

ปีที่ 37 ฉบับที่ 3
กรกฎาคม-กันยายน 2560

นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Articles)

- ความชุกและแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ชนิดสร้างเอนไซม์ Extended Spectrum Beta-Lactamase ในผู้ป่วยมะเร็ง
- การตรวจหาระดับการแสดงออกของ HPV E6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อไวรัส ฮิวแมนแพปพิโลมาสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค
- Plasma MMP-13 Level in Patients with Invasive Ductal Breast Cancer

บทพิเศษวิชาการ (Review Articles)

- p95HER2 กับมะเร็งเต้านม

Vol. 37 No. 3
July-September 2017

ISSN 0125-2038



วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL



ISSN 0125-2038

มูลนิธิวิจัยโรคมะเร็งเพื่อสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

บรรณาธิการ

ธีรภูมิ คุณะเปรมะ

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

เจริญญา งามขำ

ศุภีพร แสงกระจ่าง

สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์

อารีย์ ประสิทธิพวงศ์

คณะบรรณาธิการ

กิตติศักดิ์ เทพสุวรรณ

กวิญญู ลีละวัฒน์

दनัย ทิวาเวช

ถวิล กลิ่นวิมล

ธนเดช สินธุเสก

ธนุ ลอบันดิส

ประเสริฐ เลิศสงวนสินชัย

ประติรพ ปุณโณทก

ปัญญารัตน์ ลาภวงศ์วัฒนา

เพชรินทร์ ศรีวัฒนกุล

วัชรพงศ์ พุทธิสวัสดิ์

วิสิทธิ์ สุภครพงษ์กุล

วีรภูมิ อิมสำราญ

วิจิต อาภรณ์วิรัตน์

วุฒิ สุขเมธโชติเมธา

วสันต์ ลีนะสมิต

สมเกียรติ ลลิตวงศา

สมจินต์ จินดาวิจักษณ์

สมชาย ธนะสิทธิชัย

สุดสวาท เลาหวินิจ

สุพล มโนรมณ์

สุวัฒน์ จริยาเลิศศักดิ์

อนันต์ กรลักษณ์

อาคม ชัยวีระวัฒน์

อรรช เยี่ยมอารีรัตน์

อรรถสิทธิ์ ศรีสุบัติ

ผู้จัดการ

ปฐมพร ศิริประภาศิริ

ผู้ช่วยผู้จัดการ

มลินี สนธิไชย

จุฑารัตน์ ไข่ทา

พิมพ์ที่ บริษัท โสติดการพิมพ์ จำกัด

373 ถ.เจริญสนิทวงศ์ แขวงบางซื่อ เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700 โทร. 0-2424-8715 แฟกซ์ 0-2879-7082



วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL



ISSN 0125-2038

Cancer Research Foundation for National Cancer Institute

Editor-in-Chief

Thiravud Khuhaprema

Assistant Editors

Jarunya Ngamkham

Suleeporn Sangrajrang

Sunanta Chariyalertsak

Aree Prasitthipayong

Editorial Board

Kitisak Thepsuwan

Kawin Leelawat

Danai Tiwawech

Tawin Klinvimol

Tanadej Sinthusake

Dhanoo Lawbundis

Prasert Lertsanguansinchai

Pratirop Poonotoke

Punyarat Lapvongwatana

Petcharin Srivatanakul

Vajarabhongsa Bhuddisawasdi

Wisit Supakarapongkul

Weerawut Imsamran

Vichit Arpornwirat

Wutthi Sumetchotimaytha

Vasant Linasmita

Somkiat Lalitwongsa

Somjin Chindavijak

Somchai Thanasitthichai

Sudsawat Laohavinij

Suphon Manoromana

Suwat Chariyalertsak

Anant Karalak

Arkorn Chaiwerawattana

Orachorn Aimarreerat

Attasit Srisubat

Managing Editor

Pathomphorn Siraprapasiri

Assistant Managers

Malinee Sontichai

Chutarat Khaita

KOSIT PRESS COMPANY LIMITED

373 Charansanitwong Rd., Bang-ow, Bangplad, Bangkok 10700 Tel. 0-2424-8715, 0-2433-3011



วารสารโรคมะเร็ง
THAI CANCER JOURNAL



- วัตถุประสงค์** เพื่อเผยแพร่ความรู้ทางวิชาการ ผลงานวิจัยเกี่ยวกับโรคมะเร็ง และอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง
- สำนักงาน** สำนักงานวารสารโรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ
268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทร. 0-2202-6800 ต่อ 2205
โทรสาร 0-2644-9097
- เว็บไซต์เผยแพร่** www.nci.go.th, www.kmnci.com/km/,
<http://thailand.digitaljournals.org/index.php/TCJ>
- กำหนดการตีพิมพ์** กำหนดออกทุก 3 เดือน ปีละ 4 ฉบับ (มกราคม-มีนาคม,
เมษายน-มิถุนายน, กรกฎาคม-กันยายน, ตุลาคม-ธันวาคม)
- การส่งต้นฉบับ** บรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
โทร. 0-2202-6800 ต่อ 2205
โทรสาร 0-2644-9097
E - mail : thaicancerj@gmail.com
- การบอกรับเป็นสมาชิก**
- ห้องสมุดและหน่วยงานราชการแจ้งความจำนงค์ที่สำนักงานวารสารโรคมะเร็งโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย
 - หน่วยงานเอกชนและผู้สนใจส่งแบบฟอร์มสมัครสมาชิกที่สำนักงานวารสารโรคมะเร็ง อัตราค่าสมาชิก 200 บาท ต่อปี (4 ฉบับ) รวมค่าจัดส่งและโอนเงินผ่านบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) สาขารามาธิบดี เลขที่บัญชี 026-228501-4
ชื่อบัญชี เงินสำรองจ่ายของมูลนิธิวิจัยโรคมะเร็ง



สารบัญ Content

ปีที่ 37 ฉบับที่ 3

กรกฎาคม-กันยายน 2560

หน้า

นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Articles)

- ความชุกและแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ชนิดสร้างเอนไซม์ Extended Spectrum Beta-Lactamase ในผู้ป่วยมะเร็ง

มยุรี ยอดอินทร์, ธัชกร อัครคงคารัตน์, อัจฉราพรพรณ ลิ้มพัฒน์สาร

85

- การตรวจหาระดับการแสดงออกของ HPVE6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพพพิโลมาสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค

จรัญญา งามขำ, อุษณีย์ พรหมประกอบ, พล กองจันทร์, เทียนแสง พันธุ์ศรี

94

- Plasma MMP-13 Level in Patients with Invasive Ductal Breast Cancer

Nuntana Meesiripan, Nonglucksanawan Ritthisunthorn, Anong Tepsuwan, Wassana Tangthai, Thitiluck Swangsri, Tipparat Thiangtrongjit, Jaree Svedginda, Santi Maneewatchararangsri, Porntip Chavalitchewinkoon-Petmitr, Somchai Thanasitthichai, Songsak Petmitr

105

บทพิเคราะห์วิชาการ (Review Articles)

- p95HER2 กับมะเร็งเต้านม

อดิสร เจริญปิยะวงศ์, อนันท์นุช ศักดิ์อภิบุญนันท์, สมชาย ธนะสิทธิชัย

114

- คำแนะนำการส่งต้นฉบับ

123

- หนังสือแจ้งความจำนงค์โฆษณาในวารสารฯ

125

- ใบสมัครสมาชิก/ใบต่ออายุสมาชิกวารสารฯ

126

ความชุกและแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ชนิดสร้างเอนไซม์ Extended Spectrum Beta-Lactamase ในผู้ป่วยมะเร็ง

มยุรี ยอดอินทร์
ธัชกร อัครคงคารัตน์
อัจฉราพรรณ สิมะพัฒนสาร

บทคัดย่อ ปัญหาเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยากลุ่ม beta-lactam พบมากในเชื้อแกรมลบรูปแท่งโดยเฉพาะกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ beta-lactamase ชนิดฤทธิ์ขยาย (extended spectrum beta-lactamase; ESBL) ที่มีฤทธิ์ทำลายยาเช่น penicillins, cephalosporins ยกเว้น carbapenems มีผลทำให้เชื้อดื้อยาในกลุ่ม beta-lactam ทั้งหมด เชื้อที่มักพบว่าการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ปัจจุบันพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL ที่แยกได้จากผู้ป่วยเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล นอกจากนั้นการใช้ยาในกลุ่ม carbapenems เช่น ertapenem, imipenem และ meropenem เป็นยาทางเลือกลำดับแรก (drug of choice) ในการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุกและแบบแผนความไวต่อยา carbapenems ของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL โดยการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2556-2559 ทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธียืนยันทางฟีโนไทป์ (phenotypic confirmatory test) และรวบรวมข้อมูลจากแบบแผนความไวต่อยา carbapenems จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ผลการศึกษาพบเชื้อทั้งหมดจำนวน 3830 isolates เป็น *E. coli* จำนวน 788 isolates (ร้อยละ 20.57) และ *K. pneumoniae* จำนวน 389 isolates (ร้อยละ 10.15) และพบเป็นเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ชนิดที่สร้าง ESBL ร้อยละ 51.52 และ 33.93 ตามลำดับ ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อยา carbapenems พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง ESBL มีความไวต่อยากลุ่ม carbapenem คือ ertapenem, imipenem และ meropenem มากกว่าร้อยละ 90 ในขณะที่เชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL มีความไวน้อยกว่า โดยพบว่าร้อยละ 69 มีความไวต่อยา ertapenem และมากกว่าร้อยละ 80 ไวต่อยา imipenem และ meropenem (วารสารโรคมะเร็ง 2560;37:85-93)

คำสำคัญ: beta-lactamase ชนิดขยาย *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* แบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ

The Prevalence and Antibiotic Susceptibility Patterns of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Cancer Patients

by Mayuree Yodin, Thadchaporn Assawakongkarat, Autcharapan Simapattanasan

Microbiology Section, Department of Medical Technology, National Cancer Institute, Bangkok

Abstract The problem of beta-lactam antibiotic-resistant bacteria was mainly found in gram-negative bacilli, especially the family Enterobacteriaceae, which can produce beta-lactamase, which has the ability to reduce the efficacy of antibiotics such as penicillins and cephalosporins, but not carbapenems. This enzyme, extended spectrum beta-lactamase (ESBL) causes the bacteria to resist all beta-lactam antibiotics. The two main bacteria, *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), which can produce ESBLs, are the most common bacteria causing infections in hospitals. In additions, carbapenems e.g., ertapenem, imipenem, and meropenem, are broad-spectrum antibiotics and drugs of choice for the treatment of severe gram-negative bacterial infections. This study aimed to find the prevalence and carbapenem susceptibility patterns of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates collected from clinical specimens of patients at the National Cancer Institute (NCI), during 2013-2016. The phenotypic confirmatory test was used to determine ESBL production and susceptibility testing data were collected from the microbiology laboratory of the NCI. It was found that, of the total 3830 isolated organisms, 788 (20.57%) were isolates of *E. coli* and 389 (10.15%) isolates of *K. pneumoniae*. The ESBL-producing strains of *E. coli* and *K. pneumoniae* were 51.52% and 33.93%, respectively. The findings of susceptibility to carbapenem indicated that > 90% of ESBL-producing *E. coli* were susceptible to ertapenem, imipenem, and meropenem while 69% of ESBL producing *K. pneumoniae* were susceptible to ertapenem and > 80% susceptible to imipenem and meropenem. (*Thai Cancer J* 2017;37:85-93)

Keywords: extended spectrum beta-lactamase, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic susceptibility patterns

บทนำ

โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยเมื่อเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล และสามารถพบได้ในโรงพยาบาลทุกระดับ แต่ละปีมีรายงานการพบผู้ป่วยติดเชื้อในระหว่างเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นสาเหตุให้อาการของผู้ป่วยมีความรุนแรงขึ้นหรือต้องอยู่ในโรงพยาบาลนานขึ้น โดยทั่วไปสามารถพบการติดเชื้อในผู้ป่วยจากตำแหน่งสำคัญต่าง ๆ เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะและแผลผ่าตัด เป็นต้น เชื้อก่อโรคที่พบบ่อย คือ เชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่สำคัญ ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*),

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) ซึ่งปัจจุบันเชื้อสามารถพัฒนาการดื้อยามากขึ้น ทำให้การรักษา มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นและต้องใช้เวลาในการกำจัดเชื้อให้หมดไป ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ โคโลนีมีลักษณะแห้ง เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร แต่บางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วง โรคติดเชื้อนอก ระบบทางเดินอาหาร เช่น บาดแผล ในกระแสโลหิต เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปอดอักเสบ ในระบบทางเดินปัสสาวะ โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรีย ดังกล่าวมีการพัฒนาการดื้อยาที่เรียกว่า extended-spectrum

beta-lactamase (ESBL) เชื้อชนิดนี้สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ทำลายยาในกลุ่ม beta-lactams ส่วนลักษณะทั่วไปของเชื้อ *K. pneumoniae* เป็นแบคทีเรียย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้ มีแคปซูลหนา โคโลนีมีลักษณะเหนียวเยิ้ม (mucoid colony) แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้เกิดปอดอักเสบ โรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ บางสายพันธุ์ที่สร้าง enterotoxin ก่อให้เกิดอุจจาระร่วง ในปัจจุบันพบว่า *K. pneumoniae* ที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลมีการดื้อยาเหมือน *E. coli*¹

ยาในกลุ่ม beta-lactam เป็นสารต้านจุลชีพกลุ่มใหญ่ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แบ่งเป็นกลุ่มย่อย เช่น penicillins, cephalosporins, carbapenems² โรคติดเชื้อรุนแรงจากวงศ์ Enterobacteriaceae จะใช้ยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 เช่น cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime ในการรักษา ต่อมาพบว่าเชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีกลไกการผลิตเอนไซม์ extended spectrum beta-lactamase (ESBL) หรือ plasmid-mediated AmpC beta-lactamase (pAmpC)³ ส่วนยาในกลุ่ม carbapenems เช่น ertapenem, imipenem และ meropenem เป็นยาที่ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้กว้างที่สุดโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบเพราะทนต่อเอนไซม์ beta-lactamase ได้หลายชนิดรวมทั้งเอนไซม์ ESBL และ AmpC ดังนั้นยาในกลุ่ม carbapenems จึงเป็นยาทางเลือกลำดับแรก (drug of choice) ในการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยาซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในลำดับต้น ๆ ในขณะนี้ เนื่องจากมียาที่ใช้รักษาอย่างจำกัด

หรือมีทางเลือกน้อยลง ปัจจุบันเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae พบว่าเริ่มมีการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems⁴ จึงเป็นที่กังวลใจว่าในอนาคตอันใกล้ เราอาจถึงจุดที่ไม่มียารักษาโรคติดเชื้อรุนแรงในโรงพยาบาลได้เลย อาจกล่าวได้ว่า เชื้อ carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) เป็นภาวะวิกฤตของการรักษาภาวะติดเชื้อแบคทีเรีย กลไกหลักในการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems คือ เชื้อดัดแปลงโปรตีน porins ซึ่งเป็นทางผ่านของยาหรือมีการขาดหายไป ของ porins ทำให้ยาเข้าไปในเซลล์ได้น้อยลงร่วมกับเชื้อผลิตเอนไซม์ chromosomal AmpC (cephalosporinase) ในปริมาณที่สูงขึ้น หรือมีการปั๊มยาออกนอกเซลล์มากขึ้น (efflux pump) นอกจากนี้กลไกที่สำคัญอีกกลไกหนึ่ง คือ เชื้อผลิตเอนไซม์ carbapenem-hydrolysing beta-lactamase หรือ carbapenemase ซึ่งสลายยาในกลุ่ม carbapenems ได้โดยตรง ยีนที่กำหนดเอนไซม์เหล่านี้หากพบบนพลาสมิดหรือมี mobile genetic elements เช่น transposon หรือ integron รวมด้วยก็มีโอกาสที่ยีนดื้อยาเหล่านี้จะแพร่กระจายไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ แม้ว่าอัตราการดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ในวงศ์ Enterobacteriaceae ยังน้อยมากหรือบางแห่งยังให้ผลไวต่อยาร้อยละ 100 แต่ปัจจุบันเริ่มมีรายงานว่าเชื้อวงศ์นี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง⁵

การรักษาผู้ป่วยมะเร็งจำเป็นต้องรักษาด้วยวิธีผสมผสานได้แก่ ศัลยกรรม รังสีรักษา และเคมีบำบัด^{6,7} ซึ่งทำให้ผู้ป่วยได้รับผลกระทบอย่างรุนแรงต่อไขกระดูกที่ทำหน้าที่สร้างภูมิคุ้มกันต้านทานโรค เป็นผลให้เซลล์ไขกระดูกถูกทำลายและมีจำนวนลดลง ผู้ป่วย

เกิดภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เสี่ยงต่อการเกิดโรคติดเชื้อได้ง่ายโดยเฉพาะโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย^{8,9} การรักษาโรคติดเชื้อในผู้ป่วยมะเร็งต้องได้รับการวินิจฉัยอย่างถูกต้องและรวดเร็ว เนื่องจากผู้ป่วยมักมีอาการรุนแรงกว่าคนปกติ และอาจถึงแก่ชีวิตได้ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ extended spectrum beta lactamase (ESBL) ซึ่งพบมากที่สุดในการติดเชื้อในผู้ป่วยมะเร็งในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ และแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพ carbapenems เพื่อติดตามแนวโน้มการเกิดเชื้อดื้อยาและการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อดื้อยาในสถาบันมะเร็งแห่งชาติต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สิ่งส่งตรวจ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ เชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2559 ที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการศึกษามีการระบุตำแหน่งที่เก็บ คือ ปัสสาวะ เสมหะ อุจจาระ แผลหนองเลือด และน้ำหล่อเลี้ยงอวัยวะภายในต่าง ๆ

การเพาะแยกและจำแนกชนิดของเชื้อจุลชีพ

ผู้วิจัยเพาะแยกเชื้อโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะ ทำการจำแนกเชื้อตามลักษณะของโคโลนี ย้อมสีแกรม และคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยปฏิบัติตามคู่มือปฏิบัติงานของงานจุลชีววิทยา

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และตามเกณฑ์มาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)

การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวของสารต้านจุลชีพ ใช้วิธี disc diffusion method ของ Kirby-Bauer โดยมีขั้นตอนดังนี้ ป้ายโคโลนีเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion broth (BHI) นำไปเพาะเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาปรับความขุ่นโดยผสมลงใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน โดยใช้เครื่องวัดความขุ่นที่มีความจำเพาะ 0.5 McFarland standard เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 1.5×10^8 colony forming unit/ml (CFU/ml) จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่มีการปรับความขุ่นแล้วป้ายที่ ขุนบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) 3 ระบาย แต่ละระบาย ทำมุมกันประมาณ 60 องศา เพื่อให้แบคทีเรียกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และวางแผ่นสารต้านจุลชีพ ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg) และ meropenem (10 µg) บนจานอาหาร แล้วกดเบา ๆ เพื่อให้ติดแน่นกับผิวหน้าอาหาร นำจานอาหารไปบ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำจานอาหารออกมาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่นยา มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร นำไปเปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและแปลผลตามตารางใน CLSI รายงานผลเป็นความไว (susceptible; S) ไวปานกลาง (intermediate; I) หรือดื้อ (resistant; R) อีกทั้งยังมีการทดสอบหาเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธียืนยันทางฟีนไทป์ (pheno-

typic confirmatory test) ในแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม Enterobacteriaceae ตามเกณฑ์ที่กำหนดใน CLSI¹⁰⁻¹³

การควบคุมคุณภาพของวิธีการทดสอบโดยใช้เชื้อจุลชีพมาตรฐานที่ทราบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง inhibition zone ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เป็นตัวแทนแกรมบวก *E. coli* ATCC 25922 เป็นตัวแทนแกรมลบกลุ่ม Enterobacteriaceae และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม non fermented gram-negative bacteria (NFB) และ *K. pneumoniae* ATCC 700603 เป็นตัวแทนในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ ESBL

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผู้วิจัยวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา แสดงค่าความถี่ ค่าเฉลี่ย และร้อยละ

ผลการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2556-2559 พบเชื้อทั้งหมดจำนวน 3830 isolates โดยพบเป็น *E. coli* จำนวน 788 isolates (ร้อยละ 20.57) และ *K. pneumoniae* จำนวน 389 isolates (ร้อยละ 10.15) พบความชุกของ *E. coli* ที่สร้าง ESBL ในผู้ป่วยมะเร็งระหว่าง ปี พ.ศ. 2556-2559 ร้อยละ 51.52 และ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL ร้อยละ 33.93 (ตารางที่ 1) และพบว่า *E. coli* ที่สร้าง ESBL ยังคงมีความไวต่อกุ่มยา carbapenem (ertapenem, imipenem และ meropenem) ร้อยละ 93, 96 และ 96 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ส่วนเชื้อ *K. pneumoniae*

ที่สร้าง ESBL มีความไวต่อยาดังกล่าวร้อยละ 69, 86 และ 81 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาความชุกของการติดเชื้อแบคทีเรียในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2556 ถึง 2559 พบผู้ป่วยติดเชื้อ *E. coli* มากที่สุดโดยพบร้อยละ 20.57 สอดคล้องกับข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาจุลชีพ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จากโรงพยาบาลทั่วประเทศ จำนวน 46 แห่งในปี พ.ศ. 2556 และมากกว่า 50 แห่งในปี พ.ศ. 2557 ถึง 2558 ส่วนปี พ.ศ. 2559 มีจำนวน 33 แห่ง โดยพบร้อยละ 15.4, 20, 21.6 และ 22.0 ตามลำดับ¹⁴ ซึ่งข้อมูลจาก NIMS hospital ของประเทศไทยอินเดียในปี พ.ศ. 2554 ถึง 2555 ก็พบ *E. coli* มากที่สุดสูงถึงร้อยละ 45.0¹⁵ จากการศึกษาความชุกของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในสถาบันมะเร็งแห่งชาติช่วงปี พ.ศ. 2556-2559 พบร้อยละ 51.52 และ 33.93 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่น ๆ พบว่ามีความแตกต่างกัน โดยพบเป็น *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL มากกว่า *E. coli* ที่สร้าง ESBL เช่น การศึกษาในโรงพยาบาลพุทธชินราช ในปี พ.ศ. 2552 พบเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง ESBL ร้อยละ 34.0 ส่วนเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL พบร้อยละ 49¹⁶ และยังพบเชื้อดื้อยาที่เป็นปัญหาของอีกหลายพื้นที่ เช่น การศึกษาของโรงพยาบาลเชียงใหม่ระหว่างปี พ.ศ. 2554 ถึง 2555 พบ *E. coli* ที่สร้าง ESBL ร้อยละ 30.37 และ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL ร้อยละ 43.66¹⁷ ในขณะที่การศึกษาของโรงพยาบาลน่านปี พ.ศ. 2547

ตารางที่ 1 ความชุกของ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในผู้ป่วยมะเร็งระหว่างปี พ.ศ. 2556-2559

ปี พ.ศ.	<i>E. coli</i> (isolates)		<i>K. pneumoniae</i> (isolates)	
	รวม	ESBL (ร้อยละ)	รวม	ESBL (ร้อยละ)
2556	198	87 (43.94)	78	15 (19.23)
2557	169	85 (50.30)	78	25 (32.05)
2558	181	93 (51.38)	116	50 (43.10)
2559	240	141 (58.75)	117	42 (35.90)

ตารางที่ 2 แบบแผนความไวของ *E. coli* ที่สร้าง ESBL ต่อยากลุ่ม carbapenem ระหว่างปี พ.ศ. 2556-2559

ปี พ.ศ.	<i>Ertapenem</i>	<i>Imipenem</i>	<i>Meropenem</i>
	isolates (%S)	isolates (%S)	isolates (%S)
2556	87 (93)	87 (96)	87 (95)
2557	85 (91)	85 (93)	85 (93)
2558	93 (92)	93 (97)	93 (97)
2559	141 (95)	14 (97)	141 (99)
รวม	406 (93)	406 (96)	406 (96)

S=susceptible

ตารางที่ 3 แบบแผนความไวต่อยาของ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL ต่อยากลุ่ม carbapenem ระหว่างปี พ.ศ.2556-2559

ปี พ.ศ.	<i>Ertapenem</i>	<i>Imipenem</i>	<i>Meropenem</i>
	isolates (%S)	isolates (%S)	isolates (%S)
2556	15 (94)	15 (94)	15 (83)
2557	25 (65)	25 (85)	25 (81)
2558	50 (49)	50 (77)	50 (70)
2559	42 (66)	42 (87)	42 (88)
รวม	132 (69)	132 (86)	132 (81)

S=susceptible

ถึง 2553 พบ *E. coli* ที่สร้าง ESBL ร้อยละ 21.9 และ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL ร้อยละ 22.7¹⁸ และ การศึกษาของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยมา ปี พ.ศ. 2553 ถึง 2557 พบ *E. coli* ที่สร้าง ESBL และ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL สูงถึงร้อยละ 41.1 และ 45.1 ตามลำดับ¹⁹ ส่วนรายงานการระบาดของ การเกิด เชื้อดื้อยาที่สร้าง ESBL ในต่างประเทศพบว่า มีลักษณะ คล้ายกับประเทศไทย คือ พบว่า *K. pneumoniae* เกิดการดื้อยาสูงกว่า *E. coli* ตัวอย่างเช่น การศึกษา ในสาธารณรัฐมาซิโดเนีย ในปี พ.ศ. 2554 พบ *E. coli* ที่สร้าง ESBL ร้อยละ 15.7 และ *K. pneumoniae* ที่ สร้าง ESBL ร้อยละ 31.0²⁰ ส่วนการศึกษาของประเทศ เนปาล ระหว่างปี พ.ศ. 2554 ถึง 2555 พบร้อยละ 21.8 และ 25.5 ตามลำดับ²¹ และพบว่าประเทศอินเดียมี ความชุกของเชื้อดังกล่าวสูงขึ้นมากและสูงกว่าประเทศ อื่นๆ คือ พบร้อยละ 56.92 และ 67.04 ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2554-2555¹⁵ และร้อยละ 61.4 และ 46.2 ในปี พ.ศ. 2552-2555²² ซึ่งสูงขึ้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2549 ซึ่งพบร้อยละ 30 และ 16 ตามลำดับ²³ ในขณะที่ประเทศญี่ปุ่นพบการระบาดและความชุก ค่อนข้างต่ำ โดยในปีพ.ศ. 2546 ถึง 2554 พบว่าเป็นเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง ESBL มากกว่า *K. pneumoniae* ที่ สร้าง ESBL (ร้อยละ 6.4 และ 5.1 ตามลำดับ)²⁴ ซึ่งอาจมี สาเหตุมาจากระบบการควบคุมการใช้ยาและการเฝ้าระวัง ป้องกันโรคติดเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพทำให้เชื้อ ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นเชื้อดื้อยาได้

สถานการณ์ของเชื้อดื้อยา ESBL ที่ดื้อต่อ ยากลุ่ม carbapenems ซึ่งประกอบด้วยยา 3 ชนิด คือ ertapenem, imipenem และ meropenem ใน

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบ *E. coli* ที่สร้าง ESBL มีความไวต่อยามากกว่าร้อยละ 90 ส่วน *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL มีความไวน้อยกว่า โดยพบว่ามีความไว ต่อยา ertapenem ร้อยละ 69 ส่วน imipenem และ meropenem มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งมีลักษณะ แตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น พบ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBL มีความไว ต่อยา imipenem และ meropenem ร้อยละ 99-100 ในการศึกษาของโรงพยาบาลพุทธชินราช ปีพ.ศ. 2550 และ 2552¹⁶ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในโรงพยาบาลน่าน ปี พ.ศ. 2547-2553 พบมีความไวต่อยา ertapenem, imipenem และ meropenem ร้อยละ 96-100¹⁸ และ ให้ผลทำนองเดียวกับโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยมา ซึ่งพบความไวมากกว่าร้อยละ 95¹⁹ ส่วนการศึกษาใน โรงพยาบาลเชียงใหม่พบว่าเชื้อดื้อยาที่สร้าง ESBL มี ความไวต่อยา imipenem มากกว่าร้อยละ 97¹⁷ จาก การศึกษาที่กล่าวมาสามารถสรุปได้ว่า ในประเทศไทย ยังคงสามารถใช้ยาในกลุ่ม carbapenem ในการรักษา เชื้อดื้อยาที่สร้าง ESBL ได้ดี ส่วนการศึกษาในต่างประเทศ เช่น อินเดียและเนปาล พบว่า เชื้อดื้อยาที่สร้าง ESBL มีความไวต่อยา imipenem ร้อยละ 100^{15,21} และร้อยละ 99.4 ในประเทศเคนยา²⁵ และการศึกษาในบังคลาเทศ พบว่ามีความไวต่อยา imipenem, meropenem ร้อยละ 100²⁶ จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละ พื้นที่ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการระบาดและการใช้ยา ในโรงพยาบาลแต่ละแห่งที่แตกต่างกัน

ผลจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าการติดเชื้อ ดื้อยาที่สร้าง ESBL มีแนวโน้มสูงขึ้นโดยเฉพาะเชื้อ *E. coli* ที่สร้าง ESBL แต่เชื้อยังคงมีความไวต่อยาใน

กลุ่ม carbapenems ขณะที่เชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้าง ESBL มีแนวโน้มลดลงในปี พ.ศ. 2558 ถึง 2559 แต่พบว่ามีความไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems น้อยกว่า *E. coli* ที่สร้าง ESBL อย่างไรก็ตามการศึกษาความชุกและแบบแผนความไวต่อยาทำให้เห็นถึงแนวโน้มของการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปัญหา ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ยาอย่างเหมาะสมและยังเป็นประโยชน์ในงานเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาในสถาบันมะเร็งแห่งชาติต่อไป

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามีส่วนสำคัญอย่างยิ่งในการวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อดื้อยา ดังนั้นนักเทคนิคการแพทย์จะต้องพัฒนาตนเองอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ มีคุณภาพได้มาตรฐานวิชาชีพ แพทย์สามารถนำผลการตรวจวิเคราะห์ไปใช้ในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

1. นิตยา อินทรวัดนา, มุทิตา วนาภรณ์. โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและสถานการณ์การดื้อยา. วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ 2015;22:82-92.
2. Joseph D.C, Yao, Robert C, Moellering, JR. Antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington DC: American Society of Microbiology 1999. p. 1474-504.
3. พงมาน ผู้มีสัตย์, ปิยะรัตน์ จิตกริรมย์, เกียรติศักดิ์ มีพันธ์. การตรวจหาเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายและแอมพิซิลิน-แลคทาเมสในเชื้อกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรีย. เวชสารแพทย์ทหารบก 2558;68:165-71.
4. ศิริธร ไทยเจริญ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์). Carbapenem-Resistant Escherichia coli ครั้งแรกในโรงพยาบาลพระปกเกล้า. วารสารศูนย์การศึกษาแพทย์ศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า 2554;28:238-42.
5. วีวรรณ อาชีวะ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์). ความชุกของเอนไซม์ดื้อยาในกลุ่ม carbapenems ที่แยกได้จากเชื้อดื้อยา

carbapenem resistant Enterobacteriaceae ในโรงพยาบาลพระปกเกล้า ปีพ.ศ. 2555-2556. วารสารศูนย์การศึกษาแพทย์ศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า 2559;33:314-25.

6. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. การรักษามะเร็งตามหลักสากลที่ปฏิบัติกันอยู่ในประเทศไทย. เข้าถึงได้จาก: www.nci.go.th/th/knowledge/treat.html. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 มกราคม 2560.
7. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 9 เรื่องที่ 6 โรคมะเร็ง. การรักษามะเร็ง. เข้าถึงได้จาก: <http://saranukromthai.or.th/sub/book/book.php?book=9&chap=6&page=t9-6-infodetail10.html>. สืบค้นเมื่อวันที่ 16 มกราคม 2560.
8. กุลวดี สุระยุทธปรีชา. ภาวะนิ่วโรที่เนี่ยและการติดเชื้อในผู้ป่วยมะเร็งเด็ก. รามาธิบดีพยาบาลสาร 2553;16:14-26.
9. ชีรพงษ์ ตังบัววิกุล, พญศักดิ์ บุญใจ, กิตติยา ศิริสมโภชน์, ชุตินันท์ พันธุ์ประทุม, นลินี ประกอบวณิชกุล, วิน เศรษฐะกิจ. การติดเชื้อในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่มีภาวะไขกระดูกติดเชื้อในโรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี อุบัติการณ์ของการติดเชื้อ เชื้อก่อโรค และปัจจัยที่มีผลต่อผลการรักษา. ธรรมชาติเวชสาร 2558;15:29-38.
10. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty third Information supplement (M02-A10 and M07-A8); 2013.
11. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty fourth Information supplement (M02-A11, M07-A9), and M11-A8; 2014.
12. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty fifth Information supplement (M02-A12, M07-A10), and M11-A8; 2015.
13. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (M02-A12, M07-A10 and M11-A8; 2016.
14. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center (NARS), National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. Available at: <http://narst.dmsc.moph.go.th/>. Accessed January 16, 2017.
15. Meeta sharma, Sati pathak, Preeti srivastava. Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing Escherichia coli and Klebsiella spp. J Clin Diagn Res 2013;7:2173-7.

16. มุจรินทร์ ติลกเลิศ, ปาริชาติ ธีบุญธาดา. เชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก ระหว่างปี 2550-2552. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2553;38:3476-85.
17. ชัยพร การะเกตุ. ความชุกของเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ชนิดสร้างเอนไซม์ extended spectrum beta lactamase โรงพยาบาลเชียงใหม่ ระหว่างปี 2554-2555. วารสารโรงพยาบาลพิจิตร 2555;28:21-30.
18. เดชพิทักษ์ อมรทิพย์วงศ์, พวงมณี จิตดวงศ์พันธ์, วิภาธร นนทสิทธิ์, ปวีณา มงคลวิสุทธิ์, อำไพ สุภาจีน. ความชุกของเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ชนิดสร้างเอนไซม์ Extended-Spectrum Beta-Lactamase จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลน่าน และโรงพยาบาลชุมชนในจังหวัดน่าน ระหว่าง ปี 2547-2553. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2554;44:169-75.
19. จารุภรณ์ วิศาลสวัสดิ์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์). ความชุกและแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) ในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิราวุธวิทยาลัย. เวชสารโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิราวุธวิทยาลัย 2558;37:84-94.
20. Kaftandzieva A, Trajkovska-Dokic E, Panovski N. Prevalence and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESBLs) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Priloz 2011;32:129-41.
21. Shristi Raut, Shishir Gokhale, Bipin Adhikari. Prevalence of extended spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* isolate in manipal Teaching Hospital, Pokhara, Nepal. J Microbio Infect Dis 2015;5:69-75.
22. Vishwanath Gurushanthappa, Radhakrishna Manipura, Prasad Subba Rama, Sridhar PN Rao, Krishna Srinivasan. Extended spec beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: A Multi-centric Study Across Karnataka. J Lab Physicians 2014;6:7-13.
23. Parul Agrawal, AN Ghosh, Satish Kumar, B Basu, K Kapila. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in tertiary care hospital. Indian J Pathol Microbiol 2008;51:139-42.
24. Yong Chong, Shinji Shimoda, Hiroko Yakushiji, Yoshikiyo Ito, Toshihiro Miyamoto, Tomohiko kamimura et al. Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* a long-term study in Japan. J Med Microbiol 2013;62:1038-43.
25. Daniel Maina, Paul Makau, Andrew Nyerere, Gunturu Revathi. Antimicrobial resistance patterns in extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a private tertiary hospital, Kenya. Microbiology Discovery 2013;1:5.
26. Iraj Alipourfard Nilufar Yeasmin Nili. Antibio gram of Extended Spectrum beta-Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospital sample. Bangladesh J Med Microbiol 2010;4:32-6.

การตรวจหาระดับการแสดงออกของ HPVE6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่ติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพพพิวโลมา สายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค

จรัญญา งามขำ¹
พล กองแก้ว²

อุษณีย์ พรหมประกอบ²
เทียนแสง พันธุ์ศรี¹

บทคัดย่อ การติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพพพิวโลมาสายพันธุ์ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค (HR HPV) เป็นระยะเวลานาน เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยโปรตีน E6 ของไวรัสดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการทำงานของ p53 นอกจากนี้บางการศึกษาคาดว่าโปรตีน E6 อาจมีผลต่อการทำงานของยีน/โปรตีนในกระบวนการตายแบบ apoptosis การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาสายพันธุ์ของ HPV และระดับการแสดงออกของยีนที่มีบทบาทในกระบวนการ apoptosis ได้แก่ p53, Bcl-2 และ Bax รวมทั้งการแสดงออกของ HPVE6 mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่พบการติดเชื้อ HR HPV เปรียบเทียบกับตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV โดยการเก็บตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกจำนวน 50 ตัวอย่างใน liquid based และมีผลการตรวจทางเซลล์วิทยาในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายน ปีพ.ศ. 2559 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2560 การตรวจหาสายพันธุ์ของไวรัสใช้วิธี polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA) และสุ่มตัวอย่างจำนวน 15 ตัวอย่างจากทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ซึ่งในจำนวน 15 ตัวอย่าง พบ 14 ตัวอย่างเป็นเซลล์ที่มีความผิดปกติเพียงเล็กน้อยจนถึง low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) และอีกหนึ่งตัวอย่างพบความผิดปกติแบบ high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) นำผลการตรวจเชื้อ HPV มาแบ่งกลุ่มตัวอย่าง 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV, พบการติดเชื้อ HPV16, พบการติดเชื้อ HPV18, พบการติดเชื้อ HR HPV อื่น และกลุ่มที่พบการติดเชื้อร่วมระหว่าง HPV16/18 และ HR HPV อื่น กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง และ ตรวจหาระดับการแสดงออกของ p53, Bcl-2, Bax และ HPVE6 mRNA ด้วยวิธี two-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลการศึกษาพบ HPV สายพันธุ์ที่ 52 มากที่สุดตามด้วย HPV 16 และ 18 ตามลำดับ และพบว่าการแสดงออกของ p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่มีการติดเชื้อ HPV มีระดับสูงกว่าเซลล์ที่ไม่มีการติดเชื้อเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ HPVE6 mRNA พบสูงสุดในกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น จากการศึกษาสรุปได้ว่า การติดเชื้อ HR HPV อาจมีผลต่อการทำงานของกระบวนการตายแบบ apoptosis ถึงแม้ว่าระดับการแสดงออกของยีนที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ยังให้ผลไม่แน่ชัด แต่ก็เป็นข้อมูลที่น่าสนใจในการนำไปศึกษากระบวนการเกิดมะเร็งปากมดลูกในระดับโมเลกุลในอนาคตต่อไป (วารสารโรคมะเร็ง 2560;37:94-104)

คำสำคัญ: p53, Bcl-2, Bax ไวรัสฮิวแมนแพพพิวโลมา เซลล์ปากมดลูก

¹กลุ่มงานวิจัย ²กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพฯ 10400

Investigation of HPVE6, p53, Bcl-2 and Bax mRNA Expression Levels in Cervical Tissues with High Risk-Human Papillomavirus Infection

by Jarunya Ngamkham¹, Usanee Promprakob², Phon Kongkaew²,
Thainsang Phansri¹

¹Research Division, ²Pathology Division, National Cancer Institute, Bangkok 10400

Abstract Persistent high-risk human papillomavirus (HR HPV) infection is the major cause of cervical cancer development, in which oncogenic protein; E6 plays an important role by activating tumor suppressor gene p53. Some studies have suggested that E6 oncoprotein may affect some of the genes/protein in the apoptotic pathway. This study aimed to detect the HPV genotype and investigate the mRNA expression of the gene-related apoptotic pathway p53, Bcl-2 and Bax, as well as the expression of HPVE6 mRNA in cervical samples with HR HPV infection compared with HPV-negative cervical samples. A total of 50 liquid-based cervical samples with diagnostically confirmed cytology were collected between June 2016 and May 2017. HPV DNA detection and genotyping were performed by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA). Of 50 cervical samples, 15 were randomly selected for study, of which 14 samples were cytologically diagnosed negative for intraepithelial lesion/malignancy (NILM) or low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL); the other was a high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). The samples were divided into 5 groups according to HPV findings:- no HPV infection, HPV 16, HPV 18, the other HR HPV and multiple infections between HPV16/18 and the other HR-HPV groups, with three samples per group. Two-step reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to investigate p53, Bcl-2, Bax and HPVE6 mRNA expression levels. Our results showed that HPV52 was the most frequent type, followed by HPV 16, 18, respectively. p53, Bcl-2 and Bax mRNA expression levels in cervical samples with HPV infection showed slightly higher expression than without HPV infection. HPVE6 mRNA expression in the HPV16 infection group was highest compared with the other groups. In conclusion, HR HPV may possibly affect the process in the apoptotic pathway, although the expression of these genes in this study was still unclear. These data could be used for further molecular-level studies of cervical carcinogenesis. (*Thai Cancer J* 2017;37:94-104)

Keywords: p53, Bcl-2, Bax, human papillomavirus, cervical tissues

บทนำ

ไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมา (human papillomavirus; HPV) เป็นไวรัสขนาดเล็ก มีขนาดของ genome ประมาณ 7000-8000 คู่เบส โดยสารพันธุกรรมหรือ DNA เป็นสายคู่ที่มีลักษณะเป็นวงกลม (circular double-stranded) ซึ่งการติดเชื้อ HPV ในเซลล์เป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้เซลล์เกิดความผิดปกติและเป็นสาเหตุของการเกิด pre-malignant และ malignant lesions^{1,2} มักพบการติดเชื้อบริเวณที่เป็น cutaneous หรือ epithelial cell ก่อให้เกิดหูดทั้งในมนุษย์และสัตว์^{3,4}

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ของ HPV พบว่าสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กับการก่อโรคในมนุษย์ประมาณ 35 สายพันธุ์ แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามความรุนแรงของการก่อโรคคือ กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรค (high risk types; HR) และกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำ (low risk types; LR) สำหรับกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 และ 82 ซึ่งมากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกสามารถตรวจพบการติดเชื้อของ HPV ในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะ HPV 16 และ 18⁵⁻⁷

โดยโปรตีนหรือสารพันธุกรรม (gene) ของไวรัสที่มีบทบาทสำคัญต่อการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ คือ E5, E6 และ E7 ด้วยการยับยั้งหรือกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในเซลล์หลายชนิด ส่งผลให้ระบบการทำงานของโปรตีนในเซลล์เกิดความผิดปกติ ซึ่งโปรตีน E6 และ E7 จะรบกวนการทำงานของ tumor suppressor genes p53 และ phosphorylated retinoblastoma (pRb) ตามลำดับ^{2,4,8,9} ในขณะที่ E5 ยังไม่พบกลไกที่แน่ชัด แต่มีรายงานพบว่ามีบทบาทเสริมในการกระตุ้นกระบวนการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) ที่เป็นกระบวนการสำคัญของการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) และส่งเสริมการทำงานของสารพันธุกรรมที่ยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ที่มีความผิดปกติตลอดจนเซลล์มะเร็ง¹⁰

กระบวนการตายของเซลล์ (programmed cell death หรือ apoptosis) มีความสำคัญ เนื่องจากระบบการทำงานของร่างกายในการกำจัดเซลล์ที่มีความผิดปกติหรือเสื่อมสภาพรวมทั้งเซลล์มะเร็ง โดยทำให้เซลล์ที่ต้องการกำจัดเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านกายภาพ ชีวภาพ รวมทั้งสารทางชีวเคมีต่าง ๆ ภายในเซลล์ ก่อนจะถูกล่อยสลายด้วยกระบวนการ phagocytosis ด้วยระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย^{11,12} จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า HPV สามารถยับยั้งและควบคุมการทำงานของ tumor suppressor ในวงจรชีวิตของเซลล์และยับยั้งการเกิด apoptosis ส่งผลให้เซลล์ที่มีความผิดปกติไม่สามารถถูกกำจัดและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง และยังมีเยื่อหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis เช่น ยีนในกลุ่มที่ส่งเสริมให้เกิดกระบวนการตาย หรือ

pro-apoptotic genes ได้แก่ Bax, Bak ฯลฯ หรือ ยีนในกลุ่มที่ยับยั้งการตายของเซลล์ในกระบวนการ apoptosis หรือ anti-apoptotic genes ได้แก่ Bcl-2, Bcl-xL ฯลฯ ถูกยับยั้งหรือถูกกระตุ้นการทำงานอย่างผิดปกติ¹³⁻¹⁶ อย่างไรก็ตามการวิจัยที่ศึกษาผลกระทบของ HPV และระดับการแสดงของยีนที่สำคัญในกระบวนการตายแบบ apoptosis ยังมีค่อนข้างจำกัดและส่วนใหญ่จะศึกษาใน cancer cell lines ในระดับหลอดทดลองเท่านั้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการแสดงออก mRNA ของยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการ apoptosis คือ tumor suppressor gene; p53, anti-apoptotic gene; Bcl-2 และ pro-apoptotic gene; Bax ร่วมกับการแสดงออกของ oncogenic gene; E6 ของ HPV ในเซลล์ปากมดลูกของผู้หญิงไทย ที่เข้ารับการตรวจคัดกรองหรือตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์ ณ กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างจากเซลล์ปากมดลูกที่เก็บจากผู้เข้ารับการตรวจคัดกรอง ตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์และตรวจหาการติดเชื้อ HPV จากงานเซลล์วิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในช่วงเดือนมิถุนายน ปีพ.ศ.2559 ถึงเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2560 จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดมีผลการตรวจและรายงานผลทางเซลล์วิทยาประกอบ งานวิจัยนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เอกสารรับรองเลขที่ 069/2558

การเตรียมตัวอย่างและตรวจหาการติดเชื้อ HPV

ในการเตรียมตัวอย่างจากเซลล์ปากมดลูกของผู้หญิงโดยการ swab และเก็บในน้ำยา Thinpap (HOLOGIC®, USA) เพื่อรักษาสภาพของเซลล์ก่อนนำมาทดสอบภาชนะที่ปราศจากเชื้อ เริ่มทดสอบโดยการนำตัวอย่างจำนวน 200 ไมโครลิตร มาสกัด DNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ QIAamp Mini Kit (QIAGEN, Germany) ตามขั้นตอนที่แนบมาพร้อมกับชุดสกัด จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาทดสอบด้วยยีน β -globin ที่มี primer 2 สายคือ BGPCO3; ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC และ BGPCO5; GAA ACC CAA GAG TCT TCT CT¹⁷ ด้วยวิธีการปฏิกิริยาลูกโซ่ polymerase chain reaction (PCR) ในส่วนผสม 25 ไมโครลิตรของ 5 ไมโครลิตรของ DNA จากตัวอย่าง 10xPCR buffer, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 20 pmole ของ primer แต่ละสาย Taq polymerase enzyme (QIAGEN, Germany) และน้ำกลั่น นำส่วนผสมทั้งหมดทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มจำนวน PCR (Applied Biosystems, USA) ตามขั้นตอนดังนี้คือ ป้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย 40 รอบของอุณหภูมิ 94°C 1 นาที 58°C 2 นาที และ 72°C 1.5 นาที จากนั้นป้อนอีกครั้งที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 4 นาทีเป็นขั้นตอนสุดท้ายตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน 2% agarose gel ที่ผสมน้ำยาย้อม DNA; GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, USA) นำตัวอย่างที่ให้

ผลบวกหรือมี band ปรากฏบนเจลมาใช้ในการตรวจหา HPV DNA และจำแนกสายพันธุ์

สำหรับการตรวจหา HPV DNA และจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสในการศึกษานี้เป็นการทดสอบตามวิธีของ Jacob MV และคณะ¹⁷ ด้วยวิธี polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA) โดยใช้ GP5+/bioGP6+ เป็น specific primers ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจหา HPV DNA ซึ่งตัวอย่างที่มีผลบวกจะนำมาจำแนกสายพันธุ์โดยการเติมใน streptawell plate (Roche, Germany) ที่เคลือบด้วย biotin และเติม 1xSCC, 0.5% Tween 20 นำไปป้อนที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้น hybridize กับ oligo-probe cocktail ของ high risk HPV types (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 และ 68) และ low risk HPV types (HPV 6, 11, 26, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 57, 61, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 และ 89) ที่มี digoxigenin labeled (Roche, Germany) เพื่อคัดกรองกลุ่มของสายพันธุ์ นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 55°C 60 นาที จากนั้นดูผลการละลายยั้งก่อนเติม anti-digoxigenin AP conjugate (Roche, Germany) และ p-nitrophenyl phosphate (Sigma, USA) ตามลำดับ ในระหว่างขั้นตอนของการเติมสารแต่ละชนิดจะต้องดูผลการละลายยั้งและล้างด้วย 1xSCC, 0.5% Tween 20 ประมาณ 3 ครั้ง นำไปป้อนที่ 37°C เป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์ผลด้วย microplate reader (Biotex, USA) ที่ความยาวคลื่น 405 และ 620 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารพันธุกรรมของไวรัสหรือ HPV DNA สำหรับการทดสอบสายพันธุ์จำเพาะของ HPV ในแต่ละตัวอย่างสามารถ

ดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับการคัดกรองกลุ่มใหญ่ แต่เปลี่ยนชนิดของ oligoprobe ที่นำมาทดสอบจาก oligoprobe cocktail เป็น HPV specific probe ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจในแต่ละสายพันธุ์

การทดสอบระดับการแสดงออก mRNA ของสารพันธุกรรมที่สำคัญในกระบวนการ apoptosis

สำหรับการทดสอบนี้จะประเมินระดับการแสดงออกของยีน 4 ชนิดและมี primers สำหรับเพิ่มจำนวนดังนี้ HPVE6: for 5'-ATGCACAAAAGA GAACTGCAAT-3'; rev 5'-TTACAGCTGGTTTC TCTACGTG-3'¹⁸, p53: for 5'-TCAGTCTACCTCCC GCCATAA-3'; rev 5'-TTTCTTACATCTCCCAAA CATCC-3', Bcl-2: for 5'-TTGCCACGGTGGTGGG GGAC-3'; rev 5'-GAGACAGCCAGGAGAAA TCAAACAG-3', Bax: for 5'-AGGATCGAGCA GGGCGAATG-3'; rev 5'-AGGGCCTTGAGCA CCAGTTT-3' และมี internal control gene คือ actin: for 5'-GACCTTCAACACCCCAGCCA-3'; rev 5'-AGGCTGGAAGAGTGCCTCAG-3' จากตัวอย่างที่นำมาทดสอบการติดเชื้อ HPV จำนวน 50 ตัวอย่าง เลือกตัวอย่างมาทำการทดสอบระดับการแสดงของ mRNA ของยีนต่าง ๆ ข้างต้นจำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่พบการติดเชื้อและไม่พบการติดเชื้อ HPV

การสกัด total RNA และการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

ผู้วิจัยนำตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกจำนวน 15

ตัวอย่างมาสกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป RNA isolation kit (Roche, Germany) ตามขั้นตอนการสกัดที่แนบมากับชุดน้ำยา ซึ่ง total RNA ที่สกัดได้ต้องเก็บไว้ในน้ำแข็งตลอดเวลาของการทดสอบ เนื่องจากเป็นสารพันธุกรรมที่ถูกทำลายได้ง่ายจากความร้อน แล้วนำไปวัดความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นนำ total RNA ที่ได้จากการสกัดไปสังเคราะห์สาย complementary DNA หรือ cDNA ด้วยขั้นตอนที่มากับชุดน้ำยา Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase protocol (Invitrogen, USA) โดยใช้ total RNA ปริมาณ 11 ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา สาย cDNA ที่ได้นำมาใช้เป็นสายตั้งต้น (template) ในการศึกษาการแสดงออกของ p53, Bcl-2, Bax และ HPVE6 mRNA ต่อไป

การตรวจหาระดับการแสดงออกของ p53, Bcl-2, Bax และ HPVE6 mRNA

การทดสอบใช้วิธี semi-quantitative RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบผลระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีนทั้ง 4 ชนิดในเซลล์ปากมดลูก โดยมี actin เป็น internal control ในกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อ HPV และไม่พบการติดเชื้อ HPV เริ่มการทดสอบด้วยการผสม cDNA 2 ไมโครลิตรในส่วนผสมของ 10xPCR buffer, 25 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 10 pmole ของ primer แต่ละสาย, Taq polymerase enzyme (QIAGEN, Germany) และน้ำ เริ่มปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของอุณหภูมิ 95°C 30 วินาที 58°C 30 วินาที และ 72°C 30 วินาที จากนั้นบ่มอีกครั้งที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

เป็นขั้นตอนสุดท้าย แล้วนำ PCR product มาแยกด้วยเครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าและวิเคราะห์ผลภายใต้ UV ด้วยเครื่อง densitometer (SYNGENE, UK) และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของสารพันธุกรรมแต่ละชนิดด้วย GeneTools program (SYNGENE, UK)

ในการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด โดยการคำนวณค่า normalize เปรียบเทียบค่า band intensity ของ p53, Bcl-2, Bax และ HPVE6 ต่อ band intensity ของ internal control ในแต่ละตัวอย่าง และเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ข้อมูลใช้การวิเคราะห์แบบสถิติพรรณนาในการคำนวณร้อยละของจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบ ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับการแสดงออกของ HPVE6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่พบความผิดปกติในระยะต่าง ๆ เพื่อดูความแตกต่าง

ผลการศึกษา

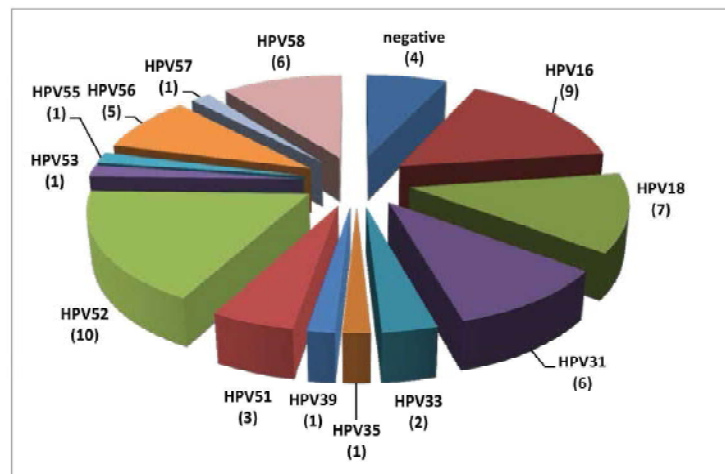
จากการเก็บตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกของผู้ที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งในระยะเริ่มแรก/ตรวจวินิจฉัยเพื่อหาความผิดปกติของเซลล์และส่งตรวจเพื่อหาการติดเชื้อ HPV จำนวน 50 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างทั้งที่พบและไม่พบความผิดปกติของเซลล์ แต่ยังไม่พบมะเร็ง โดยกลุ่มตัวอย่างมีช่วงอายุตั้งแต่ 27-73 ปี (อายุเฉลี่ย $\pm$ SD=43.48 $\pm$ 10.78 ปี) และมีผลการตรวจเซลล์ทางห้องปฏิบัติการ พบกลุ่ม negative for

intraepithelial lesion หรือ malignancy (NILM) จำนวน 14/50 ราย (ร้อยละ 28) สำหรับกลุ่มที่พบความผิดปกติแบบ atypical squamous cells of undetermined (ASCUS), atypical squamous cells cannot exclude HSIL (ASC-H), endocervical adenocarcinoma in situ (AIS) จำนวน 8/50, 2/50 และ 1/50 ราย คิดเป็นร้อยละ 16, 4 และ 2 ตามลำดับ ในขณะที่ความผิดปกติของเซลล์แบบ low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) และ high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) พบจำนวน 19/50 (ร้อยละ 38) และ 6/50 (ร้อยละ 12) รายตามลำดับ และจากการตรวจการติดเชื้อทั้งแบบติดเชื้อเดี่ยว (single type infection) และติดเชื้อร่วมหลายสายพันธุ์ (multiple types infection) สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ HPV 52 รองลงมาคือ HPV 16 และ 18 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1

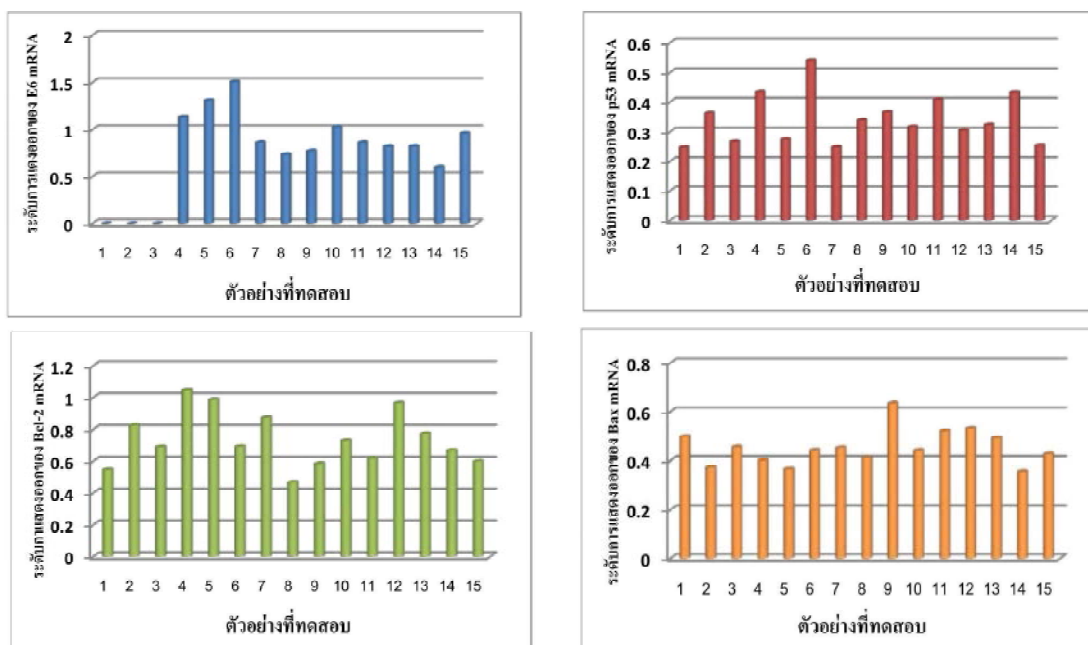
จากการตรวจหาระดับการแสดงออกของ mRNA ของยีน 4 ชนิดคือ oncogenic gene; HPVE6, tumor suppressor gene; p53, anti-apoptotic gene; Bcl-2 และ pro-apoptotic gene; Bax โดยแบ่งกลุ่มศึกษาเป็นผู้ที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV กลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16 กลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV 18 กลุ่มที่พบการติดเชื้อ HR HPV แต่ไม่ใช่ 16 หรือ 18 และกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16/18 ร่วมกับ HR HPV อื่น ซึ่งในแต่ละกลุ่มได้สุ่มตัวอย่างนำมาทดสอบกลุ่มละ 3 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบ 14 ตัวอย่างมีความผิดปกติของเซลล์แบบ LSIL หรือ NILM ยกเว้นเพียง 1 ตัวอย่างในกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16 มีความผิดปกติของเซลล์ระดับ HSIL

จากผลการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของ HPVE6 และ Bcl-2 mRNA ในกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16 มีระดับสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น และไม่สามารถตรวจพบระดับการแสดงออกของ HPVE6

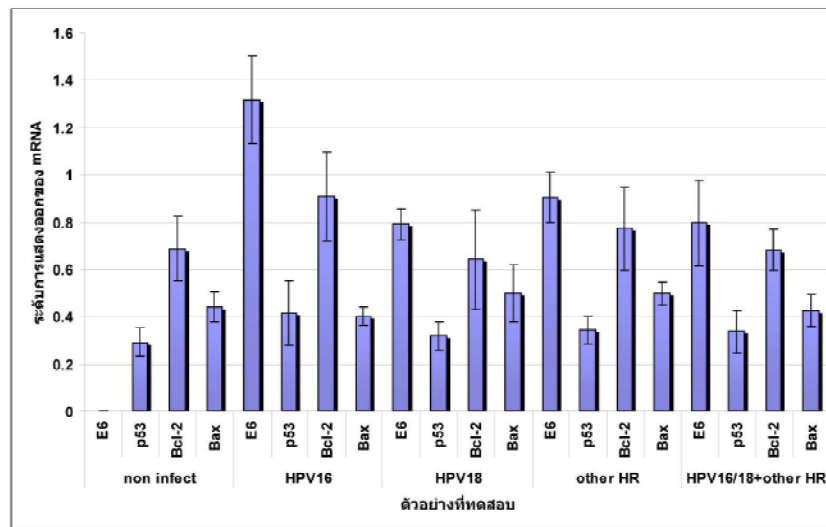
mRNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของไวรัสในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV (ตัวอย่างที่ 1-3) ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ p53 และ Bax mRNA ของแต่ละกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3



รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจหาการติดเชื้อและจำแนกสายพันธุ์ของ HPV จากเซลล์ปากมดลูก (n=50) ซึ่งแสดงผลรวมจากตัวอย่างที่พบการติดเชื้อเดี่ยว (single type) และติดเชื้อร่วม (multiple types)



รูปที่ 2 แสดงระดับการแสดงออกของ HPVE6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกของตัวอย่างในกลุ่มต่าง ๆ (n=15): 1-3 ไม่พบการติดเชื้อ HPV; 4-6 พบการติดเชื้อ HPV 16; 7-9 พบการติดเชื้อ HPV 18; 10-12 พบการติดเชื้อ HR HPV ที่มี HPV16/18 และ 13-15 พบการติดเชื้อร่วมระหว่าง HPV 16/18 และ HR HPV อื่น



รูปที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ HPV E6, p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในเซลล์ปากมดลูกที่ไม่พบการติดเชื้อ HPV และพบการติดเชื้อ HPV สายพันธุ์ต่าง ๆ (n=15)

วิจารณ์และสรุป

ในการศึกษากลไกการเกิดมะเร็งหรือการกลายพันธุ์ของเซลล์ รวมทั้งการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์หรือเภสัชศาสตร์นั้น กระบวนการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติแบบ apoptosis และสารพันธุกรรม/โปรตีนที่เกี่ยวข้องมักเป็นกลไกแรกที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นการบ่งชี้ถึงการตายหรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติและ signal transduction pathway ต่าง ๆ ที่ทำงานผิดปกติไป รวมทั้งอาจมีความสัมพันธ์ (crosstalk) หรือก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบการทำงานส่วนอื่น ๆ ภายในเซลล์ เช่น DNA repair, cell cycle เป็นต้น¹¹ โดยกลุ่มของยีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเกิด apoptosis มีหลายกลุ่ม เช่น tumor suppressor gene เช่น p21, p53 มีความสำคัญในการตรวจสอบเซลล์ที่ผิดปกติและส่งสัญญาณให้กลไกอื่น ๆ ทำงานต่อไป กลุ่มยับยั้งการตายของเซลล์ เช่น Bcl-2, Bcl-xL เป็นกลุ่มยีนที่มีความสำคัญต่อ

การยับยั้งการตายของเซลล์ที่ผิดปกติและกลุ่มของยีนที่กระตุ้นให้เซลล์ที่ผิดปกติถูกทำลาย เช่น Bax, Bak เป็นต้น ซึ่งการศึกษากลไกหรือระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะเป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นของการยับยั้งหรือกระตุ้นความผิดปกติของเซลล์ ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนมีหลายปัจจัย ทั้งสภาพแวดล้อม รังสี สารเคมี รวมทั้งการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสเป็นระยะเวลานาน ๆ^{2,11,12}

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยตรวจหาการติดเชื้อและสายพันธุ์ของ HPV ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกของผู้ที่เข้ารับการคัดกรองหรือตรวจวินิจฉัยความผิดปกติของเซลล์จำนวน 50 ราย พบว่าสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ HPV 52 ตามด้วย HPV 16, 18, 58 และ 31 ตามลำดับ ซึ่งลำดับที่ตรวจพบแตกต่างจากรายงานอื่นเพียงเล็กน้อยที่มักพบการติดเชื้อ HPV 16 มากที่สุด^{1,5-7} ซึ่งเป็นผลการศึกษากลุ่มประชากรในแถบยุโรปหรืออเมริกาเป็นส่วนใหญ่ จำนวนที่ตรวจพบระหว่าง HPV 16 และ

HPV 52 มีความใกล้เคียงกันมาก และผลการศึกษาพบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Kantathavon N และคณะ¹⁹ และ Marks MA²⁰ พบการติดเชื้อ HPV ในคนไทย โดยพบ HPV สายพันธุ์ที่ 52 มากกว่าสายพันธุ์ที่ 16 เช่นเดียวกัน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบมากที่สุดในคนไทยหรือในกลุ่มประชากรในประเทศแถบเอเชีย บางประเทศอาจมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่พบในกลุ่มประชากรของภูมิภาคอื่น ๆ ของโลก¹ นอกจากนี้ การสูมตัวอย่างที่นำมาศึกษา วิธีการเก็บตัวอย่างและการทดสอบที่แตกต่างกันก็อาจมีผลต่อการวิเคราะห์เช่นกัน^{1,5-7,21} อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่ตรวจพบในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติหรือเซลล์มะเร็งของกลุ่มประชากรทั่วโลกมักเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มของสายพันธุ์ที่รุนแรงและมีความเสี่ยงสูงต่อการก่อโรคทั้งหมด^{1,5-7}

สำหรับการตรวจหาระดับการแสดงออกของสารพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis คือ p53, Bcl-2, Bax ร่วมกับการตรวจหาการแสดงออกของ HPVE6 ในเซลล์ปากมดลูกพบว่า ระดับการแสดงออกของ p53, Bcl-2 และ Bax mRNA ในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่พบการติดเชื้อ มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV โดยกลุ่มที่พบการติดเชื้อจะสูงกว่าเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นเซลล์ที่พบการติดเชื้อ แต่ยังไม่พบความผิดปกติของเซลล์หรือพบความผิดปกติในระดับ LSIL เท่านั้น จึงอาจทำให้ผลจากการติดเชื้อไวรัสมีผลต่อระบบการทำงานของกลไกการป้องกันหรือการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจากภาวะปกติที่ร่างกายมีการกำจัดเซลล์ที่เสื่อมสภาพ

อยู่แล้ว^{2,12,22} เช่นเดียวกับการวิจัยของ Ayatollahi H และคณะ¹⁴ ที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของ p53, Bcl-2 และ Bax ในภาวะเซลล์ปกติ และเพิ่มระดับการแสดงออก เมื่อเซลล์มีการติดเชื้อ HPV โดยวิธีการย้อม immunohistochemistry ในขณะที่จะระดับการแสดงออกของ HPVE6 mRNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ไวรัสสร้างขึ้นและมีบทบาทสำคัญต่อการก่อกลายพันธุ์ของเซลล์ จะไม่พบในกลุ่มตัวอย่างที่ปกติและไม่พบการติดเชื้อ HPV^{2,22} และจากผลการศึกษานี้ยังพบว่ากลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV 16 มีระดับการแสดงออกของ HPVE6 สูงกว่าระดับการแสดงออกในกลุ่มที่ติดเชื้อ HR HPV สายพันธุ์อื่น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก HPV 16 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงต่อการก่อโรคสูงและเป็นสายพันธุ์ที่พบมากในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก จึงมีระดับการสังเคราะห์ของสารพันธุกรรมที่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น นอกจากนี้ 1/3 ตัวอย่างในกลุ่มของผู้ที่พบการติดเชื้อ HPV 16 ที่สูมมาทดสอบครั้งนี้พบความผิดปกติของเซลล์ในระดับ HSIL โดยเป็นความผิดปกติที่ยีนก่อมะเร็งของไวรัส (oncogenic genes) ได้แก่ E6 และ E7 มีจำนวนมากกว่าเซลล์ที่มีความผิดปกติในระดับ LSIL^{2,22} ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่เสริมให้ระดับการแสดงออกของ HPVE6 mRNA ในกลุ่มของผู้ที่ติดเชื้อ HPV 16 สูงกว่ากลุ่มอื่น แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเหตุใดกลุ่มที่พบการติดเชื้อ HPV16/18 ร่วมกับ HR HPV สายพันธุ์อื่น (ตัวอย่างที่ 13-15) มีระดับการแสดงออกของ p53, Bcl-2, Bax mRNA รวมทั้ง HPVE6 mRNA ค่อนข้างต่ำกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อ HPV 16 เพียงชนิดเดียว ทั้งนี้อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง เนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาครั้งนี้มี

จำนวนน้อย นอกจากนี้ลักษณะการแสดงออกของยีนในแต่ละบุคคลหรือแต่ละตัวอย่างอาจมีความเฉพาะตัวที่แตกต่างกัน จึงส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีนต่าง ๆ โดยเฉพาะ HPV E6 ที่พบน้อยกว่าเห็นได้อย่างชัดเจน

จากผลการศึกษาที่สรุปได้ว่าการตรวจหาการติดเชื้อและจำแนกสายพันธุ์ของ HPV ที่ตรวจพบในกลุ่มประชากรที่ต่างกัน อาจมีผลการตรวจที่ต่างกัน ซึ่งลักษณะเฉพาะของแต่ละบุคคลก็ยังมีผลต่อระดับการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ รวมทั้งระดับการแสดงออกของสารพันธุกรรมภายในร่างกาย ถึงแม้ว่าจะพบการติดเชื้อ HPV สายพันธุ์เดียวกัน แต่ก็มีระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญต่อการนำมาเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาในระดับโมเลกุลของเซลล์เพื่อนำไปพัฒนาหรือศึกษาต่อจนถึงกลไกการทำงานของไวรัสต่อระบบต่าง ๆ ภายในเซลล์ และเป็นแนวทางวางแผนในการเฝ้าระวัง ติดตาม และตรวจวินิจฉัยในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. HPV Information Center. Human Papillomavirus and Related Disease Report. Available at: www.hpvcentre.net. Accessed on October 30, 2014.
2. zur Hausen H. Papillomavirus and cancer, From basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002;2:342-50.
3. Gillison ML, Shah KV. Chapter 9; Role of Mucosal Human Papillomavirus in Nongenital Cancer. J Natl Cancer Inst Monogr 2003;31:57-65.
4. International Agency for Research on Cancer Monograph on Evaluation of Carcinogen Risks to Humans; Human papillomavirus 1995;64:35-222.
5. Munoz N, Bosch F, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah K, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated cancer. N Engl J Med 2003;348:518-27.
6. Walboomers M, Jacob MM, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 1999;189:12-9.
7. Ramet J, van Esso D, Meszner Z. Position paper - HPV and the primary prevention of cancer: improving vaccine uptake by paediatricians. Eur J Pediatr 2011;170:309-21.
8. Kim SH, Oh JM, No JH, Bang YJ, Juhnn YS, Song YS. Involvement of NF- κ B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. Carcinogenesis 2009;30:753-7.
9. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins pathways to transformation. Nat Rev Cancer 2010;10:550-60.
10. Kim MK, Kim HS, Kim SH, Oh JM, Han JY, Lim JM, et al. Review article; Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. Biochem Pharmacol 2010;80:1930-5.
11. Malaguarnera L. Implication of apoptosis regulators in tumorigenesis. Cancer and Metastasis Rev 2004; 33:367-87.
12. Zhivotovsky B, Kroemer G. Apoptosis and genomic instability. Nat Rev 2004;5:752-62.
13. Liao S, Deng D, Hu X, Wang W, Li L, Li W, et al. HPV16/18 E5, a promising candidate for cervical cancer vaccines, affects SCPs, cell proliferation and cell cycle, and forms a potential network with E6 and E7. Int J Mol Med 2013;31:120-8.
14. Ayatollahi H, Sharifi N, Sadeghian MH, Alenabi A, Ghasemian-Moghadam HR. Immunohistochemical Expression of Apoptosis Regulators in Squamous Cell Carcinoma of the Cervix and Their Association with Human Papillomavirus 16/18 Subtypes. Balkan Med J 2014;31:202-7.
15. Grace VM, Shalini JV, Lekha TT, Devaraj S, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol 2003;91:51-8.
16. Klapsinou E, Argyri E, Panotopoulou E, Daskalopoulou D, Patsouris E, Nonni A, et al. Bax and Bak expression in cervical smears of women with low- and high-risk HPV types: a study of 120 cases. J Cytol 2015;32:223-9.

17. Jacob MV, van den Brule AJ, Snijder PJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomer JM. A non-radioactive PCR enzyme-immunoassay enables a rapid identification of HPV-16 and 18 in cervical scrapes after GP5+/6+ PCR. *J Med Virol* 1996;49:223-9.
18. Oh JM, Kim SH, Cho EA, Song YS, Kim WH, Juhn YS. Human papillomavirus type 16E5 protein inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cells. *Carcinogenesis* 2010;31:402-10.
19. Kantathavon N, Mahidol C, Sritana N, Sricharunrat T, Phoolcharoen N, Auewarakul C, et al. Genotypic distribution of human papillomavirus (HPV) and cervical cytology finding in 5,906 Thai women undergoing cervical cancer screening programs. *Infect Agent Cancer* 2015;10:7.
20. Marks MA, Gupta S, Liaw KL, Tadesse A, Kim E, Phongnarisorn C, et al. Prevalence and correlated of HPV among women attending family-planning clinics in Thailand. *BMC Infect Dis* 2015;15:159.
21. Bharti A, Shukla S, Mahata S, Hedau S, Das BC. Human papillomavirus and control of cervical cancer in India. *Expert Rev Obstet* 2010;5:329-46.
22. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007;7:11-22.

Plasma MMP-13 Level in Patients with Invasive Ductal Breast Cancer

Nuntana Meesiripan¹

Anong Tepsuwan²

Thitiluck Swangsri¹

Jaree Svedginda⁴

Porntip Chavalitchewinkoon-Petmitr⁵

Songsak Petmitr^{1*}

Nonglucksanawan Ritthisunthorn¹

Wassana Tangthai³

Tipparat Thiangtrongjit¹

Santi Maneewatchararangsri¹

Somchai Thanasitthichai⁶

Abstract Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-proteolytic endopeptidase enzymes that play an important role in extracellular matrix (ECM) degradation in human cancer progression and may be new targets for cancer therapeutics. This study aimed to detect the plasma level of matrix metalloproteinases 13 (MMP-13) in 108 patients with invasive ductal carcinoma (IDC) and 131 healthy controls with commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The correlations between these protein levels and the clinical characteristics of the patients were also analyzed to elucidate their role in breast-cancer development. The results showed a significantly lower median concentration of MMP-13 in patients compared with controls (89.58 and 289.15 pg/ml, respectively; $P=0.000$). Receiver-operator characteristic (ROC) curve analysis, to determine a cutoff value for plasma MMP-13 concentration in the patients, had an AUC of 0.98 (95% CI=0.97-0.99), with a sensitivity of 91.6% and specificity of 91.7% at cutoff point 169 pg/ml. The results underline the difference in plasma level MMP-13 concentration in IDC development, and may serve as a biomarker for patients. (*Thai Cancer J* 2017;37:105-113)

Keywords: invasive ductal breast cancer, MMP-13, plasma biomarker

¹Department of Molecular Tropical Medicine and Genetics, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, ²Biomarker Development Section, Research Division, ³Out Patient Department, National Cancer Institute, Bangkok, ⁴Out Patient Department, Hospital for Tropical Diseases, ⁵Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, ⁶Department of Surgery, National Cancer Institute, Bangkok

*Correspondence; songsak.pet@mahidol.ac.th

การตรวจวัดระดับ MMP-13 ในพลาสมาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด Invasive ductal carcinoma

โดย นันทนา มีศิริพันธุ์¹ นงลักษณ์วรรณ ฤทธิสุนทร¹ อนงค์ เทพสุวรรณ² วาสนา แดงไทย³

ฐิติลักษณ์ สว่างศรี¹ ทิพรรัตน์ เทียงตรงจิตต์¹ จารีย์ เสวตจินดา⁴ สันติ มณีวัชรรังสี¹

พรทิพย์ เพ็ชรมิตร⁵ สมชาย ธนะสิทธิชัย⁶ ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร¹

¹ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

²งานพัฒนาศาสตร์ทางการแพทย์ กลุ่มงานวิจัย ³กลุ่มงานผู้ป่วยนอก สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข ⁴กลุ่มงานผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน ⁵ภาควิชาพยาธิโปรโตชีว

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ⁶กลุ่มงานศัลยกรรม สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์

กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

Matrix metalloproteinases (MMPs) เป็นสมาชิกในกลุ่มของเอนไซม์ zinc-proteolytic endopeptidases เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการทำหน้าที่ย่อยสลายสารเคลือบเซลล์ (extracellular matrix หรือ ECM) ในขบวนการเกิดโรคมะเร็งในคนและอาจใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาโรคมะเร็ง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดระดับ matrix metalloproteinases 13 (MMP-13) ในพลาสมาของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดลุกลามจำนวน 108 รายและกลุ่มคนสุขภาพปกติ 131 คน ด้วยชุดตรวจ ELISA kit และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน MMP-13 กับลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย ผลการศึกษาพบว่าระดับ MMP-13 ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดลุกลามต่ำกว่าในกลุ่มคนสุขภาพดี (89.58 และ 289.15 pg/ml ตามลำดับ, $P=0.000$) เมื่อวิเคราะห์กราฟ ROC เพื่อหาค่า cut off ของระดับ MMP-13 ในพลาสมาของกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิดลุกลามพบว่ามีความเท่ากับ 169 pg/ml ซึ่งมีค่าพื้นที่ใต้กราฟหรือ AUC เท่ากับ 0.98 (95% CI=0.97 ถึง 0.99) ค่าความไวเท่ากับ 91.6% และความจำเพาะเท่ากับ 91.7% จากผลการศึกษาพบว่าระดับ MMP-13 ในพลาสมามีความแตกต่างกันในกลุ่มของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด IDC กับกลุ่มคนปกติ ดังนั้นอาจนำ MMP-13 มาใช้เป็นตัวตรวจจับทางชีวภาพในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด IDC ได้ (วารสารโรคมะเร็ง 2560;37:105-113) คำสำคัญ: มะเร็งเต้านมชนิดลุกลาม MMP-13 ตัวตรวจจับชีวภาพในพลาสมา

Introduction

Breast cancer is one of the major health problems in women worldwide. WHO predicts that the incidence of new cases will increase from 1.6 million in 2012 to 2.5 million cases in 2035, and the mortality rate will increase from 521,907 cases in 2012 to 846,587 cases in 2035¹. The most common histological subtype of breast cancer is invasive ductal carcinoma (IDC), which generally metastasizes to axillary lymph nodes and causes more severe pathology than other histological types².

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a

family of zinc-proteolytic endopeptidase enzymes play an important role in extracellular matrix (ECM) degradation in human cancers progression³ and may be approached as the new target for cancer therapeutics⁴. Currently, 23 human MMPs have been divided into 6 subgroups including collagenase, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane type MMPs and other MMPs⁵. Among these, MMP-13 also known as collagenase-3, is a member of MMP family in the collagenase subgroup, play a central role in the MMP activation cascade and has an important role in tumor invasion and metastasis by cleavage type II

collagen⁶. The elevated levels of MMP-13 are associated with aggressiveness and shorter overall survival of several cancers including oral cancer⁷, colorectal cancer⁸, glioma⁹ and breast cancer¹⁰. Owing to MMP-13 are secretory proteins it may be exported from the tumor cells into blood circulation and are able to be detected by ELISA method.

This study aimed to determine the plasma levels of MMP-13 in the patients with IDC and healthy women by ELISA method. The correlation between these protein levels to the clinical characteristics of the patients were also analyzed to elucidate their role in breast cancer development.

Materials and methods

Specimens

A total of 108 blood samples from patients diagnosed with IDC, 30-84 years of age, were obtained from the Department of Research and Technology Assessment, National Cancer Institute, Bangkok, Thailand. All patients had not received chemotherapy and/or radiation therapy prior to blood collection. Control group (n=131) constituted Thai healthy women, 36-62 years of age, who had participated in a "Mammogram screening campaign 600 cases for celebration of the Fifth Cycle Birthday Anniversary of HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn" at the Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University and had negative mammogram

(mammographic BI-RADS category 1 and 2) and clinical examination were within normal range.

The study was approved by the Ethics Committee of the National Cancer Institute (101_2015RC_OUT431), Thailand and the Ethics Committee, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok (MUTM 2015-042-01 and MUTM 2015-028-01).

Detection of plasma MMP-13

A 5 ml aliquot of EDTA blood was centrifuged at 1300 g for 10 minutes at 4°C. Plasma was separated and stored at -80°C until used. Plasma MMP-13 content was measured using a human MMP-13 ELISA kit ab100605 (Abcam, England). Plasma MMP-13 concentrations were determined from a calibration curve, linear over the range 8-6000 pg/ml. Each sample was measured in duplicate. Results of the two groups are expressed as median with interquartile range (IQR).

Statistical analysis

Statistical significance of plasma MMP-13 levels between patients and healthy controls were analyzed by independent student *t*-tests. The Kruskal-Willis test was used to analyze the association between plasma MMP concentration and clinicopathological features of the patients. Odds ratios (OR) and 95% confidence interval (CI) were

Table 1 Clinical characteristic data of all invasive ductal carcinoma breast cancer patients (n=108) and healthy women (n=131)

Characteristics	Number (%)
Patients	
Age (yr)	
≤50	57 (52.8)
>50	51 (47.2)
Histological grade	
Well differentiated	24 (22.2)
Moderately differentiated	45 (41.7)
Poor differentiated	39 (36.1)
TNM stage	
I	25 (23.1)
II	38 (35.2)
III	32 (29.6)
IV	13 (12.1)
Tumor size (cm)	
≤3.0	46 (42.6)
>3.0	20 (18.6)
No data	42 (38.9)
Lymph node metastasis	
Negative	30 (27.8)
Positive	45 (41.7)
No data	33 (30.6)
Organ metastasis	
Negative	37 (34.2)
Positive	14 (13.0)
No data	57 (52.8)
Presence of ER, PR, HER2	
Non-triple negative	79 (73.1)
Triple negative	18 (16.7)
No data	11 (10.2)
Healthy women	
Age (yr)	
≤50	53 (40.5)
> 50	78 (59.5)
Mammographic category	
Category 1	21 (16.0)
Category 2	110 (84.0)

also calculated by multiple logistic regression analysis. Cutoff points of patient plasma MMP-13 levels were determined by receiver-operating characteristic (ROC) curve. All statistical tests were carried out using SPSS statistical software version 20.0 for Microsoft Windows, (IBM's Corp., New York, NY, USA).

Results

Mean $\pm$ SD age of the patients was 51 $\pm$ 12 years, with 53% $\leq$ 50 years old. As regards histological feature, 24 (22%) specimens were well differentiated (G I), 45 (42%) moderately differentiated (G II) and 39 (36%) poorly differentiated (G

III). Twenty-five (23%) cases were at TNM stage I, 38 (35%) stage II, 32 (30%) stage III, and 13 (12%) stage IV. Mean $\pm$ SD age of healthy women control was 54 $\pm$ 10 years, with 40% $\leq$ 50 years old. (Table 1).

Median plasma MMP-13 level of patients (89.58 pg/ml, IQR = 48.45-126.91 pg/ml) was lower than that of controls (289.15 pg/ml, IQR=230.60 - 339.40 pg/ml ($P=0.000$, OR=1.60, 95%CI= 1.53-1.68) (Figure 1). ROC curve to determine cut-off value of plasma MMP-13 concentration in patients had an AUC of 0.98 (95%CI=0.97-0.99), with a sensitivity of 91.6% and specificity of 91.7% at cutoff point of 169.36 pg/ml (Figure 2).

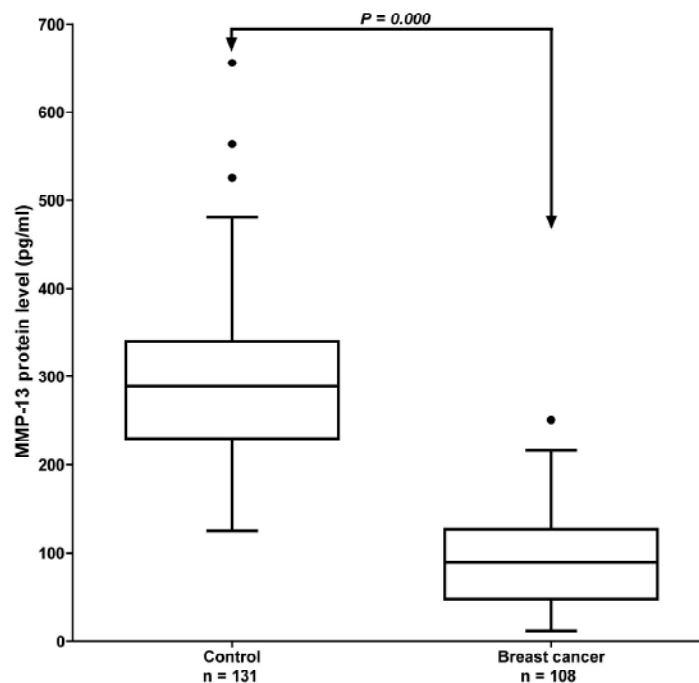


Figure 1 Plasma level of MMP-13. Differences in plasma level of MMP-13 in breast cancer patients and healthy controls. Box plot diagram with median, 1st quartile, 3rd quartile and non-outlier range.

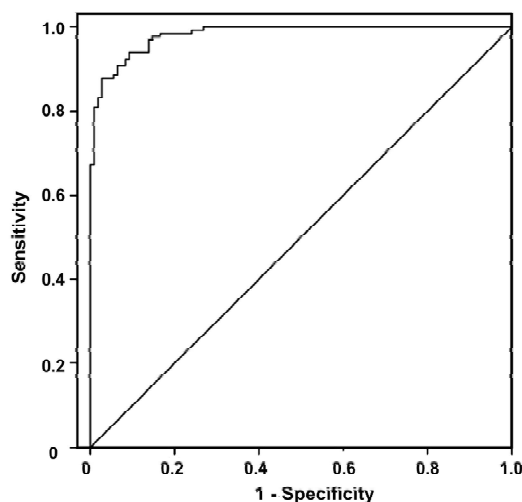


Figure 2 Receiver-operator curves (ROC) analysis. ROC curve for plasma MMP-13 levels with an AUC of 0.98 (95% CI = 0.97-0.99).

The correlation of MMP-13 in the IDC with various clinical data were demonstrated in Table 2. The plasma MMP-13 level of patients is not significantly associated with all clinical features.

Discussion

Mammography is the best technique for detection of breast cancer¹¹ but it can only be performed in a hospital setting due to the high operating cost¹². On the other hand, immunohistochemical technique needs expert pathologist to perform the procedure and to analyze results. Thus, a novel biomarker associated with breast cancer is still needed. This study, the plasma MMP-13 levels in a patients with IDC were measured using commercial ELISA kits.

Little is known for the plasma or serum levels of MMP-13 in several cancer patients. The plasma levels of MMP-13 was higher in prostate cancer patients with metastasis than in the control groups¹³, whereas Bonald CM et al¹⁴ reported no difference concentration of plasma MMP-13 in between prostate cancer patients and healthy controls. Moreover, MMP-13 levels could not be detected in both plasma of breast cancer patients and healthy controls because they did not reach the detection sensitivity of the ELISA kits used in the study¹⁵. However, this study can be detected the MMP-13 concentration in plasma of both two groups. The lower levels of MMP-13 protein in the patients plasma than in the controls found in this study was similar with the previous report in colorectal cancer that the serum MMP-2 levels was

Table 2 Plasma level of MMP-13 in IDC patients in association to clincopathological data

Variables	n	MMP-13 (pg/ml) Median (IQR)	Odds ratio (95%CI)	P
Patients				
Invasive ductal carcinoma	108	89.58 (48.45 - 126.91)		
Age (yr)				
< 50	57	88.03 (39.58 - 123.30)		
> 50	51	91.34 (52.59 - 141.75)	0.800 (0.375 - 1.705)	0.563
Histological grade				
Well differentiated	24	95.87 (57.21 - 144.33)		
Moderately differentiated	45	89.06 (46.79 - 122.05)	1.244 (0.449 - 3.447)	0.675
Poor differentiated	39	88.03 (47.42 - 132.06)	1.007 (0.427 - 2.374)	0.988
TNM stage				
I	25	70.51 (39.58 - 102.68)		
II	38	91.86 (50.10 - 142.89)	0.250 (0.060 - 1.048)	0.058
III	32	89.58 (57.62 - 130.42)	0.494 (0.129 - 1.884)	0.306
IV	13	110.93 (84.12 - 126.39)	0.444 (0.113 - 1.743)	0.245
Tumor size (cm)				
≤ 3.0	46	90.20 (56.07 - 127.42)		
> 3.0	20	100.10 (59.68 - 134.64)	0.727 (0.251 - 2.110)	0.558
Lymph node metastasis				
Negative	30	81.33 (50.10 - 107.84)		
Positive	45	88.03 (43.70 - 123.30)	0.915 (0.363 - 2.308)	0.850
Organ Metastasis				
Negative	37	87.00 (52.16 - 110.71)		
Positive	14	114.02 (53.02 - 127.42)	0.340 (0.900 - 1.282)	0.111
Presence of ER, PR, HER2				
Non-triple negative	79	84.12 (42.67 - 126.91)		
Triple negative	18	106.81 (63.51 - 156.29)	0.561 (0.197 - 1.595)	0.278

Non-triple negative = ER+/-, PR+/-, and HER2+

Triple negative = ER-, PR-, and HER2-

lower than that of healthy control¹⁶ and the lower MMP-1 levels in breast cancer patients than that in healthy controls¹⁵. It was unclear for the unusual lower plasma or serum levels of several MMPs in the cancer patients but Decock J et al¹⁵ hypothesized that this may be reflect the concentration of MMPs in tumor microenvironment. Interestingly, ROC curve analysis to determine cutoff value, sensitivity and specificity of plasma MMP-13 indicate that the potential of this protein may be used as the biomarker for IDC.

In conclusion, the plasma MMP-13 has important roles for IDC development and may be served as a biomarker for IDC. However, further study with larger sample will increase the precision of the data.

Acknowledgments

This study was supported by Mahidol University and the Mammogram Screening Campaign 600 Cases for Cerebration of the Fifth Cycle Birthday Anniversary of H.R.H Princess Maha Chakri Sirindhorn Foundation, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University. The authors thank Ms. Suwapad Junkree for laboratory assistance, Dr. Ngamphol Soonthornworasiri, Ms. Sudaporn Kengkarn for statistical analysis assistance and Prof. Prapon Wilairat, for critical reading of the manuscript.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBALCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No.11 [internet]. Lyon, France:International Agency for Research on Cancer; 2013. Available at: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed January 16, 2016.
2. Makki J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. Clin Med Insights Pathol 2015;8:23-3.
3. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G. Matrix metalloproteinases and cancer-role in threat and therapy. Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15:1085-91.
4. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideals. Genes Dis 2015;2:26-34.
5. Verma RP and Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q) SARs. Bioorg Med Chem 2007;15:2223-68.
6. Leeman MF, Curran S, Murray GI. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. Crit Rev Biochem Mol Biol 2002; 37:149-66.
7. Vincent-Chong VK, Salahshourifar I, Karen-Ng LP, Siow MY, Kallarakkal TG, Ramanathan A, et al. Overexpression of MMP-13 is associated with clinical outcomes and poor prognosis on oral squamous cell carcinoma. Sci World J 2014;897523.
8. Yang B, Gao J, Rao Z, Shin Q. Clinicopathological significance and prognostic value of MMP-13 expression in colorectal cancer. Scan J Clin Lab Invest 2012;72:501-5.
9. Wang J, Li Y, Wang J, Li C, Yu K, Wang Q. Increased expression of matrix metalloproteinase-13 in glioma is associated with poor overall survival of patients. Med Oncol 2012;29:2432-37.
10. Chang HJ, Yang MJ, Yang YH, Hou MF, Hsueh EJ, Lin SR. MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis. Oncol Rep 2009;22:1119-27.
11. Bleyer A and Welch HG. Effect of three decades of screening mammography on breast cancer incidence. N Engl J Med 2012;367:1998-2005.
12. Leung J, McKenzie S, Martin J, McLaughlin D. Effect of rurality on screening for breast cancer: a systematic review and meta-analysis comparing mammography. Rural Remote Health 2014;14:2730.

13. Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Madonia M, Indelicato M, Travalì S, et al. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res* 2005; 33:44-50.
14. Bonald CM, Azzalis LA, Junqueira VBC, de Oliveira CG, Vilas Boas VA, Gáscon TM, et al. Plasma levels of E-cadherin and MMP-13 in prostate cancer patients: correlation with PSA, testosterone and pathological parameters. *Tumori* 2015;101:185-8.
15. Decock J, Hendrickx W, Vanleeuw U, Van Belle V, Van Huffel S, Christiaens MR, et al. Plasma MMP1 and MMP8 expression in breast cancer: protective role of MMP8 against lymph node metastasis. *BMC Cancer* 2008;8:77.
16. Groblewska M, Mroczko B, Gryko M, Pryczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Kędra B, et al. Serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) in colorectal cancer patients. *Tumor Biol* 2014;35:3793-802.

p95HER2 กับมะเร็งเต้านม

อดิสร เจษฎาปิยะวงศ์¹

อนันท์นุช ศักดิ์อภิภูญนันท์²

สมชาย ธนะสิทธิชัย¹

บทคัดย่อ Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) อยู่ในกลุ่มของ epidermal growth factor receptor ที่เป็น tyrosine kinases มีบทบาทสำคัญกับการเกิดโรคมะเร็งหลายชนิด ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ HER2 มีการพยากรณ์โรคในทางไม่ดี HER2 ช่วยทำนายการตอบสนองต่อการรักษาด้วยสารต้าน HER2 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ปัจจุบันผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการแสดงออกของ HER2 มักได้รับการรักษาด้วย trastuzumab ซึ่งเป็น monoclonal antibodies ต่อ extracellular domain ของ HER2 receptor และสารโมเลกุลเล็กที่ยับยั้ง intracellular kinase domain (เช่น lapatinib, neratinib และ afatinib) อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยหลายรายที่ดื้อต่อ HER2 monoclonal antibody, trastuzumab จากการศึกษาพบว่า p95HER2 เป็นกลุ่มย่อยของ HER2 ที่มี kinase activity และมีความสัมพันธ์กับปัจจัยการพยากรณ์โรคในทางลบ ได้แก่การกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลือง ระยะเวลาปลอดโรคและระยะเวลากการรอดชีพที่สั้นลงในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี HER2 บวก p95HER2 อาจช่วยบอกการดื้อต่อ trastuzumab ได้เนื่องจากไม่มีส่วน extracellular domain ซึ่งเป็นส่วนที่จับกับ trastuzumab การตรวจหาการแสดงออกของ p95HER2 อาจมีประโยชน์ในการช่วยตัดสินใจเลือกวิธีการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี HER2 บวก แม้ว่า p95HER2 ช่วยบอกการดื้อต่อ trastuzumab แต่ p95HER2 ยังคงมี HER2 tyrosine kinase domain และไวต่อตัวยับยั้ง kinase อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในบางรายงานพบว่าก้อนมะเร็งที่มีการแสดงออกของ p95HER2 ตอบสนองต่อ trastuzumab ร่วมกับเคมีบำบัด (วารสารโรคมะเร็ง 2560;37:114-122)

คำสำคัญ: p95HER2, epidermal growth factor receptor, มะเร็งเต้านม

¹กลุ่มงานวิจัย ²กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

p95HER2 and Breast Cancer

by Adisorn Jedpiyawongse¹, Anantnuch Sakapiboonnan², Somchai Thanasitthichai¹

¹Research Division, ²Pathology Division, National Cancer Institute, Bangkok 10400

Abstract Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is a member of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases, and plays a significant role in a variety of cancers. HER2-positive breast-cancer patients have a poor prognosis, and HER2 can predict the response to anti-HER2 therapy among breast-cancer patients. HER2-positive breast cancers are currently treated with trastuzumab, monoclonal antibodies against the extracellular domain of the HER2 receptor, and small molecules that inhibit the intracellular kinase domain (e.g., lapatinib, neratinib, and afatinib). However, many patients are resistant to the HER2 monoclonal antibody, trastuzumab. It has been found that p95HER2 is a subgroup of HER2 protein with kinase activity and is associated with negative prognostic factors, including positive nodal status, shorter progressive free survival, or overall survival, in HER2-positive breast cancer. p95HER2 is likely a determinant of trastuzumab resistance, because it lacks the HER2 extracellular domain which is the binding site for trastuzumab. Identification of a subgroup with high p95HER2 expression may be useful in guiding treatment decisions for patients with HER2-positive breast cancer. Although p95HER2 confers trastuzumab resistance, it retains the HER2 tyrosine kinase domain and is sensitive to kinase inhibitors. However, some results showed that tumors expressing p95HER2 responded to trastuzumab plus chemotherapy. (Thai Cancer J 2017;37:114-122)

Keywords: p95HER2, epidermal growth factor receptor, breast cancer

บทนำ

ยีน HER2 (human epidermal growth factor receptor 2 อาจเรียกว่า ErbB2 หรือ Neu) อยู่บน chromosome 17q21 ถอดรหัสให้โปรตีนเป็น trans-membrane tyrosine kinase receptor มีขนาด 185 kDa HER2 หรือ ErbB2 จัดอยู่ในกลุ่ม epidermal growth factor receptor (EGFR) หรือ HER family ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด คือ EGFR/HER1, HER2, HER3 และ HER4 โดยทุกชนิดจะมีส่วนของโครงสร้างที่คล้ายกัน คือ extracellular ligand-binding domain, short hydrophobic transmembrane region (lipophilic transmembrane domain) และ cytoplasmic tyrosine kinase domain (intracellular tyrosine kinase domain)^{1,2} เมื่อมีการกระตุ้น receptor kinase จะนำไปสู่การเกิด phosphorylation ของ tyrosine

residues อื่น ๆ phosphorylated tyrosine residues ที่อยู่ภายใน receptors จะเป็นสื่อในการกระตุ้น signaling pathways ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโต เปลี่ยนแปลงรูปร่างและมีชีวิตรอด³

ร้อยละ 15-25 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมมีการแสดงออกหรือเพิ่มจำนวนของ HER2 ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค (aggressive phenotype)^{4,5} และการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี (poor prognosis)⁶ จากการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชาวไทยพบ HER2/neu amplification ร้อยละ 37.5 และพบว่ามี ความสัมพันธ์กับการเพิ่มอัตราการเสียชีวิต⁷

ปัจจุบันมีการพัฒนาแนวทางการรักษา ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี HER2 บวก โดยการใช้ monoclonal antibodies เช่น trastuzumab, pertuzumab และ trastuzumab-DM1 ซึ่งจะจับกับ extracellular

domains ของ HER2 receptor^{8,9} และใช้ tyrosine kinase inhibitors ของ HER2 เช่น lapatinib, neratinib และ afatinib ยับยั้งส่วน intracellular kinase domain^{10,11} นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการรักษาด้วย anti-HER2 มีผลทำให้การกระจายของเซลล์มะเร็งไปที่สมองช้าลง¹²⁻¹⁵

Trastuzumab เป็น recombinant humanized monoclonal antibody จะจับกับ extracellular domain IV ของ HER2 ได้อย่างมั่นคง¹⁶⁻¹⁸ ยับยั้งการเกิด intracellular signaling ที่เกิดจากการชักนำของ HER2 สามารถทำให้เกิด HER2 internalization และทำให้จำนวน membrane-bound HER2 ลดลง¹⁹ และในระยะยาว trastuzumab ยังทำให้ HER2 receptors ลดลงอย่างชัดเจน และยังทำให้เกิด antibody-dependent cellular toxicity (ADCC) มีรายงานพบว่าการแสดงออกของ HER2 สูงสัมพันธ์กับระยะเวลารอดโรคนานขึ้นเมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย trastuzumab²⁰ สำหรับผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะลุกลามที่มี HER2 บวก ได้รับการรักษาด้วย trastuzumab ควบคู่กับเคมีบำบัดจะช่วยให้ผู้ป่วยมีระยะรอดชีพนานขึ้น^{8,21-25} นอกจากนี้ trastuzumab ยังทำให้ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะแรกที่มี HER2 บวกมีอัตราการรอดโรคและรอดชีพสูงขึ้น²⁶⁻²⁸ อย่างไรก็ตาม trastuzumab ทำให้เกิด cardiotoxicity สามารถเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเกิด symptomatic congestive heart failure²⁹

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าร้อยละ 70-80 ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี HER2 บวกไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย trastuzumab เพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจเนื่องมาจากการดื้อต่อยาตั้งแต่เริ่มรับยาหรือภายหลังที่ได้รับยาไประยะหนึ่ง (primary หรือ acquired

resistance) อาจมีกลไกหลายกลไกที่ทำให้ดื้อต่อ trastuzumab เช่นการสูญเสียการทำงานของ phosphatase and tensin homolog (PTEN)³⁰ และการทำงานของ tyrosine kinase receptors ชนิดอื่นเช่น insulin-like growth factor-I receptor³¹ และอาจเกิดจากกลไกอื่นเช่นการมี truncate forms ของ HER2 receptor ซึ่งเป็น HER2 receptor ที่ขาด extracellular trastuzumab-binding domain ซึ่งเป็น amino terminally truncated carboxyl terminal fragments ของ HER2 (HER2-CTFs) เรียกว่า p95HER2 (p95) หรือ C-terminal fragments มักพบได้บ่อยใน cell lines ของมะเร็งเต้านมที่มี HER2 บวก และโรคมะเร็งบางชนิด³²⁻³⁴

กลไกการเกิด p95HER2

จากการทำ western blot พบว่า HER2-CTFs เป็นกลุ่มของโปรตีนใน HER2-ICD (intracellular domain) มี relative migration (Mr) ที่ประมาณ 95 kDa^{33,35} HER2-CTFs เกิดจากกลไกที่สำคัญสองกลไกคือ การทำงานของเอนไซม์ protease (protease activity)^{36,37} และการเปลี่ยนจุดเริ่มต้นของขบวนการแปลรหัส (alternative initiation of translation)³⁸ ทำให้เกิด HER2-CTFs ในสัดส่วนและการทำงานที่ต่างกัน

การทำงานของเอนไซม์ protease

การปลดโปรตีนส่วน extracellular domain ออกจากโปรตีน HER2 สายเต็ม (full-length HER2) โดยการทำงานของเอนไซม์ protease (protease activity)³⁵⁻³⁷ เช่น metalloprotease³⁷ จะตัดที่บริเวณ proximal transmembrane domain ทำให้ได้สอง receptor fragments คือ 95-100 kDa p95HER2 fragments

หรือ HER2-CTF ที่มี NH2 terminus ที่ A648 ส่วนนี้จะฝังอยู่ใน plasma membrane ซึ่งบอกถึงมีการทำลาย trastuzumab binding โดยการปลดตำแหน่งที่ trastuzumab จับออกบางส่วนหรือทั้งหมด³⁹ และส่วนที่เป็น extracellular domain (ECD) จะถูกปลดปล่อยเข้าไปใน extracellular compartment²⁹ ดังนั้นจึงมีการใช้ HER2-ECD เป็นตัวบ่งชี้การวินิจฉัยพยากรณ์โรค และทำนายผลการรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม⁴⁰ ตรวจโดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสามารถตรวจหา HER2-ECD ใน serum ได้ มีรายงานพบ HER2-ECD ร้อยละ 45 ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการลุกลาม และยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดและฮอร์โมนลดลง^{41,42}

การเปลี่ยนจุดเริ่มต้นของขบวนการแปลรหัส

ปกติการแปลรหัส HER2 mRNA เพื่อให้ได้โปรตีน HER2 เริ่มที่ AUG codon ทำให้ได้โปรตีน HER2 สายเต็มซึ่งมีจำนวน 1255 amino acid มีขนาด 185 kDa แต่เมื่อมีการเปลี่ยนจุดเริ่มต้นการแปลรหัสที่ AUG codon ไปเป็นการแปลรหัสจากสอง methionine residues (M611 และ M687) ซึ่งอยู่ก่อน (upstream) และหลัง (downstream) ของ transmembrane domain ตามลำดับ³⁸ ทำให้ได้ 100-115 kDa p95HER2 fragments (M611-HER2-CTF) และ 90-95 kDa p95HER2 fragments (M687-HER2-CTF) โดย M611-HER2-CTF หรือ p95HER2 สามารถรวมเข้าด้วยกันกับ secretory pathway และเคลื่อนย้ายไปอยู่ที่ plasma membrane ส่วน M687-HER2-CTF เป็น soluble intracellular p95HER2 fragments สามารถพบได้ทั้งใน

cytoplasm และใน nucleus⁴³

M611-HER2-CTF หรือ p95HER2 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด signal transduction pathways มากที่สุด กระตุ้น signaling cascades ต่างๆ ได้อย่างรวดเร็วและรุนแรงกว่า⁴⁴ และทำให้เกิด phosphorylation ของ Erk1/2, Akt, Src และ regulatory proteins อื่นได้มากที่สุด ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีการทำงานมาก (highly active)⁴⁵ ทำให้เซลล์มี migration ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า HER2 receptor สายเต็ม และพบว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อต่อ trastuzumab⁴⁶ ส่วน A648-HER2-CTF ที่เกิดจากการตัดสาย HER2 ด้วยเอนไซม์ protease⁴⁷ มีความสามารถในการทำงานน้อยกว่า M611-HER2-CTF โดยทำให้เกิด phosphorylation ได้น้อยกว่า⁴⁴ ส่วน M687-HER2-CTF เป็นรูปแบบที่มีจำนวนมากกว่า M611-HER2-CTF แต่เป็น p95HER2 ที่ไม่ทำงาน (inactive) ถึงแม้จะมีส่วนของ kinase domain ที่สมบูรณ์ แต่เนื่องจากขาด transmembrane domain ทำให้ไม่สามารถ dimerized หรือทำปฏิกิริยากับ HER family members อื่น⁴⁴

การตรวจหา p95HER2

เนื่องจากการตรวจการแสดงออกของ HER2 ไม่ว่าจะเป็นวิธี fluorescence in situ hybridization (FISH), immunohistochemistry (IHC) และการตรวจ HER2-ECD ในซีรัมโดยวิธี ELISA ยังไม่เพียงพอในการประกอบการรักษา การตรวจหาการแสดงออกของ p95HER2 จึงเป็นอีกหนึ่งวิธีที่น่าจะนำมาประกอบการตัดสินใจในการรักษา การแสดงออกของ p95HER2 สามารถใช้พยากรณ์โรคและการดื้อต่อ trastuzumab

ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม วิธี western blot เป็น gold standard ในการตรวจหา p95HER2 โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นชิ้นเนื้อสด (fresh-frozen tumor tissue) ซึ่งต้องใช้จำนวนมากจึงเป็นข้อจำกัดในทางปฏิบัติ ผลการวิเคราะห์เป็นแบบ semiquantitative ให้ผลไม่แม่นยำเนื่องจากมี overlapping bands เหมาะสำหรับงานวิจัยยังไม่เหมาะกับงานประจำ^{33,35,48}

วิธี IHC และ immunofluorescence ต้องทำการทดสอบสองครั้งคือตรวจส่วน extracellular (HER2-ECD) โดยใช้แอนติบอดีที่เฉพาะกับส่วน ECD เช่น 4D5 antibody และตรวจส่วน intracellular (HER2-ICD) p95HER2 โดยใช้แอนติบอดีที่เฉพาะกับส่วน ICD เช่น CB11 antibody⁴⁴ สามารถนำมาใช้ตรวจในงานประจำโดยใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อฝังพาราฟิน (formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections)^{44,45} พบว่าค่า positive predictive value ของ p95HER2 ด้วยวิธี immunofluorescence เท่ากับร้อยละ 100 และ negative predictive value เท่ากับร้อยละ 94 ซึ่งอาจถูกรบกวนด้วย inactive M687-HER2-CTF ได้⁴⁵

วิธี p95 VeraTag เป็นการหาปริมาณ (quantitative) สามารถตรวจได้ในชิ้นเนื้อฝังพาราฟิน มีความจำเพาะกับ membrane-bound forms ของ HER2-CTF ที่มี M611 เป็น epitope แอนติบอดี (D9) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ไม่สามารถตรวจหา inactive, non-membrane-bound เช่น M687-HER2-CTF โดยแอนติบอดีที่ใช้ในการวิเคราะห์ (D9) สามารถตรวจหา HER2-CTFs ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ protease รูปแบบต่าง ๆ ได้มากที่สุด แต่ไม่สามารถตรวจหารูปแบบที่เป็น A648-HER2-CTF เพราะ

sequence ของ A648-HER2-CTF ไม่ได้อยู่ใน immunization peptide (peptide D; Met611-Cys623) ที่ใช้สร้าง epitope แอนติบอดี (D9) ที่ใช้ตรวจจับ⁴⁹ และพบว่าวิธี p95 VeraTag ให้ผลสอดคล้องกับ western blot⁴⁹ นอกจากนั้นยังพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ HER2 ที่ตรวจโดยวิธี VeraTag HER2 assay หรือ FISH/CEP17 amplification และมี p95 HER2 ปริมาณสูงที่วัดได้จากวิธี VeraTag p95 มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาปลอดโรคและระยะเวลารอดชีพที่สั้นลง⁴⁹

การตรวจหาการแสดงออกของ p95HER2 ด้วยวิธี immunofluorescence พบว่าผลการตรวจพบ p95HER2 มีความสัมพันธ์กับการไม่ตอบสนองต่อ trastuzumab โดยร้อยละ 88.9 ของผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ p95HER2 ที่ตรวจด้วยวิธีนี้ไม่ตอบสนองต่อ trastuzumab อย่างไรก็ตามผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ HER2 และไม่พบการแสดงออกของ p95HER2 ยังคงพบว่าไม่ตอบสนองต่อ trastuzumab ถึงร้อยละ 48.6⁴⁵ เนื่องจากยังมีกลไกอื่นที่มีผลทำให้ดื้อต่อ trastuzumab เช่น การสูญเสียการทำงานของ PTEN³⁰ และการมี insulin-like growth factor-I receptor มากขึ้น³¹ ส่งผลให้ผู้ป่วยที่มี HER2 ไม่ตอบสนองต่อ trastuzumab

แผนการณการรักษผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี p95HER2 บวก

- Trastuzumab

p95HER2 เป็น HER2 ที่ส่วน extracellular domain (ECD) ขาดส่วน trastuzumab-binding

portion มีผลทำให้ดื้อต่อ trastuzumab จากการศึกษานี้ใน cell lines ของมะเร็งเต้านมพบว่า trastuzumab จะลดการหลุดไปของส่วน extracellular domain ในขณะที่ pertuzumab ไม่มีบทบาทดังกล่าว แต่เป็นแอนติบอดีที่ยับยั้งการรวมตัวของ HER2 กับ HER ชนิดอื่นที่บริเวณ HER2 ectodomain³⁴ ทำให้ trastuzumab มีประโยชน์ในผู้ป่วยมะเร็งที่มี p95HER2 ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ protease และพบว่า trastuzumab เสริมฤทธิ์ของ pertuzumab⁵⁰ อาจใช้การตรวจหา HER2-ECD ในซีรัมช่วยพยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาด้วย trastuzumab^{51,52}

การรักษาด้วย trastuzumab-based immunotoxins เช่น trastuzumab-DM1 พบว่าได้ผลดีทั้งในสัตว์ทดลอง⁵³ และในผู้ป่วยที่มี HER2 บวกและ p95HER บวก²⁹

- HER2-sheddase inhibition

ในมะเร็งเต้านม ADAM10 protease เป็นเอนไซม์หลักที่ทำให้บางส่วนของ HER2 หลุดไป³⁷ ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของ protease ชนิดนี้ด้วย ADAM10/17 inhibitor ร่วมกับ trastuzumab พบว่าสามารถเพิ่มการตอบสนองต่อ trastuzumab ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี p95HER2 บวก²⁹

- Tyrosine kinase inhibitors

p95HER2 มีการทำงานของ tyrosine kinase มากกว่า p185HER2^{54,55} จากการศึกษพบว่า lapatinib สามารถยับยั้ง tyrosine phosphorylation และขบวนการ phosphorylation ของ downstream signaling proteins, Akt และ MAPKs ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ T47D cells ที่มีการแสดงออกของ HER2

หรือ p95HER2 ทำให้เซลล์มะเร็งไม่แบ่งตัวอย่างรวดเร็ว⁴⁵ และยังได้ผลในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี p95HER2 บวก⁵⁶

สรุป

กลไกพื้นฐานของการเกิด p95HER2 expression ในมะเร็งเต้านมยังคงไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าในเซลล์มะเร็งที่มี p95HER2 มีการตัดออกของ extracellular domain (shedding of the extracellular domain) ทำให้ดื้อต่อ trastuzumab ปัจจุบันการศึกษา กลไกต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยายังคงพบแต่ในห้องปฏิบัติการ การศึกษา retrospective ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งเต้านมยังคงมีจำนวนน้อย การศึกษาอุบัติการณ์และกลไกการดื้อต่อ trastuzumab ยังคงดำเนินต่อไปเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจน และวิธีการตรวจตัวบ่งชี้การดื้อต่อยา (biomarkers of resistance) ต้องมีการพัฒนาให้สามารถตรวจได้แม่นยำมากขึ้น ปัจจุบันยังไม่มีการตรวจที่เฉพาะกับกลไกต่าง ๆ ส่วนใหญ่ยังอยู่ในขั้นตอนการทดลอง เพื่อให้ได้วิธีการตรวจที่เหมาะสมได้ผลถูกต้องแม่นยำอันจะเป็นประโยชน์สูงสุดต่อการรักษาผู้ป่วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์ ที่ตรวจต้นฉบับและให้คำแนะนำ/แก้ไขในการเขียนบทความนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Yarden Y, Baselga J, Miles D. Molecular approach to breast cancer treatment. *Semin Oncol* 2004;31: 6-13.

2. Hynes NE, Lane HA. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341.
3. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001;37:S3-S8.
4. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
5. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.
6. Tural D, Akar E, Mutlu H, Kilickap S. P95 HER2 fragments and breast cancer outcome. *Expert Rev Anti-cancer Ther* 2014;14:1089-96.
7. Sunanta Chariyalertsak, Wichai Purisa, Songkhun Vinyuvat. HER-2/neu Amplification Determined by Real-Time Quantitative PCR and Its Association with Clinical Outcome of Breast Cancer in Thailand. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2011;12:1703-6.
8. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
9. Hudis CA. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007;357:39-51.
10. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2733-43.
11. Gomez HL, Doval DC, Chavez MA, Ang PC, Aziz Z, Nag S, et al. Efficacy and safety of lapatinib as first-line therapy for ErbB2-amplified locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:2999-3005.
12. Chien AJ, Rugo HS. Emerging treatment options for the management of brain metastases in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137:1-12.
13. Dawood S, Gonzalez-Angulo AM. Progress in the biological understanding and management of breast cancer-associated central nervous system metastases. *Oncologist* 2013;18:675-84.
14. Park IH, Ro J, Lee KS, Nam BH, Kwon Y, Miles D. Trastuzumab treatment beyond brain progression in HER2-positive metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2009;20:56-62.
15. Swain SM, Baselga J, Miles D, Im YH, Quah C, Lee LF, Cortés J. Incidence of central nervous system metastases in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel: results from the randomized phase III study CLEOPATRA. *Ann Oncol* 2014;25:1116-21.
16. Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, Ullrich A. p185HER-2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 1989;9:1165-72.
17. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, et al. Humanization of an anti-p185HER-2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4285-9.
18. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;12:541-52.
19. Baselga J, Albanell J, Molina MA, Arribas J. Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol* 2001;28:4-11.
20. Lipton A, Köstler WJ, Leitzel K, Ali SM, Sperinde J, Weidler J, et al. Trastuzumab Response Biomarker Group. Quantitative HER2 protein levels predict outcome in fluorescence in situ hybridization-positive patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Cancer* 2010;116:5168-78.
21. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719-26.
22. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185 HER-2 monoclonal antibody in patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:737-44.

23. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER-2 monoclonal antibody in women who have HER-2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-48.
24. Baselga J, Carbonell X, Castaneda-Soto NJ, Clemens M, Green M, Harvey V, et al. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 2005;23:2162-71.
25. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005;23:4265-74.
26. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-84.
27. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER-2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-72.
28. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Pawlicki M, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (ACT) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (ACTH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER-2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. *Breast Cancer Res Treat* 94 (suppl 1), S4 (2005) (Abstract 1).
29. Zagozdzon R, Gallagher WM, Crown J. Truncated HER2: implications for HER2-targeted therapeutics. *Drug Discov Today* 2011;16:810-6.
30. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;6:117-27.
31. Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1852-7.
32. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009;14:320-68.
33. Molina MA, Saez R, Ramsey EE, Garcia-Barchino MJ, Rojo F, Evans AJ, et al. NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:347-53.
34. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (Herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:4744-9.
35. Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, Ramsey EE, Holmes R, Keenan EJ, et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res* 1998;58:5123-9.
36. Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J. Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:1196-201.
37. Liu PC, Liu X, Li Y, Covington M, Wynn R, Huber R, et al. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2006;5:657-64.
38. Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, Santiago Josef B, Todo FR, Baselga J, et al. Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J* 2006;25:3234-44.
39. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003;421:756-60.

40. Hayes DF, Yamauchi H, Broadwater G, Cirincione CT, Rodrigue SP, Berry DA, et al. Circulating HER-2/erbB-2/c-neu (HER-2) extracellular domain as a prognostic factor in patients with metastatic breast cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 8662. *Clin Cancer Res* 2001;7:2703-11.
41. Colomer R, Llombart-Cussac A, Lluch A, Barnadas A, Ojeda B, Carañana V, et al. Biweekly paclitaxel plus gemcitabine in advanced breast cancer: phase II trial and predictive value of HER2 extracellular domain. *Ann Oncol* 2004;15:201-6.
42. Colomer R, Llombart-Cussac A, Tusquets I, Rifà J, Mayordomo JI, Ojeda B, et al. Biweekly gemcitabine plus vinorelbine in first-line metastatic breast cancer: efficacy and correlation with HER2 extracellular domain. *Clin Transl Oncol* 2006;8:896-902.
43. Arrisbas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL. p95HER2 and breast cancer. *Cancer Res* 2011;71:1515-9.
44. Pedersen K, Angelini PD, Laos S, Bach-Faig A, Cunningham MP, Ferrer-Ramón C, et al. A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Mol Cell Biol* 2009;29:3319-31.
45. Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, Anido J, Guzman M, Cortes J, et al. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:628-38.
46. Chandarlapaty S, Scaltriti M, Angelini P, Ye Q, Guzman M, Hudis CA, et al. Inhibitors of HSP90 block p95-HER2 signaling in Trastuzumab-resistant tumors and suppress their growth. *Oncogene* 2010;29:325-34.
47. Yuan CX, Lasut AL, Wynn R, Neff NT, Hollis GF, Ramaker ML, et al. Purification of Her-2 extracellular domain and identification of its cleavage site. *Protein Expr Purif* 2003;29:217-22.
48. Sáez R, Molina MA, Ramsey EE, Rojo F, Keenan EJ, Albanell J, et al. p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:424-31.
49. Sperinde J, Jin X, Banerjee J, Penuel E, Saha A, Diedrich G, et al. Quantitation of p95HER2 in Paraffin Sections by Using a p95-Specific Antibody and Correlation with Outcome in a Cohort of Trastuzumab-Treated Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2010;16:4226-35.
50. Scheuer W, Friess T, Burtscher H, Bossenmaier B, Endl J, Hasmann M, et al. Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res* 2009;69:9330-6.
51. Witzel I, Loibl S, von Minckwitz G, Mundhenke C, Huober J, Hanusch C, et al. Monitoring serum HER2 levels during neoadjuvant trastuzumab treatment within the GeparQuattro trial. *Breast Cancer Res Treat* 2010;123:437-45.
52. Ali SM, Carney WP, Esteva FJ, Fornier M, Harris L, Köstler WJ, et al. Serum HER-2/neu and relative resistance to trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Cancer* 2008;113:1294-301.
53. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* 2008;68:9280-90.
54. Segatto O, King CR, Pierce JH, Di Fiore PP, Aaronson SA. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. *Mol Cell Biol* 1988;8:5570-4.
55. Lehtöslähti H, Lehtola L, Sistonen L, Alitalo K. A chimeric EGF-R-neu proto-oncogene allows EGF to regulate neu tyrosine kinase and cell transformation. *EMBO J* 1989;8:159-66.
56. Scaltriti M, Nuciforo P, Bradbury I, Sperinde J, Serra V, Parra JL, et al. High HER2 expression correlates with response to trastuzumab and the combination of trastuzumab and lapatinib in the NeoALTTO phase III trial. *Cancer Res* 2013;73:Abstract nr P1-08-42.

คำแนะนำการส่งต้นฉบับ

วารสารโรคมะเร็งยินดีรับบทความทางวิชาการหรือเรื่องราวที่น่าสนใจเกี่ยวกับโรคมะเร็งเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในวารสารนี้ สำหรับบทความที่ตีพิมพ์ในวารสารนี้ถือว่าเป็นลิขสิทธิ์ของวารสารโรคมะเร็ง และเป็นผลงานวิชาการหรือวิจัยของคณะผู้เขียนไม่ใช่ความคิดเห็นของบรรณาธิการหรือผู้จัดทำขอให้ผู้นิพนธ์ส่งต้นฉบับที่จัดเตรียมถูกต้องตามคำแนะนำในเอกสารนี้มายังบรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 หรือทาง E-mail: thaicancerj@gmail.com

ประเภทของบทความ

นิพนธ์ต้นฉบับ (Original Articles)

ควรเขียนลำดับเป็นข้อๆ ได้แก่ บทคัดย่อ (ทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย) บทนำสั้นๆ (เหตุผลที่ทำการศึกษานี้ รวมทั้งวัตถุประสงค์) วัสดุและวิธีการ ผลการศึกษา วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง

รายงานผู้ป่วย (Case Report)

ควรประกอบด้วยบทคัดย่อ (ทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย) บทนำ รายงานผู้ป่วย บทวิจารณ์ ข้อคิดเห็น สรุป และเอกสารอ้างอิง

บทความทางวิชาการหรือบทพินิจวิชาการ (Review Articles)

ควรเป็นบทความที่ให้ความรู้ รวบรวมสังเคราะห์พบใหม่หรือเรื่องที่น่าสนใจที่ผู้อ่านนำไปประยุกต์ได้ ประกอบด้วย บทนำ ความรู้เกี่ยวกับเรื่องที่เขียน และเอกสารอ้างอิง

การเตรียมต้นฉบับ

1. บทความที่ส่งมาเพื่อตีพิมพ์ต้องส่งต้นฉบับ 2 ชุด (พร้อมไฟล์) และต้องไม่เคยตีพิมพ์หรือกำลังส่งตีพิมพ์ที่ใด

2. บทความที่พิมพ์รับทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ถ้าเป็นภาษาไทยควรหลีกเลี่ยงคำภาษาอังกฤษ ยกเว้นในกรณีจำเป็นเท่านั้น พยายามไม่ใช้คำย่อ นอกจากคำที่ยอมรับกันโดยทั่วไป

3. บทคัดย่อ ให้ย่อทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษไม่ว่าเนื้อเรื่องจะเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ และมีคำสำคัญ (Key words) ด้วย

4. ชื่อเรื่องและชื่อผู้เขียน ต้องมีทั้งภาษาไทย และภาษาอังกฤษ พร้อมด้วยสถาบันที่ทำงาน (ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ) และระบุผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ (corresponding author)

5. ต้นฉบับต้องพิมพ์อย่างชัดเจนมีระยะห่างระหว่างบรรทัด 2 ช่อง พิมพ์หน้าเดียวในกระดาษ A4 โดยพิมพ์ห่างจากขอบทุกด้าน 1 นิ้ว โดยตลอด และ ใส่เลขหน้าทางมุมขวามุมบน

6. ภาพประกอบ ถ้าเป็นภาพใช้ภาพขาวดำ ขนาดโปสเตอร์ ผิวหน้าเรียบเป็นมัน หรือพิมพ์จากคอมพิวเตอร์โดยใช้เครื่องพิมพ์เลเซอร์ ให้ใหญ่กว่าขนาดที่จะตีพิมพ์เพื่อให้ได้ภาพชัดเจน กำกับหมายเลขภาพ ชื่อผู้เขียนไว้ด้านหลังภาพทุกภาพ พิมพ์คำบรรยายภาพเป็นลำดับแยกไว้ในกระดาษอีกแผ่น

7. ตาราง พิมพ์แยกต่างหากโดยมีหัวข้อ (title) และเชิงอรรถ (foot note) พร้อมทั้งอธิบายตัวย่อในตารางตลอดจนบอกนัยสำคัญทางสถิติอย่างครบถ้วน

8. เอกสารอ้างอิง ใช้ระบบแวนคูเวอร์ซึ่งเป็นระบบที่ใช้กันอยู่ในวารสารทางการแพทย์ชั้นนำในขณะนี้ ให้กำกับการอ้างอิงด้วยหมายเลขและเรียงลำดับการอ้างอิงหมายเลขที่กำกับในรายชื่อเอกสารอ้างอิงจะต้องตรงกับหมายเลขในเนื้อเรื่องด้วย

การเขียนเอกสารอ้างอิง

8.1 จากวารสาร

วารสารภาษาอังกฤษ ประกอบด้วยชื่อผู้แต่ง (ถ้ามีผู้แต่งไม่เกิน 6 คน ให้ใส่ชื่อทุกคนแต่ถ้ามี 7 คน ขึ้นไปให้ใส่เพียง 6 ชื่อแรก แล้วเติม et al.) ชื่อเต็มของบทความ ชื่อย่อวารสาร (ใช้ตาม Index Medicus) ปีที่พิมพ์; ปีที่หน้าแรก-หน้าสุดท้าย.

วารสารภาษาไทย ให้เขียนแบบเดียวกับภาษาอังกฤษ เว้นแต่ชื่อผู้เขียนใช้ชื่อเต็มโดยใส่ชื่อตัวก่อนแล้วตามด้วยนามสกุลและใช้ปี พ.ศ.

ตัวอย่าง

1. Chariyalertsak S, Sirikulchayanonta V, Mayer D, Kopp-Schneider A, Fuerstenberger G, Marks F, et al. Aberrant cyclooxygenase isozyme expression in human intrahepatic cholangio carcinoma. Gut 2001;48:80-6.

2. สุนันทา จริยาเลิศศักดิ์, พงษ์กิตติ จิตุภกร, สุวัฒน์ จริยาเลิศศักดิ์. Proliferating Cell Nuclear Antigen ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านม: บทบาทในการพยากรณ์โรค.วารสารโรคมะเร็ง 2542;25:1-6.

8.2 จากหนังสือและโมโนกราฟอย่างอื่น

8.2.1 ผู้นิพนธ์เป็นบุคคล ตัวอย่างเช่น

Getzen TE. Health economics: fundamental of funds. New York: John Wiley & Sons; 1997.

8.2.2 บรรณาธิการ ผู้รวบรวม ประธานที่เป็นผู้นิพนธ์ ตัวอย่างเช่น

Millares M, editor. Applied drug information: strategies for information management. Vancouver, WA: Applied Therapeutics, Inc.; 1998.

8.2.3 บทหนึ่งในหนังสือหรือตำรา ตัวอย่างเช่น

Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. In: Katzung BG, editor. Basic and clinical pharmacology. 6th ed. Norwalk, CN:Appleton and Lange; 1995. p. 361-80.

8.2.4 หนังสือที่เป็นชุด (series) ตัวอย่างเช่น

Bennett GL, Horuk R. Iodination of chemokines for use in receptor binding analysis. In:Horuk R, editor. Chemokine receptors. New York: Academic Press; 1997. p. 134-48. (Methods in enzymology; vol 288).

หมายเหตุ : Chemokine receptors = ชื่อหนังสือ
Methods in enzymology = ชื่อหัวข้อเรื่อง
ของ series

8.2.5 หนังสือ proceeding ของการประชุม ตัวอย่างเช่น

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

8.2.6 เอกสารหรือแหล่งข้อมูลอื่น

เรื่องจาก หนังสือพิมพ์ ตัวอย่างเช่น

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution : study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A: 3 (col.5).

เรื่องจากวารสารใน internet ตัวอย่างเช่น

Laporte RE, Marler E, Akazawa S, Sauer F. The death of biomedical journals. BMJ [serial online]. 1995;310:1387-90. Available from: <http://www.bmj.com/bmj/archive/6991ed2.htm>. Accessed September 26, 1996.

เรื่องจาก web site ตัวอย่างเช่น

Health on the net foundation. Health on the net foundation code of conduct (HONcode) for medical and health web sites. Available at: <http://www.hon.ch/conduct.html>. Accessed June 30, 1998.

หนังสือแจ้งความจำนงลงโฆษณา ในวารสารโรคมะเร็ง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เรียน ผู้จัดการวารสารมะเร็ง

ข้าพเจ้า.....ตำแหน่ง.....

ในนามของ.....เลขที่.....ถนน.....

ตำบล/แขวง.....อำเภอ/เขต.....จังหวัด.....

รหัสไปรษณีย์.....โทรศัพท์.....โทรสาร.....

มีความประสงค์ลงโฆษณาในวารสารโรคมะเร็ง

- | | | |
|------------------------------------|-------------------------|------------|
| ☐ ฉบับที่ 1 | เดือน มกราคม - มีนาคม | ปีที่..... |
| ☐ ฉบับที่ 2 | เดือน เมษายน - มิถุนายน | ปีที่..... |
| ☐ ฉบับที่ 3 | เดือน กรกฎาคม - กันยายน | ปีที่..... |
| ☐ ฉบับที่ 4 | เดือน ตุลาคม - ธันวาคม | ปีที่..... |

รวม.....ฉบับ

โดยลงโฆษณาในลักษณะ

- | | |
|--|--|
| ☐ พิมพ์เนื้อใน 1/2 หน้า | อัตรา 5,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| ☐ พิมพ์เนื้อในเต็มหน้า | อัตรา 10,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| ☐ พิมพ์ปกหลังด้านใน 1/2 หน้า | อัตรา 10,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| ☐ พิมพ์ปกหลังด้านในเต็มหน้า | อัตรา 20,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| ☐ พิมพ์ปกหลังด้านนอกเต็มหน้า | อัตรา 35,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| ☐ โบแทรก | อัตรา 6,000 บาท ต่อ ฉบับ (1,000 เล่ม) |
| ☐ พิมพ์สี ถ่ายค่าเพลทและค่าพิมพ์เพิ่ม | 10,000 บาท |

รวมเป็นเงินทั้งสิ้นจำนวน.....บาท

ตัวอักษร (.....) บาท

ลงนาม.....ผู้ลงโฆษณา

(.....)

หมายเหตุ ถ้าลงโฆษณาทั้งปี (4 ฉบับ) จะลดค่าโฆษณาให้ 10 %

ส่งอาร์ตเวิร์ค / ข้อความโฆษณาทาง E-mail : thaicancerj@gmail.com

การชำระค่าโฆษณา ให้เขียนเช็คสั่งจ่ายในนาม "มูลนิธิวิจัยโรคมะเร็งเพื่อสถาบันมะเร็งแห่งชาติ"



วารสารโรคมะเร็ง

กองบรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

ใบสมัครสมาชิก/ใบต่ออายุสมาชิก

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

เรียน ผู้จัดการวารสารโรคมะเร็ง

ข้าพเจ้า.....

ในนาม ส่วนราชการ/บริษัท/ส่วนตัว.....

ที่อยู่เลขที่.....ตรอก/ซอย.....แขวง.....

เขต.....จังหวัด.....รหัสไปรษณีย์.....

โทรศัพท์.....โทรสาร.....

E-mail.....

มีความประสงค์สมัครสมาชิกในวารสารโรคมะเร็ง

☐ ปีที่ 37 ฉบับที่ 1-4 (พ.ศ. 2560) รวม 4 ฉบับ เป็นเงิน 200 บาท

☐ ปีที่ 38 ฉบับที่ 1-4 (พ.ศ. 2561) รวม 4 ฉบับ เป็นเงิน 200 บาท

พร้อมกันนี้ได้จัดส่งเงินจำนวนบาท (.....) ตัวอักษร

โดยโอนเงินผ่านบัญชีออมทรัพย์ ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) สาขารามาริบดี

เลขที่บัญชี 026-228501-4 ชื่อบัญชี เงินสำรองจ่ายของมูลนิธิวิจัยโรคมะเร็ง

ขอแสดงความนับถือ

ลงนาม.....

(.....)

หมายเหตุ: โปรดส่งสำเนาการโอนเงินผ่านธนาคารพร้อมใบสมัครสมาชิกมายังโทรสาร 02-644-9097

หรือส่งเอกสารทางไปรษณีย์โดยนำส่ง กองบรรณาธิการวารสารโรคมะเร็ง กลุ่มงานสนับสนุนวิชาการ

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ 268/1 ถนนพระราม 6

เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400