเซลล์ที่สนใจด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลล์อัตโนมัติสามารถทำได้เร็ว กระบวนการไม่ซับซ้อนและได้ผลวัดในเชิงกึ่งปริมาณ ทำให้การตรวจด้วยวิธีดังกล่าวอาจจะเป็นวิธีที่มีแนวโน้มจะนำไปพัฒนาเพื่อตรวจวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดในทางเวชปฏิบัติได้ ข้อดีของการตรวจวิธีนี้คืออาจจะทำให้ได้ข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการประเมินตัวโรคและติดตามโรคมะเร็งระหว่างที่ทำการรักษาได้ นอกจากนี้อาจจะนำไปพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการช่วยวินิจฉัยหรือคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งปอดในกลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงสูงได้ในอนาคต

5.2 สรุปผลการวิจัย

การแสดงออกของโปรตีนที่ควบคุมการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กระยะลุกลามแพร่กระจายมีความแตกต่างจากประชากรกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอด

5.3 ข้อดีของการศึกษานี้

เป็นการศึกษาแรกที่ทำการศึกษาถึงการแสดงออกในระดับโปรตีนของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอด และแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีที่แยกจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กมีความแตกต่างจากอาสาสมัครกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปอด ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สนับสนุนแนวคิดที่ว่ามะเร็งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะบนเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเป็นหนึ่งในกระบวนการต่อต้านมะเร็งและอาจจะใช้เป็นตัวบ่งชี้มะเร็งในการช่วยวินิจฉัยหรือติดตามผลการรักษาได้ในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.4 ข้อด้อยของการศึกษานี้

เนื่องจากเป็นการศึกษานำร่องทำให้ข้อจำกัดที่สำคัญของการศึกษานี้คือการใช้ประชากรกลุ่มเล็กเป็นตัวแทนในการศึกษาวิจัย และข้อมูลพื้นฐานของทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกัน ได้แก่ อายุ เพศ และประวัติการสูบบุหรี่ต่างกัน โดยกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดมีอายุเฉลี่ยเยอะกว่า สัดส่วนเพศชายต่อเพศหญิงสูงกว่า และมีผู้ที่สูบบุหรี่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำงานได้ลดลง เช่น การสูบบุหรี่ ภาวะทุพโภชนาการ การขาดกิจกรรมทางกาย (physical inactivity) เป็นต้น [75, 76] นอกเหนือจากนี้ยังมีรายงานถึงความสัมพันธ์ของอายุกับการเปลี่ยนแปลงของการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอีกด้วย [77-79] ดังนั้นการที่ประชากรสองกลุ่มมีข้อมูลพื้นฐานที่แตกต่างกันดังกล่าวอาจจะมีผลต่อผลการวิจัยได้

กลุ่มประชากรที่เป็นมะเร็งปอดที่นำมาวิเคราะห์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งปอดระยะแพร่กระจาย ซึ่งหมายรวมถึงการลุกลามแพร่กระจายไปปอดด้านตรงข้าม ไปเยื่อบุช่องโพรงปอดหรือเยื่อหุ้มหัวใจ หรือมีการแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่ต้องการศึกษาในวัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยและยังเป็นผู้ป่วยมะเร็งปอดส่วนใหญ่ในทางเวชปฏิบัติอีกด้วย โดยในการเก็บตัวอย่างผู้ป่วยในการวิจัยนี้ไม่ได้เก็บข้อมูลจากผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะต้น (ระยะ 1-3) ซึ่งเดิมตั้งเป็นวัตถุประสงค์รองของการวิจัย แต่ทั้งนี้เนื่องมาจากจำนวนของประชากรที่เป็นมะเร็งปอดที่เข้าร่วมการศึกษาในการศึกษานำร่องครั้งนี้มีจำนวนน้อย การเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยในมะเร็งปอดที่ระยะแตกต่างกันอาจจะทำให้ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยมีความแตกต่างกันมากขึ้นและอาจจะทำให้การแปลผลการศึกษาทำได้ยาก จึงพิจารณาทำการศึกษาวิจัยเฉพาะในผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะแพร่กระจายเท่านั้น

โปรตีนที่เลือกนำมาศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นโปรตีนที่มีข้อมูลว่ามีการทำงานที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิต้านทานของร่างกาย อย่างไรก็ตามระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ได้แก่ การติดเชื้อ การอักเสบต่างๆ ที่นอกเหนือจากมะเร็งอีกด้วย ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนดังกล่าวอาจจะไม่ได้จำเพาะกับผู้ป่วยมะเร็งเสมอไป และการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กซึ่งมีลักษณะทางพยาธิวิทยาที่แตกต่างกัน (ชนิดอะดีโนคาร์ซิโนมาร้อยละ 87 และไม่ใช่อะดีโนคาร์ซิโนมาร้อยละ 13) นอกเหนือจากนี้ยังมีชนิดของยีนกลายพันธุ์ก่อมะเร็งที่แตกต่างกันอีกด้วย ซึ่งการที่มีลักษณะทางพยาธิวิทยาหรือยีนกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันก็อาจจะทำให้เซลล์มะเร็งมีความแตกต่างกันในแง่ของกลไกการเกิดโรคที่แตกต่างกันและอาจจะมีการตอบสนองกับระบบภูมิต้านทานของร่างกายไม่เหมือนกันได้ แต่เนื่องจากประชากรแต่ละกลุ่มมีจำนวนน้อยจึงไม่สามารถวิเคราะห์ถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การศึกษานี้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดและเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีที่มีการแสดงออกของ CD3+ บนผิวเซลล์ ซึ่งไม่ได้เป็นกลุ่มประชากรของเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะ นอกเหนือจากนี้ลิมโฟไซต์ชนิดทีในเลือดที่แยกมาตรวจอาจจะไม่ได้เป็นตัวแทนของเซลล์ลิมโฟไซต์ในสภาพแวดล้อมระดับจุลภาคของมะเร็ง ถึงแม้การตรวจในกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่จำเพาะอย่างใดอย่างหนึ่งจะได้ข้อมูลที่มีความเที่ยงตรงและสะท้อนถึงการทำงานในแง่ระบบภูมิคุ้มกันที่ชัดเจนกว่า แต่การประเมินวัดผลเป็นกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายกว่า กระบวนการทำซับซ้อนน้อยกว่า ส่งผลให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ง่ายขึ้น

5.5 ข้อเสนอแนะ

พิจารณาทำการศึกษาในกลุ่มประชากรที่ใหญ่ขึ้น คัดเลือกอาสาสมัครกลุ่มควบคุมให้มีข้อมูลพื้นฐานที่ใกล้เคียงกับผู้ป่วยมะเร็ง ทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีระยะของโรคที่แตกต่างกันเพื่อดูความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบนเซลล์เม็ดเลือดขาวต่อปริมาณของเซลล์มะเร็งในร่างกาย นอกจากนี้ควรทำการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีพยาธิสภาพของปอดที่ไม่ใช่มะเร็ง เช่น โรคถุงลมโป่งพองเรื้อรัง โรคการอักเสบของปอดที่ไม่ใช่มะเร็ง โรคติดเชื้อ เป็นต้น เพื่อที่จะดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบนเม็ดเลือดขาวระหว่างกลุ่มที่เป็นมะเร็งและกลุ่มโรคอื่นๆ ที่มีพยาธิสภาพของปอดที่ไม่ใช่มะเร็ง นอกจากนี้อาจจะพิจารณาทำการศึกษาจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยมะเร็งปอดที่เวลาต่างๆ ระหว่างการรักษา เพื่อดูความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีนต่อการรักษาและปริมาณของมะเร็งในร่างกายของผู้ป่วยอีกด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. *World cancer factsheet. GLOBOCAN 2018*. 2018 [cited 2019 11/01/2019]; Available from: https://gco.iarc.fr.
2. *World Cancer Report 2014*. 2014, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
3. คณะกรรมการจัดทำแผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ, แผนการป้องกันและควบคุมโรคมะเร็งแห่งชาติ (*National Cancer Control Programmes)* พ.ศ. *2556-2560*. 2556, กรุงเทพฯ: สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์.
4. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* Ca-a Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
5. Molina, J.R., A.A. Adjei, and J.R. Jett, *Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer.* Chest, 2006. **130**(4): p. 1211-1219.
6. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2018.* Ca-a Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(1): p. 7-30.
7. Society, A.C., *Cancer Facts & Figures 2017*. 2017, American Cancer Society.
8. Humphrey, L.L., S. Teutsch, and M. Johnson, *Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: An update for the US Preventive Services Task Force.* Annals of Internal Medicine, 2004. **140**(9): p. 740-753.
9. National Lung Screening Trial Research, T., et al., *Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening.* N Engl J Med, 2011. **365**(5): p. 395-409.
10. Jett, J.R., *Limitations of screening for lung cancer with low-dose spiral computed tomography.* Clinical Cancer Research, 2005. **11**(13): p. 4988s-4992s.
11. Mazzone, P.J., et al., *Screening for Lung Cancer: CHEST Guideline and Expert Panel Report.* Chest, 2018. **153**(4): p. 954-985.
12. Tanoue, L.T., et al., *Lung Cancer Screening.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2015. **191**(1): p. 19-33.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

13. Showe, M.K., et al., *Gene Expression Profiles in Peripheral Blood Mononuclear Cells Can Distinguish Patients with Non-Small Cell Lung Cancer from Patients with Nonmalignant Lung Disease.* Cancer Research, 2009. **69**(24): p. 9202-9210.
14. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8 ed. 2017, Chicago: Springer International Publishing.
15. Ryan, H., A. Trosclair, and J. Gfroerer, *Adult current smoking: differences in definitions and prevalence estimates--NHIS and NSDUH, 2008.* J Environ Public Health, 2012. **2012**: p. 918368.
16. Oken, M.M., et al., *Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group.* Am J Clin Oncol, 1982. **5**(6): p. 649-55.
17. *Cancer in Thailand Vol.IX, 2013-2015*, I. W, et al., Editors. 2018: Bangkok.
18. Alberg, A.J. and J.M. Samet, *Epidemiology of lung cancer.* Chest, 2003. **123**(1): p. 21s-49s.
19. Bach, P. and M. Gould, *When the Average Applies to No One: Personalized Decision Making About Potential Benefits of Lung Cancer Screening.* Ann Intern Med, 2012. **157**: p. 571-573.
20. Field, J.K., et al., *European Randomized Lung Cancer Screening Trials: Post NLST.* Journal of Surgical Oncology, 2013. **108**(5): p. 280-286.
21. Hassanein, M., et al., *The State of Molecular Biomarkers for the Early Detection of Lung Cancer.* Cancer Prevention Research, 2012. **5**(8): p. 992-1006.
22. Ma, J., et al., *Differential miRNA expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of lung cancer.* Laboratory Investigation, 2015. **95**(10): p. 1197-1206.
23. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion.* Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-1570.
24. *MACS handbook: Blood*. 2019 [cited 2019 08/04/2019]; Available from: https://www.miltenyibiotec.com/UN-en/resources/macs-handbook/human-cells-and-organs/human-cell-sources/blood-human.html.
25. Kleiveland, C., *Peripheral blood mononuclear cells*, in *The impact of food bioactives on health in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors.

2015, Springer: Cham. p. 161-167.

26. Charles A Janeway, J., et al., *Immunobiology*. 5 ed. The Immune System in Health and Disease. 2001, New York: Garland Science.

27. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases elimination, equilibrium and escape.* Current Opinion in Immunology, 2014. **27**: p. 16-25.

28. Jung, C.Y. and S.J. Antonia, *Tumor Immunology and Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer.* Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2018. **81**(1): p. 29-41.

29. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.* Nature Medicine, 2004. **10**(9): p. 942-949.

30. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored.* Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-1102.

31. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer.* New England Journal of Medicine, 2003. **348**(3): p. 203-213.

32. Keenan, B. and E.M. Jaffee, *Immunotherapy in preneoplastic disease: targeting early procarcinogenic inflammatory changes that lead to immune suppression and tumor tolerance.* Renaissance of Cancer Immunotherapy, 2013. **1284**: p. 12-16.

33. Melief, C.J. and O.J. Finn, *Cancer immunology.* Curr Opin Immunol, 2011. **23**(2): p. 234-6.

34. Sharma, P., et al., *Early detection of breast cancer based on gene-expression patterns in peripheral blood cells.* Breast Cancer Research, 2005. **7**(5): p. R634-R644.

35. Baine, M.J., et al., *Transcriptional Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Pancreatic Cancer Patients Identifies Novel Genes with Potential Diagnostic Utility.* Plos One, 2011. **6**(2).

36. Cuzick, J., et al., *Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study.* Lancet Oncology, 2011. **12**(3): p. 245-255.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

37. Sotiriou, C., et al., *Gene expression profiling in breast cancer: Understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis.* Jnci-Journal of the National Cancer Institute, 2006. **98**(4): p. 262-272.
38. van de Vijver, M.J., et al., *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.* New England Journal of Medicine, 2002. **347**(25): p. 1999-2009.
39. Moody, D., *Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression.* J Anim Sci, 2001. **79**(E. Suppl.): p. E128-35.
40. Masud, R., et al., *Gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in the setting of peripheral arterial disease.* J Clin Bioinforma, 2012. **2**: p. 6.
41. Rotunno, M., et al., *A Gene Expression Signature from Peripheral Whole Blood for Stage I Lung Adenocarcinoma.* Cancer Prevention Research, 2011. **4**(10): p. 1599-1608.
42. Dumeaux, V., et al., *Peripheral blood cells inform on the presence of breast cancer: A population-based case-control study.* International Journal of Cancer, 2015. **136**(3): p. 656-667.
43. Inman, K.S., A.A. Francis, and N.R. Murray, *Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer.* World Journal of Gastroenterology, 2014. **20**(32): p. 11160-11181.
44. Zander, T., et al., *Blood-Based Gene Expression Signatures in Non-Small Cell Lung Cancer.* Clinical Cancer Research, 2011. **17**(10): p. 3360-3367.
45. Kawaguchi, K., et al., *Altered expression of major immune regulatory molecules in peripheral blood immune cells associated with breast cancer.* Breast Cancer, 2017. **24**(1): p. 111-120.
46. Burczynski, M.E., et al., *Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma.* Clinical Cancer Research, 2005. **11**(3): p. 1181-1189.
47. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle.* Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
48. Kossenkov, A.V., et al., *Peripheral Immune Cell Gene Expression Predicts Survival of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer.* Plos One, 2012. **7**(3).
49. Chen, Y.C., et al., *Peripheral Immune Cell Gene Expression Changes in*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with First Line Combination Chemotherapy. Plos One, 2013. **8**(2).

50. Russo, G., C. Zegar, and A. Giordano, *Advantages and limitations of microarray technology in human cancer.* Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6497-6507.

51. Abreu, R.D., et al., *Global signatures of protein and mRNA expression levels.* Molecular Biosystems, 2009. **5**(12): p. 1512-1526.

52. Edfors, F., et al., *Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues.* Molecular Systems Biology, 2016. **12**(10).

53. Wilhelm, M., et al., *Mass-spectrometry-based draft of the human proteome.* Nature, 2014. **509**(7502): p. 582-+.

54. Aporntewan, C. and A. Mutirangura, *Connection up- and down-regulation expression analysis of microarrays (CU-DREAM): a physiogenomic discovery tool.* Asian Biomedicine, 2011. **5**(2): p. 257-262.

55. Murdoch, D.J., *Venn Diagrams in R.* J Stat Softw, 2004. **11**: p. 1-3.

56. Information, N.C.f.B., *Gene.* 2019, U.S. National Library of Medicine: Bethesda MD.

57. Project, G.O.P.A. 2019, National Human Genome Research Institute and the National Science Foundation.

58. Uhlen, M., et al., *A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics.* Molecular & Cellular Proteomics, 2005. **4**(12): p. 1920-1932.

59. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Development Core Team. 2016, Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

60. Boon, T., et al., *Tumor-Antigens Recognized by T-Lymphocytes.* Annual Review of Immunology, 1994. **12**: p. 337-365.

61. Markiewski, M.M., et al., *Modulation of the antitumor immune response by complement.* Nature Immunology, 2008. **9**(11): p. 1225-1235.

62. Movahedi, K., et al., *Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity.* Blood, 2008. **111**(8): p. 4233-4244.

63. Karsten, C.M., et al., *Monitoring and Cell-Specific Deletion of C5aR1 Using a*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Novel Floxed GFP-C5aR1 Reporter Knock-in Mouse. Journal of Immunology, 2015. **194**(4): p. 1841-1855.

64. Arbore, G., et al., *T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells.* Science, 2016. **352**(6292).

65. Funk, S., et al., *High S100A8 and S100A12 protein expression is a favorable prognostic factor for survival of oropharyngeal squamous cell carcinoma.* International Journal of Cancer, 2015. **136**(9): p. 2037-2046.

66. Goyette, J. and C.L. Geczy, *Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function.* Amino Acids, 2011. **41**(4): p. 821-842.

67. Thierolf, M., et al., *Towards a comprehensive proteome of normal and malignant human colon tissue by 2-D-LC-ESI-MS and 2-DE proteomics and identification of S100A12 as potential cancer biomarker.* Proteomics Clinical Applications, 2008. **2**(1): p. 11-22.

68. Huang, X.H., et al., *Quantitative proteomics analysis of early recurrence/metastasis of huge hepatocellular carcinoma following radical resection.* Proteome Science, 2014. **12**.

69. Gunaldi, M., et al., *Diagnostic importance of S100A9 and S100A12 in breast cancer.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015. **76**: p. 52-56.

70. Lim, M.Y., et al., *S100A8, S100A9 and S100A12 Expression in myeloid cells from whole blood from patients with common lung diseases.* Pulmonary and Critical Care Medicine, 2017. **1**(4): p. 1-10.

71. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer.* New England Journal of Medicine, 2004. **351**(8): p. 781-791.

72. Hayes, D.F., et al., *Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival.* Clinical Cancer Research, 2006. **12**(14): p. 4218-4224.

73. Diaz, L.A. and A. Bardelli, *Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA.* Journal of Clinical Oncology, 2014. **32**(6): p. 579-+.

74. Moskalensky, A.E., et al., *Dynamic quantification of antigen molecules with flow cytometry.* Journal of Immunological Methods, 2015. **418**: p. 66-74.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

75. Mian, M.F., et al., *Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke.* J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 774-84.

76. Webb, A.L. and E. Villamor, *Update: Effects of antioxidant and non-antioxidant vitamin supplementation on immune function.* Nutrition Reviews, 2007. **65**(5): p. 181-217.

77. Plowden, J., et al., *Innate immunity in aging: impact on macrophage function.* Aging Cell, 2004. **3**(4): p. 161-167.

78. Salam, N., et al., *T cell ageing: Effects of age on development, survival & function.* Indian Journal of Medical Research, 2013. **138**: p. 595-608.

79. Solana, R., et al., *Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans.* Seminars in Immunology, 2012. **24**(5): p. 331-341.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

แบบบันทึกข้อมูลผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

Part A: Demographic characteristics at the first visit

1. Date of birth ☐☐/☐☐/☐☐☐☐ or age = ☐☐ years old
Enter in DD/MM/YYYY format in BE year eg., 27/02/2498

2. Province of residence: ………………………………First 2 zip code ☐☐

3. Gender : ☐ 1. Male ☐ 2. Female

4. Weight: ☐☐☐.☐ Kg. Height: ☐☐☐.☐ cm.

5. Underlying disease: ☐ 1. No ☐ 2. Yes, specified ……………………………………

6. History of prior malignancy: ☐ 1. No ☐ 2. Yes, specified ……………………………..

7. History of malignancy in family: ☐ 1. No ☐ 2. Yes, specified ………………………...

8. History of smoking exposure: ☐ -9. Not available → Skip to Question #9
   1) Ever been a smoker? ☐ 1. Yes ☐ 2. No → Skip to Question #9
   2) Duration of smoking: ☐☐ years ☐ -9.Not available
   3) Duration after the last smoking: ☐☐ years ☐ -8.Not stop yet ☐ -9.Not available
   4) Average cigarettes smoked per day at time of smoking: ☐☐

Part B: Diagnosis

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

9. Date of first diagnosed NSCLC: (1st pathology date) ☐☐/☐☐/2 5☐☐

10. Tumor histology: ☐ 1. Adenocarcinoma ☐ 2. Squamous cell ☐ 3. Large cell undiff
    ☐ 4. NSCLC NOS ☐ 5. Others ………………………………..

11. Initial Staging: ☐ Clinical staging ☐ Surgical staging
    T= ☐ SIZE…..cm N= ☐ …./…. M= ☐ Stage= ☐

12. Pathological data: Primary tumor location …………..
    Grading………..
    Margin status …………
    Nodal staging ☐ N1…………………………
    ☐ N2…………………………
    ☐ N3…………………………

Part C: Investigation results

1. Total cell count ………………………
2. Total CD3+ cells ……………………… Total CD45+ cells ………………………
3. The percentage of fluorescence cell staining:

   CLEC4A positive cells …………………………… = ……………… %

   CLEC4D positive cells …………………………… = ……………… %

   C5AR1 positive cells ………………………...…… = ……………… %

   NLRP3 positive cells …………………………...… = ……………… %

   S100A12 positive cells …………………………… = ……………… %

4. The intensity of fluorescence:

   CLEC4A positive cells ……………………………

   CLEC4D positive cells ……………………………

   C5AR1 positive cells ………………………...……

   NLRP3 positive cells …………………………...…

   S100A12 positive cells ……………………………

Date of completion this CRF	
☐☐/☐☐/2 5 ☐☐	Completed by ………………...……………

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวจิรวดี สถิตย์เรืองศักดิ์
วัน เดือน ปี เกิด	29 ตุลาคม 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดสงขลา
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2551 แพทยศาสตร์บัณฑิต พ.ศ.2555 วุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญประกอบวิชาชีพเวชกรรมสาขาอายุรศาสตร์ พ.ศ.2555 ประกาศนียบัตรชั้นสูง สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ที่อยู่ปัจจุบัน	ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ถนนกาญจนวานิช ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
ผลงานตีพิมพ์	1. Klewes L, Vallente R, Dupas E, Brand C, Grün D, Guffei A, Sathitruangsak C, Awe JA, Kuzyk A, Lichtensztejn D, Tammur P, Ilus T, Tamm A, Punab M, Rubinger M, Olujohungbe A, Mai S. Three-dimensional nuclear telomere organization in multiple myeloma. Transl Oncol 2013. 6(6):749–756. 2. Tanapathomsinchai N, Dechaphunkul A, Sathitruangsak C. Cancer-associated thromboembolism. Songkla Med J 2014;32(3):185-193. 3. Sathitruangsak C, Dechaphunkul A. Neurological complications of chemotherapy and radiotherapy in cancer patients. Songkla Med J 2014;32(4):259-270. 4. Righolt CH, Sathitruangsak C, Knecht H, Mai S. Interphase superresolution DNA structure in hematological malignancies (abstract). J Nucl Med 2015;56(suppl 1):3A-28. 5. Sathitruangsak C, Righolt CH, Klewes L, Tammur P, Ilus T, Tamm A, Punab M, Olujohungbe A, Mai S. Quantitative superresolution microscopy reveals differences in nuclear DNA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

organization of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. J Cell Biochem 2015;116(5):704-710.
6. Sunpaweravong S, Sunpaweravong P, Sathitruangsak C, Mai S. Three-dimensional telomere architecture of esophageal squamous cell carcinoma: comparison of tumor and normal epithelial cells. Dis Esophagus 2016;29(4):307-13.
7. Dechaphunkul A, Sakdejayont S, Sathitruangsak C, Sunpaweravong P. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with primary mediastinal germ cell tumors: 10-years' experience at a single institution with a bleomycin-containing regimen. Oncol Res Treat 2016;39(11):688-94.
8. Sathitruangsak C, Righolt CH, Klewes L, Tung Chang D, Kotb R, Mai S. Distinct and shared three-dimensional chromosome organization patterns in lymphocytes, monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. Int J Cancer 2017;140(2):400-10.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University