

12. วัตถุประสงค์ของโครงการในปีงบประมาณ 2553

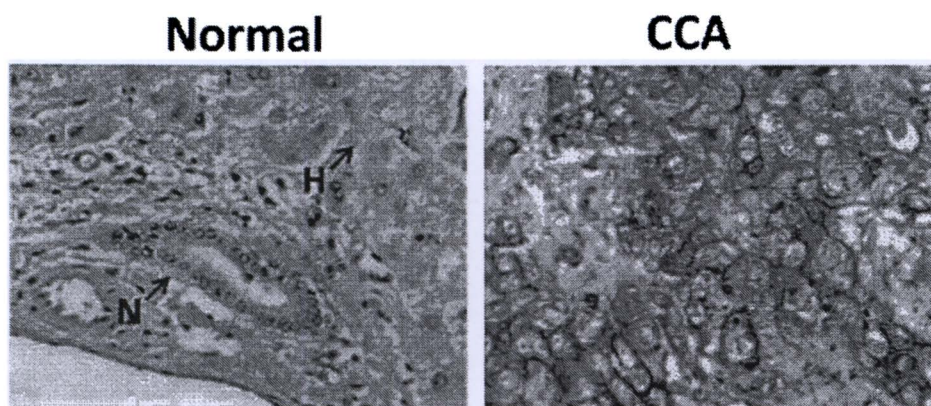
ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพต่าง ๆ ของแอนติเจนที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่สกัดได้ดังนี้

- ศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
- พัฒนาการตรวจวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีจากซีรัมผู้ป่วยโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ด้วยวิธี ELISA

13. วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

13.1 การศึกษาการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ที่ผลิตได้ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ทำการคัดเลือกเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 45 รายที่มีผลทางพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อแล้วว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีจากฐานข้อมูลชีวภาพของศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมโดยการปรับความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 และ second antibody รวมทั้งระบบบัฟเฟอร์และระบบการ retrieve antigen เพื่อให้ได้ภาวะที่ดีที่สุดในการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดี ก่อนทำการศึกษาในชิ้นเนื้อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป ซึ่งจากการย้อมชิ้นเนื้อผู้ป่วยจำนวน 45 รายพบ การแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 สูงในเยื่อบุท่อนทางเดินน้ำดีที่เป็นมะเร็ง แต่ไม่พบหรือพบน้อยมากที่ท่อนทางเดินน้ำดีปกติและเซลล์ตับ ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งจะพบการแสดงออกของแอนติเจนจำเพาะสูงในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเกือบทุกราย คิดเป็นร้อยละ 93 (42 ใน 45 ราย) แสดงถึงความจำเพาะและความสำคัญของแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ในการเป็นตัวบ่งชี้มะเร็งท่อน้ำดี



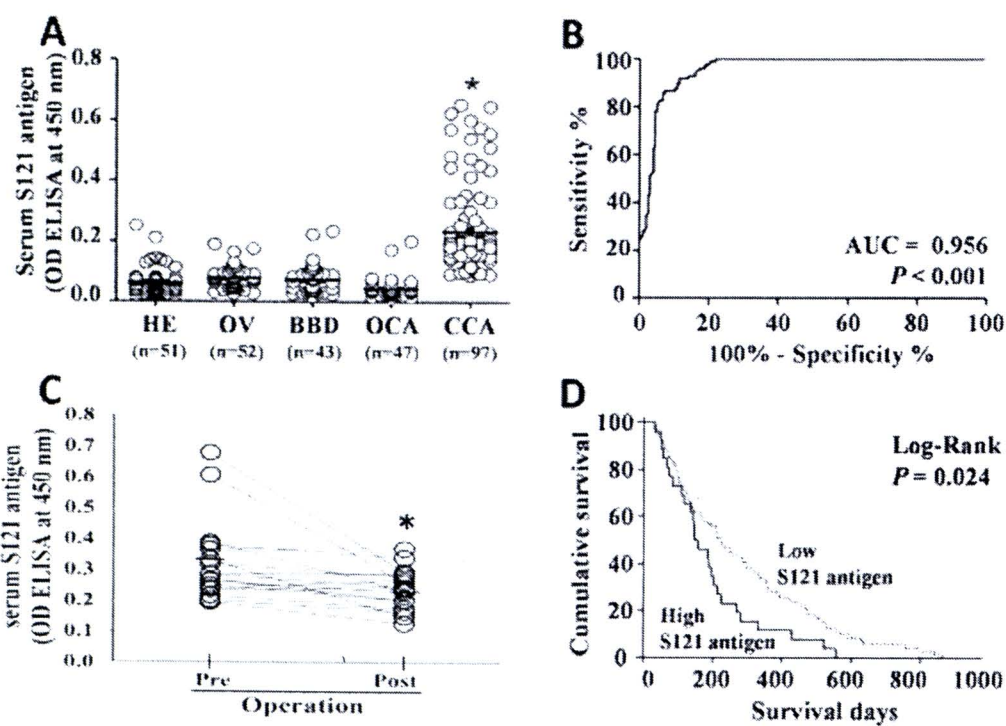
รูปที่ 1 แสดงการย้อมชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีด้วย โมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ที่ผลิตได้ ไม่พบการติดสีใน bile duct epithelial cells ที่ปกติ (N) และเซลล์ตับ (H) (ซ้าย) โดยที่พบการติดสีของ โมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 เฉพาะที่เยื่อบุท่อนทางเดินน้ำดี (bile duct epithelial cells) ที่เป็นมะเร็ง (ขวา) แสดงความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเซลล์ท่อน้ำดีที่เป็นมะเร็ง

13.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของตัวตรวจวัดโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ที่ผลิตในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี และศึกษาความสัมพันธ์กับผลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อและระยะโรคตับ

ได้ทำการตรวจหาระดับ S121 ในซีรัม ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 96 ราย และกลุ่มควบคุม 192 ราย ได้แก่ ผู้ป่วยโรคระบบท่อน้ำดี 42 ราย ผู้ป่วยมะเร็งในระบบท่อนทางเดินอาหาร 47 ราย คนที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 52 ราย และคนปกติ 51 ราย โดยพบว่าปริมาณ S121 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (ค่าเฉลี่ย OD 450 nm = 0.234) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ค่าเฉลี่ย OD 450 nm = 0.087) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$; Mann-Whitney U test) ดังแสดงในรูป

2A และเพื่อคำนวณระดับแอนติเจนจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ในซีรัมที่สามารถแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจากกลุ่มควบคุมต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น ได้คำนวณหาค่าจุดตัดค่าดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (cut off OD at 450 nm) โดยใช้สถิติ Receiver Operating Characteristics (ROC) curve ดังแสดงในรูป 2B โดยได้ผลว่าระดับ S121 ในซีรัม ณ จุดตัดค่าดูกลืนแสง เท่ากับ 0.110 สามารถนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีได้อย่างเหมาะสม โดย ให้ความไว (sensitivity) ร้อยละ 87.63 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 89.58 ค่าการทำนายผลบวก (positive predictive value; PPV) ร้อยละ 80.95 และการทำนายผลลบ (negative predictive value; NPV) ร้อยละ 83.47

นอกจากนี้ ยังได้เปรียบเทียบปริมาณ S121 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีก่อนและหลังการผ่าตัดจำนวน 17 ราย พบว่า S121 ในซีรัมผู้ป่วยมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$, pair T-test) ดังแสดงในรูป 2C และเมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 97 ราย โดยการแบ่งผู้ป่วยตามค่าเฉลี่ย OD 450 nm ที่ 0.234 ออกเป็นผู้ป่วยที่มีระดับ S121 สูงจำนวน 25 ราย และ กลุ่มที่มีระดับ S121 ต่ำจำนวน 72 ราย พบว่า ผู้ป่วยที่มีระดับ S121 ในซีรัมสูงจะมีอัตราการรอดชีพต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีระดับ S121 ในซีรัมต่ำอย่างมีนัยสำคัญ ($P = 0.024$, Log-Rank) ดังแสดงในรูปที่ 2D



รูปที่ 2 A) แสดงระดับ S121 ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 97 ราย มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$; Mann-Whitney U test) B) การวิเคราะห์ด้วย ROC analysis พบว่าระดับ S121 ในซีรัมสามารถแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีออกจากกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) โดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (are under curve; AUC) เท่ากับ 0.956 C) S121 ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีหลังการผ่าตัด (OD 450 = 0.239 ± 0.065) จะมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$, pair T-test) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการผ่าตัด (OD 450 = 0.324 ± 0.134) D) เมื่อแยกผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีตามค่าเฉลี่ยของปริมาณ S121 ในซีรัมผู้ป่วย พบว่าผู้ป่วยที่มีระดับของ S121 ในซีรัมสูง (OD 450 nm > 0.234) มีอัตราการรอดชีพที่ต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีระดับของ S121 ในซีรัมต่ำ (OD 450 nm ≤ 0.234)

ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ S121 ในซีรัม กับข้อมูล clinical data ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าระดับ S121 ในซีรัมของผู้ป่วยไม่มีความสัมพันธ์กับ อายุ เพศ พยาธิวิทยาชิ้นเนื้อ (histopathology) และ ระยะของมะเร็ง (tumor stage) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 1 Correlation of serum S121 and clinical data of CCA patients

Variable	No. of patients	Serum S121		P
		Low	High	
		(OD ≤ 0.234)	(OD > 0.234)	
Age				
≤ 56 years	45	34	11	0.781
> 56 years	52	38	14	
Gender				
Male	69	51	18	0.912
Female	28	21	7	
Histopathology				
PAP	22	16	6	0.855
Non-PAP	75	56	19	
Tumor stage				
I-III	14	12	2	0.464
IVA and IVB	83	60	23	

เนื่องจากระดับ S121 ในซีรัมมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จึงทำการวิเคราะห์ความเป็นอิสระในการทำนายโรค (independent prognostic factor) ของระดับ S121 ในซีรัม เปรียบเทียบกับข้อมูล clinical data อื่นๆ ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ อายุ เพศ พยาธิวิทยาชิ้นเนื้อ (histopathology) และ ระยะของมะเร็ง (tumor stage) โดย Multivairate analysis (Cox Regression) โดยพบว่าระดับ S121 ในซีรัมของผู้ป่วยมีคุณสมบัติเป็น independent prognostic factor ไม่มีความสัมพันธ์กับ ได้แก่ อายุ เพศ histopathology และ tumor stage ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ดังแสดงในตารางที่ 5

ทั้งนี้ คุณค่าของโมโนโคลนอลแอนติบอดี S121 ในการประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวัดระดับสารบ่งชี้มะเร็งในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีประโยชน์ทั้งในการวินิจฉัยและการทำนายโรค ได้รับการตีพิมพ์ ลงในวารสาร Cancer (IF 2009 = 5.416) เมื่อปี 2554 ดังเอกสารแนบท้าย¹⁷