



รายงานการวิจัย

การแสดงออกของ cancer stem cell CD44

ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร

(Expression of cancer stem cell CD44

in gastric cancer patients)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



การแสดงออกของ cancer stem cell CD44 ในผู้ป่วยมะเร็ง

กระเพาะอาหาร

(Expression of cancer stem cell CD44 in gastric cancer patients)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ทวีศักดิ์ ทองทวี

สาขาวิชาศัลยศาสตร์

สำนักวิชาแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร.วรีพร วัฒนาวงศ์ดอน

ดร.ธีรยา สีมาวรานนท์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

20 กันยายน 2563

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

รายงานนี้เป็นผลการศึกษาของโครงการ ปี 2561 เรื่อง “การแสดงออกของ cancer stem cell CD44 ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารในประเทศไทย” ซึ่งในขณะนี้นักวิจัยได้เสร็จสมบูรณ์แล้ว คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2561 ที่ให้ทุนสนับสนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ ยังขอขอบคุณสำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย



ผศ. นพ. ทวีศักดิ์ ทองทวี

หัวหน้าโครงการ

20 กันยายน 2563

บทคัดย่อภาษาไทย

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CD44 และความแปรผันทางพันธุกรรมในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง ผู้ป่วย precancerous gastric lesions และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารและวิเคราะห์ผลการศึกษาที่ได้ต่อความเสี่ยงของการแสดงออกของโปรตีน CD44 และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 400 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังจำนวน 125 ราย ผู้ป่วย precancerous gastric lesions จำนวน 113 ราย และผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหารจำนวน 162 ราย จากโรงพยาบาลสามแห่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ผลการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยกลุ่ม precancerous gastric lesions และมะเร็งกระเพาะอาหารมีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน CD44 ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง ($p = 0.036$) และพบความสัมพันธ์ของผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ AG หรือ GG ของยีน CD44 rs187116 มีความเสี่ยงต่อการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน CD44 cancer stem cell มากกว่าในกลุ่มที่เป็น wild-type (AA) (AG: odds ratio (OR) = 5.67; 95% CI = 1.57–7.23; $p = 0.024$ และ GG: OR = 8.32; 95% CI = 2.94–11.42; $p = 0.016$) แต่ไม่พบว่าการแสดงออกของโปรตีน CD44 มีความสัมพันธ์กับความแปรผันทางพันธุกรรมในผู้ป่วย precancerous gastric lesions จากผลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีน CD44 สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการพยากรณ์การเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยกลุ่ม precancerous gastric lesions ที่มีจีโนไทป์ AG หรือ GG ควรจะเป็นกลุ่มที่ได้รับการเฝ้าระวังและติดตามการรักษาอย่างใกล้ชิดเพื่อป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารต่อไป

Abstract

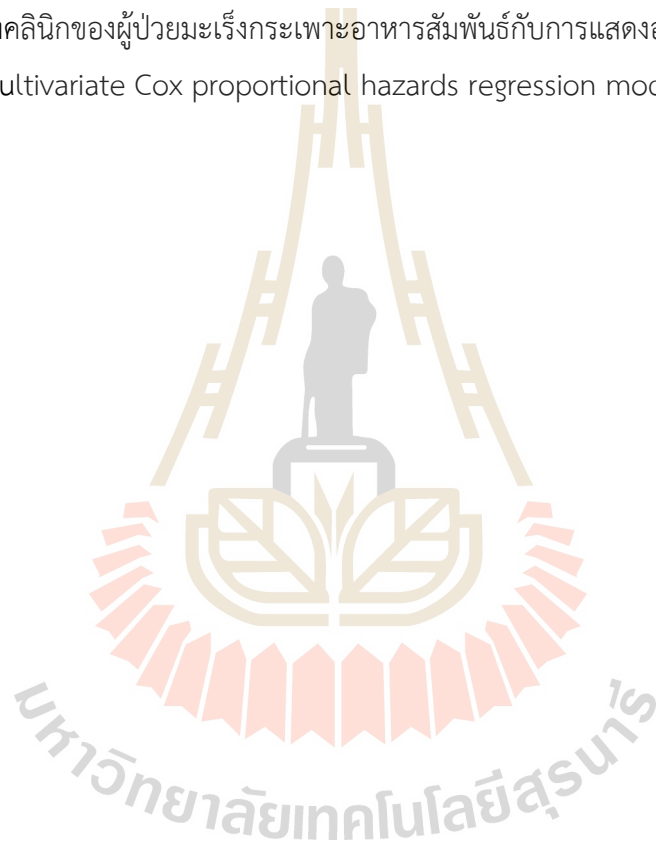
Here we investigated CD44 protein expression and its polymorphisms in patients with chronic gastritis, precancerous gastric lesions, and gastric cancer; and we evaluated our result with the risk of CD44 protein expression and clinicopathological characteristics. Our results obtained by analyzing 162 gastric cancer patients, 125 chronic gastritis, and 113 precancerous gastric lesions from three study centers in Thailand showed that CD44 expression was significantly higher in patients with precancerous gastric lesions and gastric cancer while patients with chronic gastritis were negative for CD44 staining ($p = 0.036$). We further observed the significant association of variant genotype; gastric cancer patients carrying AG or GG of CD44 rs187116 had more increased risk of CD44 expression than wild-type (WT) carriers (AG: odds ratio (OR) = 5.67; 95% CI = 1.57–7.23; $p = 0.024$ and GG: OR = 8.32; 95% CI = 2.94–11.42; $p = 0.016$), but no significant difference in the risk of CD44 expression due to polymorphism in patients with precancerous gastric lesions. Our results suggested that CD44 expression could be used as a marker for the prediction of gastric cancer development, particularly in patients with precancerous gastric lesions carrying AG or GG, who were selected to surveillance follow-up for gastric cancer prevention.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำสำคัญ.....	ช
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	8
การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วย	8
การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CD44 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย.....	8
การตรวจหาระดับการแสดงออกของ CD44 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย.....	9
การอ่านผลการทดลอง.....	9
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
ผลการวิจัย.....	11
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
สรุปผลการวิจัย.....	19
อภิปรายผล.....	19
ข้อเสนอแนะ.....	22
บรรณานุกรม.....	23
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	28
ประวัติผู้วิจัย.....	29

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคในระบบทางเดินอาหาร	14
ตารางที่ 2 การแสดงออกของโปรตีน CD44 และความแปรผันทางพันธุกรรมในผู้ป่วยโรค ระบบทางเดินอาหาร.....	15
ตารางที่ 3 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน CD44 (Univariate Cox regression model analysis).....	16
ตารางที่ 4 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน CD44 (Multivariate Cox proportional hazards regression model analysis).....	17



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน CD44 ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารด้วยเทคนิค immunohistochemistry ผลการย้อม CD44 ในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง (A) ผู้ป่วย precancerous gastric lesions (B) และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร (magnification, x200)..... 18

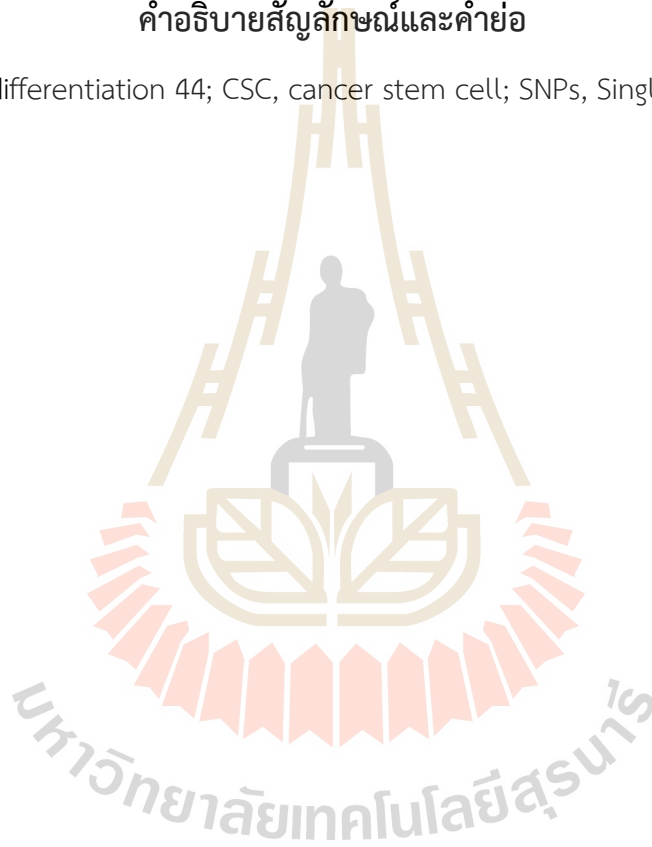


คำสำคัญ

กระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง, กระเพาะอาหารระยะ precancerous gastric lesions, มะเร็งกระเพาะอาหาร, CD44 polymorphism, cancer stem cell

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CD44, Cluster of differentiation 44; CSC, cancer stem cell; SNPs, Single nucleotide polymorphisms



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

CD44 มีการแสดงออกที่สูงในหลายกลุ่มของโรคมะเร็งในระบบทางเดินอาหาร และในมะเร็งกระเพาะอาหารพบว่าการแสดงออกของ CD44 เช่นกันโดยมีรายงานในหลายงานวิจัยทั่วโลกแต่ยังไม่พบว่ามีรายงานดังกล่าวในประเทศไทย มีรายงานจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ CD44 มีความสัมพันธ์ต่อกระบวนการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) ความรุนแรงและระยะของโรคในมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งยังสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยได้ ดังนั้นการเข้าใจถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าวกับมะเร็งกระเพาะอาหารจึงน่าจะเป็นประโยชน์ที่ทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ๆ และเป็นแนวทางสำหรับการตรวจรักษาในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร มีรายงานจำนวนมากพบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรม (gene polymorphism) มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็ง และพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CD44 ส่งผลต่อการกระบวนการเกิดมะเร็ง ความไวในการรักษา และอาการทางคลินิกของผู้ป่วยในมะเร็งหลายชนิดรวมถึงในมะเร็งกระเพาะอาหารด้วย ถึงแม้ว่าจะเคยมีการศึกษาถึงการแสดงออกของ CD44 ในมะเร็งกระเพาะอาหารมาแล้วก่อนหน้านี้ในทั่วโลกแต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า cancer stem cell ตัวใดเป็นตัวบ่งชี้ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่สามารถใช้ในการพยากรณ์การเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายังไม่มีข้อมูลการศึกษาหาความสัมพันธ์ของ CD44 ต่อการพัฒนาไปสู่การเกิดโรคมะเร็งในกลุ่มของผู้ป่วยที่เป็นระยะก่อนเป็นมะเร็ง (precancerous gastric lesions) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงที่จะพัฒนาเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารต่อไป จากที่กล่าวมาข้างต้นคณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่าการแสดงออกของโปรตีน CD44 อาจจะมีผลต่อการพัฒนาการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารและความหลากหลายทางพันธุกรรม ในยีน CD44 อาจจะมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวและอาจจะมีผลต่อการพัฒนาการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CD44 และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนดังกล่าวในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอีกเสบเรื้อรัง ผู้ป่วย precancerous gastric lesions และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร

1.2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีน CD44 ต่อข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย เช่น ตำแหน่งของมะเร็ง ขนาดของมะเร็ง ชนิดของมะเร็ง การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง การแพร่กระจายในหลอดเลือด ระยะของโรคมะเร็ง (T stage และ TNM stage) มะเร็งที่หลงเหลืออยู่ ค่า CEA และ 5-year survival

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

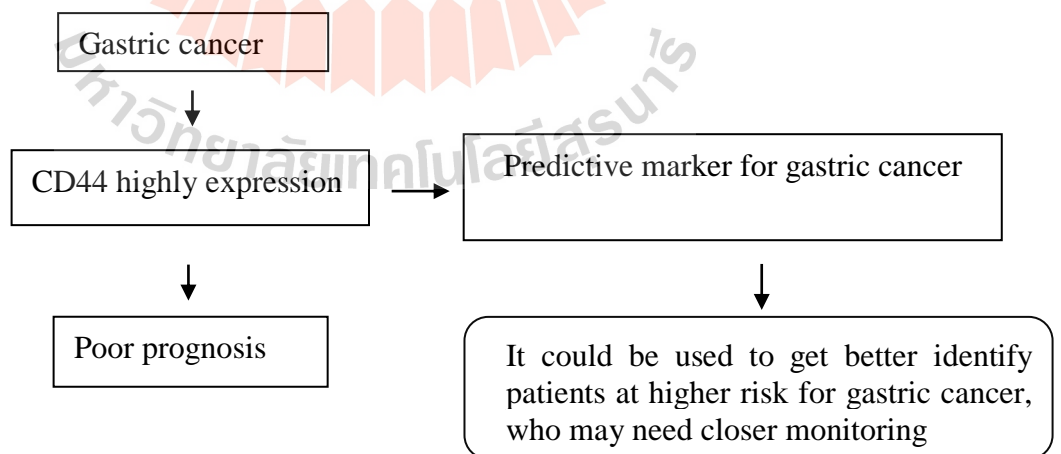
การศึกษาครั้งนี้จะแบ่งเป็นสองส่วนคือ

ส่วนที่ 1 เป็นการตรวจหาการแสดงออกของความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีน CD44 โดยใช้วิธี predesigned Custom TagMan SNP Genotyping โดย real-time PCR ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่เป็นกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง จำนวน 125 ราย ผู้ป่วย precancerous gastric lesions จำนวน 113 ราย และมะเร็งกระเพาะอาหารจำนวน 162 ราย และศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกทางพันธุกรรมของยีนดังกล่าวกับข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย

ส่วนที่ 2 เป็นการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน CD44 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่เป็นกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง จำนวน 125 ราย ผู้ป่วย precancerous gastric lesions จำนวน 113 ราย และมะเร็งกระเพาะอาหารจำนวน 162 ราย โดยวิธี immunohistochemistry

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เซลล์ต้นกำเนิดมะเร็ง (cancer stem cell) เป็นสาเหตุหนึ่งของความล้มเหลวในการรักษาโรคมะเร็ง โดยพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งจะทำให้มะเร็งเกิดความรุนแรงและต้องการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด CD44 เป็นเซลล์ต้นกำเนิดมะเร็งตัวหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญดังกล่าวข้างต้น โดยพบว่าในมะเร็งหลายชนิดมีการเพิ่มการแสดงออกของ CD44 มากขึ้นและมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคในผู้ป่วย ดังนั้นการเข้าใจถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของเซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าวกับมะเร็งกระเพาะอาหารจึงน่าจะเป็นประโยชน์ที่ทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ๆ และเป็นแนวทางสำหรับการตรวจรักษาในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารต่อไป



1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ทราบถึงการแสดงออกของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน CD44 ในผู้ป่วยโรคในระบบทางเดินอาหาร
- 1.5.2 ทราบถึงยีนที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ในการตรวจผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร
- 1.5.3 ทราบถึงความสัมพันธ์ของความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน CD44 และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย
- 1.5.4 ทราบถึงระดับการแสดงออกของโปรตีน CD44 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย
- 1.5.5 เผยแพร่ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งกระเพาะอาหารเป็นหนึ่งในห้าของโรคมะเร็งที่พบมากที่สุดในโลกและเป็นสาเหตุอันดับสามของการเสียชีวิตที่เกิดจากโรคมะเร็งทั่วโลก (Torre L.A., 2012) ในประเทศไทยพบโรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้บ่อยเช่นเดียวกันโดยมีอุบัติการณ์อยู่ที่ 5-7 คนต่อจำนวนประชากร 100,00 คนจากสถิติของกระทรวงสาธารณสุข พบว่า มะเร็งกระเพาะอาหารพบมากในช่วงอายุ 60-70 ปีขึ้นไปโดยพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง (Wroblewski L.E., 2010) เป็นที่ทราบกันว่า การติดเชื้อ *H. pylori* เป็นปัจจัยสำคัญของสาเหตุการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหารโดยส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในกระเพาะอาหารตั้งแต่ การอักเสบเรื้อรัง กระเพาะอาหารอักเสบที่เกิด atrophic กระเพาะอาหารอักเสบที่เกิด metaplasia กระเพาะอาหารอักเสบที่เกิด dysplasia จนกระทั่งการพัฒนาไปสู่มะเร็งกระเพาะอาหาร (Kusters J.G., 2006) ปัจจัยอื่นๆ ที่อาจส่งผลต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร เช่น การรับประทานอาหารที่มีเกลือสูง การรับประทานผักผลไม้ไม่พอ การสูบบุหรี่ และการมีประวัติของคนในครอบครัวที่เป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร อาจจะเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลง genetic และ epigenetic ก็ส่งผลต่อกระบวนการพัฒนาและแพร่กระจายของมะเร็งกระเพาะอาหารด้วยเช่นกัน (Talmadge J.E., 2010) มะเร็งกระเพาะอาหารมีอัตราการเสียชีวิตสูงและมีพยากรณ์โรคไม่ดีเนื่องจากยังไม่มีวิธีที่มีประสิทธิภาพดีพอที่สามารถตรวจพบได้เร็วและคนไข้ทั้งหมดมักถูกตรวจพบมะเร็งหลังจากระยะแพร่กระจายแล้ว มีการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าการที่แพทย์สามารถวินิจฉัยผู้ป่วยได้ตั้งแต่ระยะแรกของโรคจะสามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดในผู้ป่วยได้ดีขึ้น (Hohenberger P., 2003) ดังนั้นการหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารได้ตั้งแต่ในระยะแรกของโรคหรือใช้ในการพยากรณ์ความเสี่ยง

ของผู้ป่วยในการพัฒนาจนกระทั่งเกิดมะเร็งโดยเฉพาะผู้ป่วยในกลุ่ม precancerous gastric lesions จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดในผู้ป่วยมะเร็งดังกล่าวได้

Cancer stem cells (CSCs) ถูกพบว่า มีความสำคัญในการพัฒนา การเพิ่มจำนวน และการแพร่กระจายของมะเร็งซึ่งมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้เองอย่างไม่มีขีดจำกัด (Sampieri K., 2012) มีรายงานพบว่า CSCs เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดมะเร็งในมะเร็งหลายชนิด (Clarke M.F., 2006) และยังพบว่าสามารถตรวจพบ CSCs ได้ในระยะแรกๆ ก่อนที่ผู้ป่วยจะแสดงอาการของโรคและมีรายงานจำนวนมากที่รายงานว่า CSCs มีบทบาทสำคัญตั้งแต่กระบวนการเริ่มต้นของการเกิดมะเร็ง (Takaishi S., 2008; Takaishi S., 2009; Tan D., 2003; Saikawa Y., 2010)

Cluster of differentiation 44 (CD44) เป็นไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการของเซลล์ รวมถึงการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ การเกาะของเซลล์ การเคลื่อนที่และการอยู่รอดของเซลล์ โดยผ่านการจับกับ hyaluronic acid (HA) (Yong C. S., 2012) โดยการจับดังกล่าวจะส่งผลให้มีการตอบสนองของ cellular signaling และการควบคุมกระบวนการต่างๆ ของกลไกทางชีวภาพภายในเซลล์ มีการรายงานการศึกษาว่า CD44 สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิด (Collins A. T., 2005; Dalerba P., 2007; Park S. Y., 2010) รวมถึงยังมีรายงานว่าสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการพยากรณ์การเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (Ghaffarzadehgan K., 2008; Cao L., 2014; Wang W., 2014) Takaishi และคณะได้ทำการศึกษาบทบาทของ CD44 ในเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารหลายชนิด ได้แก่ NCI-N87, AGS, MKN-28, MKN-45 และ MKN-74 จากการศึกษาพบว่า CD44 สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการพยากรณ์โรคในมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (Takaishi S., 2009) Heider และคณะ (Heider K. H., 1993) พบว่า CD44 ถูกตรวจพบในมะเร็งกระเพาะอาหารและเกี่ยวข้องกับลักษณะทางพยาธิวิทยาและอาการของโรคมะเร็ง ต่อมา Dammrich และคณะ (Dammrich J., 1995) พบว่า CD44 (v6 isomer) มีการแสดงออกใน

กระเพาะอาหารอักเสบแบบ atrophic และ intestinal metaplasia ดังนั้น CD44 จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพสำหรับเซลล์มะเร็งในระยะเริ่มแรกของการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร และต่อมาจึงมีการศึกษาถึงการแสดงออกของ CD44 ในมะเร็งกระเพาะอาหารอย่างกว้างขวางทั่วโลก จากความรู้ดังกล่าวจึงเป็นเหตุผลในการสนับสนุนความคิดที่ว่าเราสามารถใช่ CD44 เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ช่วยเพิ่มความถูกต้องในการวินิจฉัยโรคในโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร

ทฤษฎีหนึ่งที่สามารถอธิบายถึงการรักษาที่ไม่เป็นผลคือ ทฤษฎี CSCs ซึ่งทฤษฎีนี้กล่าวว่ามะเร็งอาจจะมีจุดกำเนิดและเกิดอยู่ในสัดส่วนที่น้อยของ stem-like cells ซึ่งแสดงถึงโอกาสการเจริญเป็นมะเร็งโดยการเพิ่มจำนวนตัวเองขึ้นมาใหม่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การบุกรุกและการแพร่กระจาย และยังเป็นผลให้มีการต่อต้านการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดและรังสีรักษาอีกด้วย (Reya T., 2001; Phillips T. M., 2006) มีการศึกษาหลายๆ การศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าการพัฒนาของมะเร็งกระเพาะอาหารมีความเกี่ยวข้องกับ gastric CSCs (GCSCs) (Chen T., 2012; Xu G., 2013) และก่อนหน้านี้มีความพยายามในการหาตัวบ่งชี้ชีวภาพ สำหรับเซลล์เริ่มต้นของกระเพาะอาหารและพบว่า gastric stem cells น่าจะเป็น CSCs ตัวหนึ่งที่เหมาะสมในการใช้ศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเกี่ยวกับมะเร็งกระเพาะอาหาร ทั้งการดำเนินโรคและการกลับมาเป็นซ้ำ และทำให้เกิดการรักษาใหม่ๆ และเป็นไปได้ที่เซลล์กระเพาะอาหาร และเซลล์ลำไส้เล็กได้มีการแทนที่ของ epithelial cells โดย stem cells และ progenitor cells ที่ทำหน้าที่สำคัญ ในการสร้าง gastric glands ขึ้นมาใหม่ และซ่อมแซม epithelial cell ที่มีการบาดเจ็บของเซลล์ gastric epithelial cells เกิดการเปลี่ยนจากเซลล์ที่มีการบาดเจ็บหรือเซลล์ที่ตายเพื่อรักษาสมดุลของมันไว้ ซึ่งภายใต้สภาวะร่างกายปกติเซลล์เยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารจะสร้างใหม่ทุกๆ 2-7 วัน และเมื่อมีการบาดเจ็บเซลล์เหล่านี้จะสร้างขึ้นมาใหม่อย่างรวดเร็วโดยมี stem cells ทำหน้าที่หลัก (Qiao X. T., 2011; Mayer B., 1993)

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) เป็นการแปรผันของลำดับ DNA ชนิดที่พบมากที่สุด ซึ่งมีผลทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (gene polymorphism) จากการศึกษาที่ผ่านมา

พบว่า การเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CD44 มีผลต่อการรักษาและการพยากรณ์โรคใน มะเร็งหลายชนิด เช่น พบว่า การเกิด SNPs ของ CD44 และการเพิ่มการแสดงออกของ CD44 มีผลต่อ การพัฒนาและการพยากรณ์โรคในโรคมะเร็งเต้านม (Zhou J., 2010; . Jiang L., 2012) มี นักวิทยาศาสตร์จำนวนมากที่พยายามทำการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CD44 โดย หนึ่งในนั้นคือ rs187116 A>G polymorphism โดยพบอยู่บน intron ที่ 1 ของยีน CD44 (Cao L., 2014; Suga T., 2007) โดย rs187116 A>G polymorphism เป็น polymorphism ตัวหนึ่งที่มี การศึกษากันอย่างแพร่หลายและยังพบว่า CD44 rs187116 genotype สามารถใช้ในการวินิจฉัยและ พยากรณ์อาการทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารได้ และยังมีรายงานพบว่ามี การแสดงออกที่ เพิ่มขึ้นอย่างผิดปกติของ CD44 isoforms ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งที่ย้อมด้วยวิธี Immunohistochemistry นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการแสดงออกของ CD44 isoforms มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโรคในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร (Heider K. H., 1993), มะเร็งตับ (Endo K., 2000), มะเร็งเต้านม (Joensuu H., 1993), มะเร็งปากมดลูก (Kainz C., 1995), มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Wielenga V. J., 1993) เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วย

ผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ที่มีความจำเป็นที่ต้องได้รับการตรวจวินิจฉัยด้วยการส่องกล้องทางเดินอาหารตามมาตรฐานของวิชาชีพในเขตพื้นที่รอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โรงพยาบาลสุรินทร์ และโรงพยาบาลบุรีรัมย์จะได้รับการตรวจด้วยการส่องกล้องทางเดินอาหารส่วนบนหรือ “Esophagogastroduodeno scopy” เพื่อทำการวินิจฉัยและเก็บชิ้นเนื้อในกระเพาะอาหาร ผู้ป่วยที่เป็นโรคระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง ผู้ป่วย precancerous gastric lesions และมะเร็งกระเพาะอาหารจำนวน 400 ราย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 จนถึงเดือนกันยายน 2562 โดยมี ข้อบ่งชี้ในการคัดผู้ร่วมวิจัยออกหรือ Exclusion criteria ดังนี้คือ อายุต่ำกว่า 18 ปีหรือมากกว่า 70 มีโรคประจำตัวรุนแรงจนไม่สามารถทำการส่องกล้องได้ ตั้งครรภ์หรืออยู่ระหว่างการให้นมบุตร โดยชิ้นเนื้อที่เก็บมาจากกระเพาะอาหารนั้น เก็บมาตามมาตรฐาน 5 ตำแหน่ง 8 ชิ้น ตาม “updated Sydney classification” การวินิจฉัยลักษณะชิ้นเนื้อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ จะส่งไปตรวจยืนยันผลที่บริษัท N Health ภายนอกมหาวิทยาลัย โดยพยาธิแพทย์ 5 คน

การตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ CD44 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย

สกัด DNA จากชิ้นเนื้อผู้ป่วย (fresh frozen tissue) โดยใช้ชุดสกัด QiAamp DNA mini kit โดยปฏิบัติตามคำแนะนำที่มากับชุดน้ำยา ซึ่ง DNA ที่สกัดได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 ng/ μ l จากนั้นทำการตรวจวัดการแสดงออกของความแปรผันของยีน CD44 rs187116 โดยใช้ predesigned Custom TagMan SNP Genotyping Assay โดยวิธี real-time PCR ขั้นตอนในการตรวจวัดจะใช้ PCR condition คือ 95 °C นาน 10 นาที, 55 cycles สำหรับอุณหภูมิ 95 °C นาน 15 วินาที และ 60 °C นาน 1 นาที และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม LightCycler® 480 Software 1.5.

ส่วนที่ 2

การตรวจหาระดับการแสดงออกของโปรตีน CD44 ในชิ้นเนื้อผู้ป่วย

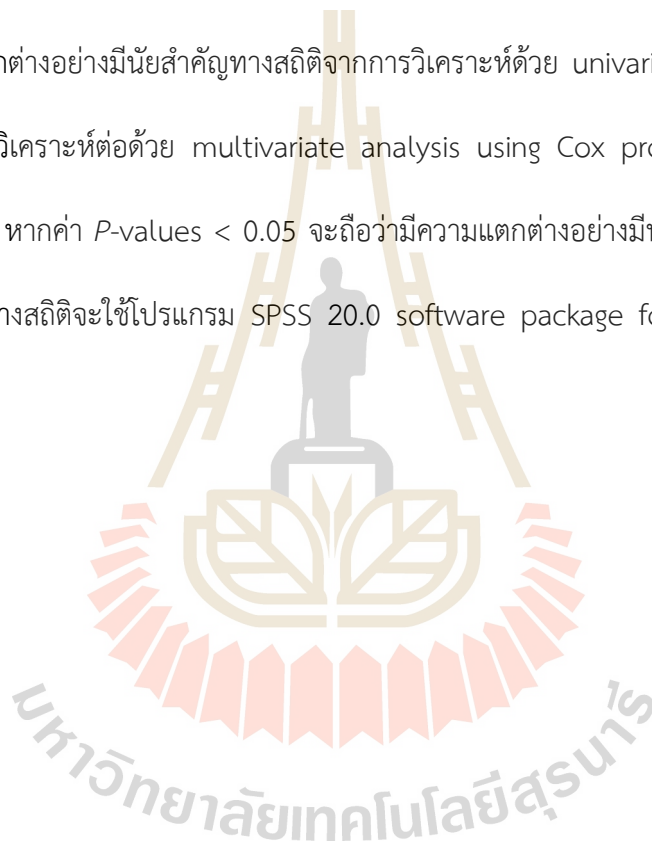
การแสดงออกของโปรตีน CD44 ใน Formalin-fixed paraffin-embedded sections จะถูกตรวจสอบโดยใช้เทคนิค immunohistochemistry โดยชิ้นเนื้อจะถูก deparaffinized ด้วย xylene และดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อ (rehydrate) ด้วย alcohol ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นทำการ retrieve แอนติเจนโดยนำสไลด์เนื้อเยื่อไปเติมสารละลาย 0.1 M citrate buffer (pH 6) และนำไปอบด้วยเตาไมโครเวฟที่ตั้งกำลังไฟไว้ที่ 720 w เป็นเวลา 10 นาที และกำจัด endogenous peroxidase โดยเติม 3% H₂O₂ เป็นระยะเวลา 5 นาที และ incubate ด้วย แอนติบอดีต่อ CD44 ที่อุณหภูมิ 4 °C ระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้น incubate ด้วย secondary antibodies เป็นระยะเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และ incubate สไลด์เนื้อเยื่อเข้ากับ ABC HRP-conjugated avidinbiotin-complex (Thermo Fisher, Illinois, USA) เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบหาสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วย aminoethyl carbazole substrate solution (Life technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) และย้อมสีทับอีกครั้งด้วย Mayer's hematoxylin

การอ่านผลการทดลอง

การประเมินผลการแสดงออกของโปรตีน CD44 โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry จะถูกประเมินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic interpretation) โดยผู้เชี่ยวชาญทางพยาธิวิทยา จำนวน 5 คน ที่ไม่ทราบข้อมูลของผู้ป่วยมาก่อน การประเมินการติดสีของ CD44 จะให้ออกมาเป็นค่าคะแนน โดยเทียบเซลล์ที่ย้อมติด CD44 ออกมาเป็นร้อยละ คือ negative: ไม่มีการย้อมติด CD44, 1+: ย้อมติด CD44 1-10%, 2+: ย้อมติด CD44 มากกว่า 10%-50%, 3+: เมื่อมีการย้อมติด CD44 มากกว่า 50% โดยสไลด์เนื้อเยื่อที่มีการย้อมติด CD44 ด้วยค่าคะแนน 1+, 2+ และ 3+ จะอ่านผลเป็นการแสดงออก (positive) ของโปรตีน CD44 ในขณะที่ในรายที่มีค่าคะแนน 0 จะอ่านผลเป็นไม่มีการแสดงออก (negative) ของโปรตีน CD44

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลทางคลินิกระหว่างกลุ่มผู้ป่วยด้วย ANOVA หาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน CD44 และการแสดงออกของโปรตีน CD44 โดยเทคนิค immunohistochemistry รวมถึงข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโดยใช้ Chi-squared test และ Fisher's exact test two-tailed ในการวิเคราะห์ สำหรับการประเมินหา prognostic index คณะผู้วิจัยใช้ univariate Cox regression model ในการวิเคราะห์ก่อนเป็นลำดับแรก จากนั้นข้อมูลของปัจจัยที่ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์ด้วย univariate Cox regression model จะถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วย multivariate analysis using Cox proportional hazards regression model หากค่า P -values < 0.05 จะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจะใช้โปรแกรม SPSS 20.0 software package for Windows (SPSS, Chicago, IL)



บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย

จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยจำนวนทั้งหมด 400 ราย แบ่งออกเป็นผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารเรื้อรัง (chronic gastritis) จำนวน 125 ราย (35.5% เป็นเพศชาย และ 64.5% เป็นเพศหญิง) โรคกระเพาะอาหารระยะ precancerous gastric lesions จำนวน 113 ราย (39.3% เป็นเพศชาย และ 60.7% เป็นเพศหญิง) และผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) จำนวน 162 คน (72.5% เป็นเพศชาย และ 27.5% เป็นเพศหญิง) โดยค่าเฉลี่ยอายุของผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารเรื้อรัง โรคกระเพาะอาหารระยะ precancerous gastric lesions และโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร เท่ากับ 55.03 ± 12.92 , 54.32 ± 15.83 และ 61.38 ± 12.39 ปี ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเปรียบเทียบเพศ อายุ หรือ underlying conditions ระหว่างกลุ่มที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังและโรคกระเพาะอาหารระยะ precancerous gastric lesions ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 1

4.2 รูปแบบการแสดงออกของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน CD44 ของผู้ป่วยในระบบทางเดินอาหาร

จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยกลุ่ม precancerous gastric lesions พบการแสดงออกของ genotype AA, AG และ GG เท่ากับ 17.9%, 39.9% และ 42.8% ตามลำดับ ในขณะที่ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารมีการแสดงออกของ genotype ดังกล่าวเท่ากับ 2.5%, 42.5% และ 55% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ genotype AA, AG และ GG ในระหว่างผู้ป่วยกลุ่มกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง ผู้ป่วย precancerous gastric lesions และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร พบว่า genotype AA มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ variant AG และ GG ไม่พบความแตกต่างในระหว่างผู้ป่วยทั้งสามกลุ่มดังแสดงในตารางที่ 1

4.3 การแสดงออกของโปรตีน CD44 ของผู้ป่วยโรคในระบบทางเดินอาหาร

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CD44 โดยใช้วิธี immunohistochemistry ที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง ระยะ precancerous gastric lesions และมะเร็งกระเพาะอาหาร จำนวน 400 ราย พบว่า CD44 จะย้อมติดในส่วนของ membrane และ cytoplasm ของเซลล์กระเพาะอาหาร (รูปที่ 1) การแสดงออกของโปรตีน CD44 ในผู้ป่วย precancerous gastric lesions เท่ากับ 21.4% และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารเท่ากับ 65% ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของโปรตีน CD44 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยทั้งสามกลุ่ม ($p = 0.036$) (ตารางที่ 1)

4.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง CD44 genotype และการแสดงออกของโปรตีน CD44 ของผู้ป่วยโรคในระบบทางเดินอาหาร

เพื่อศึกษาว่าการแสดงออกของโปรตีน CD44 มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ genotype หรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ของรูปแบบการแสดงออกของ genotype และการแสดงออกของโปรตีน CD44 ในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง ผู้ป่วยกลุ่ม precancerous gastric lesions และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร จากผลการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารจำนวน 69 ราย ที่มีการแสดงออกของโปรตีน CD44 จะมี genotype AG 35.89% และผู้ป่วยจำนวน 89 ราย จะมี genotype GG เท่ากับ 43.58% ในขณะที่ผู้ป่วยอีก 4 รายจะมี genotype AA 2.56% และยังพบความสัมพันธ์กันระหว่างรูปแบบการแสดงออกของ CD44 genotype และการแสดงออกของโปรตีน CD44 โดยพบว่าผู้ป่วยที่มี genotype AG และ GG มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการย้อมติด CD44 ด้วย ($p = 0.024$ และ $p = 0.016$, ตามลำดับ) โดยค่า OR (odd ratio) ของผู้ป่วยที่มี genotype AG และ GG ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะอาหารมีค่าเท่ากับ 5.67 (95% CI = 1.54 to 7.23) และ 8.32 (95% CI = 2.94 to 11.41) โดยวิธี univariate Cox regression model analysis และ 3.28 (95% CI = 2.47 to 5.63) และ

4.14 (95% CI = 1.84 to 7.32 ตามลำดับโดยวิธี multivariate Cox proportional hazards regression model ในขณะที่ในผู้ป่วยกลุ่มกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังและผู้ป่วยกลุ่ม precancerous gastric lesions ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการแสดงออกของ genotype ทั้งสามชนิดและการแสดงออกของโปรตีน CD44 (ตารางที่ 2)

4.5 บทบาทของการแสดงออกของโปรตีน CD44 ต่อการพยากรณ์โรคและข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร

อัตราการย้อมติดสีของ CD44 ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารเท่ากับ 65% และข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4 จากผลการศึกษา location of tumor, tumor size, histologic type, lymphatic invasion, vascular invasion, pathological T stage, pathological TNM stage, residual tumor และ 5 years survival พบว่ามีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการที่จะย้อมติดสี CD44 (ตารางที่ 3) จากนั้นคณะผู้วิจัยทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ดังกล่าวโดยใช้วิธี multivariate Cox proportional hazards regression model เพื่อปรับปัจจัยที่จะส่งผลต่อผลการวิจัย เช่น เพศ อายุ โรคประจำตัว และประวัติครอบครัวของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร จากผลการศึกษาพบว่า location of tumor (lower) [$p = 0.018$, OR= 3.82 (1.31-5.84)] , tumor size (55 mm) [$p = 0.023$, OR = 5.24 (3.28-8.18)], undifferentiated histologic type [$p = 0.037$, OR = 4.19 (4.18-10.29)], absent lymphatic invasion [$p = 0.018$, OR = 4.12 (1.08-6.34)], T3 and T4 pathological stage [$p = 0.041$, OR = 2.09 (1.02-3.07)], High pathological stage (stage III and IV) $p = 0.026$, OR = 3.46 (1.82-5.24)] and $p = 0.019$, OR = 4.33(3.47-8.89), residual tumors [$p = 0.022$, OR = 3.29 (1.87-4.39)] และ 5 year survival rate [$p = 0.038$, OR = 2.26 (2.01-4.89)] มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน CD44 (ตารางที่ 4) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างกันของข้อมูลทางคลินิกในกลุ่ม

ที่มีการแสดงออกของโปรตีน CD44 และกลุ่มที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน CD44 ในระหว่างการศึกษาพบว่าผู้ป่วยจำนวน 13 ราย (10.31%) ที่ไม่สามารถติดต่อได้และเสียชีวิตไปจำนวน 45 ราย (30.20%) โดยผู้ป่วย 41 ราย (91.11%) สาเหตุของการเสียชีวิตเกิดจากการกลับมาเป็นซ้ำของโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร และอีก 4 ราย (8.88%) เสียชีวิตจากโรคอื่นๆ

ตารางที่ 1 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยโรคในระบบทางเดินอาหาร

Patient's demographics data	Gastric mucosal pathology			p- value
	Chronic gastritis(n=125)	Precancerous (n=113)	Gastric cancer(n=162)	
Age (year \pm SD)	55.03 \pm 12.92	54.32 \pm 15.83	61.38 \pm 12.39	0.169
Sex (male (%))	35.5	39.3	72.5	0.057
Underlying condition (%)				
▪ HT	9.67	7.14	10.25	0.861
▪ DM	12.90	10.71	12.82	0.732
▪ Hyperlipidemia	6.45	3.57	5.12	0.463
▪ Smoking	16.12	14.28	15.38	0.548
▪ Alcohol	12.90	7.14	15.38	0.169
▪ Family history of gastric cancer	3.22	3.57	5.15	0.663
CD44 polymorphism (%)				
▪ AA	12.90	17.90	2.50	0.024*
▪ AG	45.20	39.30	42.50	0.683
▪ GG	41.90	42.90	55.0	0.425
CD44 protein staining (Positive (n) (%))	-	21.40	65.0	0.036*

Comparison between the groups were done by using ANOVA. $p < 0.05$ considered as statistically significant.

ตารางที่ 2 การแสดงออกของโปรตีน CD44 และความแปรผันทางพันธุกรรมในผู้ป่วยโรกระบบทางเดินอาหาร

Polymorphism of gastric mucosal pathology	Expression of CD44 protein (%)		OR (95% CI)	p-value
	Negative	Positive		
Precancerous (n=113) ^a				
▪ AA	10.71	7.14	0.68(0.47-0.96)	0.693
▪ AG	35.71	14.28	0.91(0.87-1.86)	0.058
▪ GG	28.57	-	-	-
Gastric cancer (n=162) ^a				
▪ AA	-	2.56	-	-
▪ AG	7.69	35.89	5.67(1.54-7.23)	0.024*
▪ GG	10.25	43.58	8.32(2.94-11.42)	0.016*
Gastric cancer (n=162) ^b				
▪ AG	7.69	35.89	3.28(2.47-5.63)	0.036*
▪ GG	10.25	43.58	4.14(1.84-7.32)	0.046*

^aUnivariate Cox regression model analysis used to analyze the data. ^bMultivariate Cox proportional hazards regression model analysis was used to analyze the data. OR, odds ratio; CI, confidence interval. *Significant is set at $p < 0.05$.

ตารางที่ 3 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารกับการแสดงออกของโปรตีน CD44

Clinicopathological characteristics of gastric cancer (n=162)	Expression of CD 44 protein (%)		OR (95% CI)	p-value
	Negative	Positive		
Location of tumor (%)				
▪ Upper	5.12	10.25	0.62(0.48-0.87)	0.724
▪ Middle	10.25	15.38	0.87(0.64-1.09)	0.953
▪ Lower	7.69	58.84	4.69(2.01-6.48)	0.014*
Tumor size (%)				
▪ ≥70 mm	7.69	48.71	5.74(3.18-8.29)	0.019*
▪ ≤70 mm	20.51	23.07	0.54(0.42-0.76)	0.834
Histologic type (%)				
▪ Differentiated	23.07	17.94	0.73(0.59-0.92)	0.524
▪ Undifferentiated	5.12	53.84	8.29(6.38-12.19)	0.014*
Lymphatic invasion (%)				
▪ Absent	41.02	7.69	4.21(1.29-7.74)	0.028*
▪ Present	12.82	38.46	3.39(1.69-5.58)	0.032*
Vascular invasion (%)				
▪ Absent	30.76	20.51	0.79(0.62-1.38)	0.497
▪ Present	25.64	23.07	0.59(0.42-1.18)	0.326
Pathological T stage (%)				
▪ T1-T2	30.76	28.20	0.82(0.63-1.13)	0.284
▪ T3-T4	20.51	46.15	2.19(1.02-6.29)	0.039*
Pathological TNM stage (%)				
▪ I	7.69	5.12	0.92(0.76-1.32)	0.562
▪ II	17.97	12.82	0.72(0.51-1.15)	0.481
▪ III	5.12	28.02	4.49(1.12-7.84)	0.010*
▪ IV	2.56	20.51	3.32(1.45-5.89)	0.029*
Residual tumor [n=29] (%)				
▪ No	58.97	15.38	2.89(1.07-4.69)	0.039*
▪ Microscopic	2.56	10.25	1.54(1.01-4.43)	0.041*
▪ Gross (unresectable)	5.12	7.69	0.74(0.53-0.91)	0.624
CEA (%)				
▪ < 5.0(ng/ml)	28.02	33.33	0.69(0.58-1.42)	0.573
▪ ≥ 5.0(ng/ml)	17.94	20.51	0.98(0.75-1.54)	0.782
5 years survival (available n = 149) (%)	55.03	14.76	2.83(1.98-5.62)	0.028*

Univariate Cox regression model analysis used to analyze the data. OR, odds ratio; CI, confidence interval. *Significant is set at $p < 0.05$.

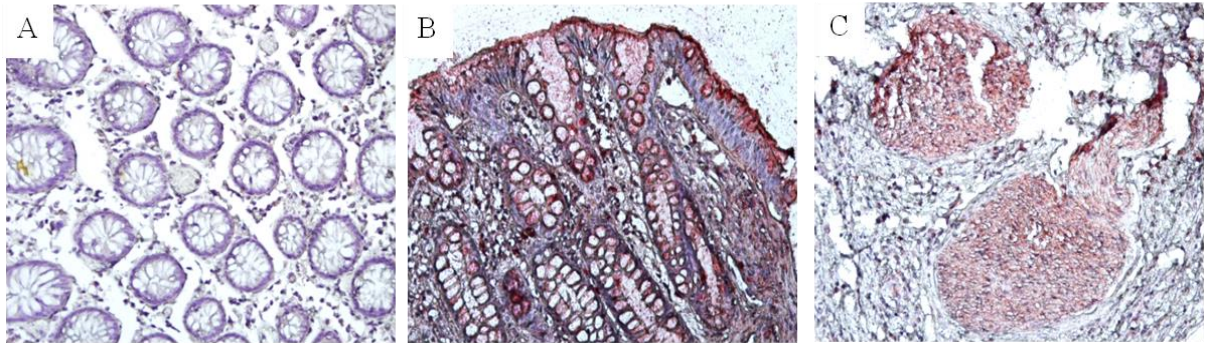
ตารางที่ 4 ข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน CD44
(Multivariate Cox proportional hazards regression model analysis)

Clinicopathological characteristics of gastric cancer (n=162)	Expression of CD 44 protein (%)		OR (95% CI)	p-value
	Negative	Positive		
Location of tumor (%)				
■ Lower	7.69	58.84	3.82(1.31-5.84)	0.018*
Tumor size (%)				
■ ≥70 mm	7.69	48.71	5.24(3.28-8.18)	0.023*
Histologic type (%)				
■ Undifferentiated	5.12	53.84	4.19(4.18-10.29)	0.037*
Lymphatic invasion (%)				
■ Absent	41.02	7.69	4.12(1.08-6.34)	0.018*
■ Present	12.82	38.46	1.09(1.19-2.47)	0.061
Pathological T stage (%)				
■ T3-T4	20.51	46.15	2.09(1.02-3.07)	0.041*
Pathological TNM stage (%)				
■ III	5.12	28.02	3.46(1.82-5.24)	0.026*
■ IV	2.56	20.51	4.33(3.47-8.89)	0.019*
Residual tumor [n=29] (%)				
■ No	58.97	15.38	3.29(1.87-4.39)	0.022*
■ Microscopic	2.56	10.25	0.94(1.31-3.83)	0.057
5 years survival (available n = 118) (%)	55.08	18.64	2.26(2.01-4.89)	0.038*

Multivariate Cox proportional hazards regression model analysis was used to analyze the data. OR, odds ratio; CI, confidence interval.

*Adjustments were performed by incorporating all of the relevant factors, such as age, gender, underlying disease and family history of gastric cancer into the analysis.

*Significant is set at $p < 0.05$.



รูปที่ 1 แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน CD44 ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารด้วยเทคนิค immunohistochemistry ผลการย้อม CD44 ในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง (A) ผู้ป่วย precancerous gastric lesions (B) และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร (C) (magnification, x200)



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีน CD44 สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์การพัฒนาไปสู่โรคมะเร็งกระเพาะอาหารได้ โดยเฉพาะผู้ป่วยในกลุ่ม precancerous gastric lesions จะเป็นกลุ่มที่ต้องเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิดเพื่อป้องกันการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารต่อไป

อภิปรายผล

จากทฤษฎี cancer stem cell (CSC) ที่ระบุว่า CSCs มีบทบาทสำคัญในการขับเคลื่อนกระบวนการเกิดโรคมะเร็งไม่ว่าจะเป็นจุดกำเนิดของการเกิดมะเร็ง การพัฒนาและความก้าวหน้าของโรค การแพร่กระจายของโรคและการกลับเป็นซ้ำของโรค (Nguyen L. V., 2012) Stem cell จะพัฒนาจนกลายมาเป็นเซลล์มะเร็งได้หลังจากที่เกิดการกลายพันธุ์และดูเหมือนว่าเซลล์ดังกล่าวจะมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการกลับเป็นซ้ำและการแพร่กระจายของโรคมะเร็งอีกด้วย (Bomken S., 2010) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า CD44 เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการพยากรณ์โรคในมะเร็งหลายชนิดรวมถึงมะเร็งกระเพาะอาหารด้วย โดยพบว่าจะมีการแสดงออกของยีนดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยมะเร็ง (Ghaffarzadehgan K., 2008; Zhou J., 2011; Jiang L., 2012; Gerger A., 2011; Huh J. W., 2009) มีรายงานต่างๆ ที่แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน CD44 สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีในผู้ป่วยมะเร็งหลายชนิดได้แก่ มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Huh J. W., 2009) มะเร็งเต้านม (Bomken S., 2010) และมะเร็งกระเพาะอาหาร (Ghaffarzadehgan K., 2008) จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของโปรตีน CD44 อาจจะมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของโรคมะเร็งกระเพาะอาหารและสามารถใช้ CD44 เป็นตัวบ่งชี้การพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารได้

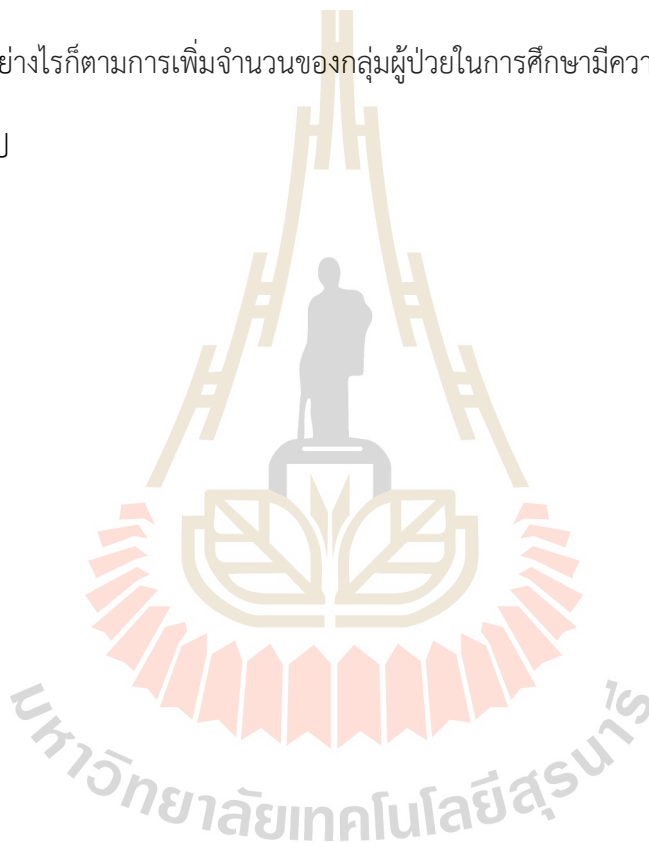
การศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยถือเป็นกลุ่มแรกที่ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน CD44 และความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ในผู้ป่วยโรกระบบทางเดินอาหารของประเทศ ไทย โดยคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารจำนวน 162 ราย ผู้ป่วยที่เป็นโรกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังจำนวน 125 ราย และผู้ป่วย precancerous gastric lesions จำนวน 165 ราย จากผลการศึกษาพบว่าในผู้ป่วย precancerous gastric lesions พบการแสดงออกของโปรตีน CD44 21.4% และในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร 65% ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังไม่พบการแสดงออกของโปรตีน CD44 และยังพบว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยทั้งสามกลุ่ม ($p = 0.036$) จากผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีน CD44 สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในผู้ป่วยโรคในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสันนิษฐานว่า CD44 อาจจะใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการพยากรณ์การ พัฒนาการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารในผู้ป่วยได้โดยเฉพาะในผู้ป่วยกลุ่ม precancerous gastric lesions ที่มี genotype เป็น AG หรือ GG จะต้องมีการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการพัฒนาของโรคอย่างสม่ำเสมอเพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้อาการกลุ่มดังกล่าวพัฒนาไปเป็นมะเร็งกระเพาะอาหารต่อไป ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Dammrich และคณะ (Dammrich J., 1995) ที่รายงานว่า CD44 (v6 isomer) ถูกแสดงออกในผู้ป่วยกลุ่ม chronic atrophic gastritis และ intestinal metaplasia ซึ่งเป็นผู้ป่วยในกลุ่ม precancerous gastric lesions ดังนั้นการแสดงออกของ cancer stem cell จึงสามารถที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไปสู่มะเร็งกระเพาะอาหารได้ จากผลการศึกษาที่คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน CD44 และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนดังกล่าว รวมถึงเปรียบเทียบความเสี่ยงของการแสดงออกของโปรตีนนี้ในผู้ป่วยกลุ่ม precancerous gastric lesions และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร

จากการศึกษาในหลายการศึกษาได้เสนอว่า CD44 polymorphisms ถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่ สำคัญที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์ความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งได้ในมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งมะเร็งกระเพาะอาหารด้วย (Heider, K. H., 1993, Chou, Y. E., 2014, Gerger, A., 2011; Vazquez, A., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า CD44 rs187116 polymorphism สัมพันธ์กับการ เพิ่มความเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง จากการศึกษาค้นคว้านี้พบว่าในเมื่อทดสอบ CD44 rs187116 polymorphism ในผู้ป่วยที่เป็นโรคระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง ผู้ป่วย precancerous gastric lesions และผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารจะมี genotype AA homozygous ที่แตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.024$) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคระเพาะอาหารอักเสบ เรื้อรังหรือ precancerous จะมีจีโนไทป์ AA มากกว่าผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ ว่า polymorphism มีส่วนที่ช่วยในการส่งเสริมการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร จะมีจีโนไทป์ AG และ GG เพิ่มขึ้น 17 และ 22 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Suenaga และคณะ (41) โดยรายงานว่าจีโนไทป์ AG และ GG เป็นจีโนไทป์ ที่พบมากที่สุดในการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารของชาวญี่ปุ่น นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าผู้ป่วยมะเร็ง กระเพาะที่มีจีโนไทป์ AG หรือ GG ของ CD44 rs187116 มีความเสี่ยงที่จะมีการแสดงออกของโปรตีน CD44 เมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ AA (wide type) แม้ว่าอัลลีล G จะสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยง ของการแสดงออกของโปรตีน CD44 ในมะเร็งกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยกลุ่ม precancerous gastric lesions พบว่าอัลลีลดังกล่าวกลับไม่สัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน CD44 จากผลดังกล่าวอาจจะเป็นเพราะในการทดลองนี้จำนวนของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มมีจำนวนน้อยจึง อาจส่งผลต่อการทดสอบค่าทางสถิติ ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่าง CD44 rs187116 polymorphism และ การแสดงออกของโปรตีน CD44 ในผู้ป่วยโรกระบบทางเดินอาหารจึงยังไม่ สามารถสรุปผลได้แน่ชัด หรืออาจจะเป็นเพราะการแสดงออกของโปรตีน CD44 ไม่ได้เป็นผลมาจาก การกลายพันธุ์ (mutation) CD44 rs187116 แต่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนอื่นที่ส่งผลต่อ

กระบวนการเกิดมะเร็งซึ่งอาจจะส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน CD44 ที่เพิ่มมากขึ้นในมะเร็ง
กระเพาะอาหาร

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเพียง polymorphism เดียวคือ CD44
rs187116 ดังนั้นการศึกษาในครั้งต่อไปควรทำการศึกษา polymorphism อื่นเพิ่มเติม แม้ว่าการศึกษา
ครั้งนี้จะเป็นผลจากการศึกษาแบบ multicenter ของทั้งสามโรงพยาบาลในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
ของประเทศไทยแต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนของกลุ่มผู้ป่วยในการศึกษามีความจำเป็นสำหรับ
การศึกษาในครั้งต่อไป



บทที่ 6

บรรณานุกรม

- Bomken, S., *et al.* (2010). Understanding the cancer stem cell. *British journal of cancer*. 103(4). 439-445.
- Cao, L., *et al.* (2014). CD44 (+) CD324 (-) expression and prognosis in gastric cancer patients. *Journal of surgical oncology*. 110(6). 727-733.
- Chen, T., *et al.* (2012). Identification and expansion of cancer stem cells in tumor tissues and peripheral blood derived from gastric adenocarcinoma patients. *Cell research*. 22(1). 248-258.
- Chou, Y. E., *et al.* (2014). CD44 gene polymorphisms on hepatocellular carcinoma susceptibility and clinicopathologic features. *BioMed research international*, 2014. 231474.
- Clarke, M.F, *et al.* (2006). Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research*. 66(19). 9339-9344.
- Collins, A. T., *et al.* (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*. 65(23). 10946-10951.
- Dalerba, P., *et al.* (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(24). 10158-10163.

- Dammrich, J., *et al.* (1995). Importance of different CD44v6 expression in human gastric intestinal and diffuse type cancers for metastatic lymphogenic. *J Mol Med (Berl)*. 73(8). 395-401.
- Endo, K., and Terada, T. (2000). Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *Journal of hepatology*. 32 (1). 78-84.
- Gerger, A., *et al.* (2011). Common cancer stem cell gene variants predict colon cancer recurrence. *Clin Cancer Res*. 17(21). 6934-6943.
- Ghaffarzadehgan, K., *et al.* (2008). Expression of cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma and its prognostic importance. *World journal of gastroenterology*. 14(41). 6376-6381.
- Heider, K. H., *et al.* (1993). Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer research*. 53(18). 4197-4203.
- Hohenberger, P., and Gretschel S. (2003). Gastric cancer. *Lancet (London, England)*. 362(9380). 305-315.
- Huh, J. W., *et al.* (2009). Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: association with prognosis. *Pathology international*. 59(4). 241-246.
- Jiang, L., *et al.* (2012). CD44 rs13347 C>T polymorphism predicts breast cancer risk and prognosis in Chinese populations. *Breast Cancer Res*. 14(4). R105.

- Joensuu, H., et al. (1993). Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *The American journal of pathology*. 143 (3):867-874.
- Kainz, C., et al. (1995). Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. *Eur J Cancer*. 31(10):1706-1709.
- Kusters, J.G., van Vliet A.H. and Kuipers E.J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews*. 19(3). 449-490.
- Mayer, B., et al. (1993). De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet (London, England)*. 342(8878).1019-1022.
- Nguyen, L. V., et al. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature reviews*. 12(2). 133-143.
- Park, S. Y., et al. (2010). Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 16(3). 876-887.
- Phillips, T. M., McBride, W. H., and Pajonk, F. (2006). The response of CD24 (-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *Journal of the National Cancer Institute*. 98(24).1777-1785.
- Qiao, X. T, and Gumucio, D. L. (2011). Current molecular markers for gastric progenitor cells and gastric cancer stem cells. *Journal of gastroenterology* 46 (7):855-865.
- Reya, T., et al. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414(6859).105-111.
- Saikawa, Y., et al. (2010). Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. *Gastric Cancer*. 13(1), 11-24.

- Sampieri, K., and Fodde R. (2012). Cancer stem cells and metastasis. *Seminars in cancer biology*. 22(3). 187-193.
- Suenaga, M., *et al.* (2015). CD44 single nucleotide polymorphism and isoform switching may predict gastric cancer recurrence. *Journal of surgical oncology*. 112(6). 622-628.
- Suga, T., *et al.* (2007). Haplotype-based analysis of genes associated with risk of adverse skin reactions after radiotherapy in breast cancer patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 69(3). 685-693.
- Takaishi S., Okumura, T., and Wang T. C. (2008). Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 26(17). 2876-2882.
- Takaishi, S., *et al.* (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 27(5). 1006-1020.
- Talmadge, J.E., and Fidler I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*. 70(14). 5649-5669.
- Tan, D., *et al.* (2003). Loss of cables protein expression in human non-small cell lung cancer: a tissue microarray study. *Human pathology*. 34(2). 143-149.
- Torre, L.A., *et al.* (2012). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 65(2). 87-108.
- Vazquez, A., *et al.* (2010). Chemosensitivity profiles identify polymorphisms in the p53 network genes 14-3-3tau and CD44 that affect sarcoma incidence and survival. *Cancer research*. 70(1). 172-180.

- Wang, W., et al. (2014). Role of cancer stem cell marker CD44 in gastric cancer: a meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*. 7(12). 5059-5066.
- Wielenga, V. J., et al. (1993). Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer research*. 53(20). 4754-4756.
- Wroblewski, L.E., Peek R.M., and Wilson K.T. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clinical microbiology reviews*. 23(4). 713-739.
- Xu, G., et al. (2013). Cancer stem cells: the 'heartbeat' of gastric cancer. *Journal of gastroenterology*. 48(7). 781-797.
- Yong, C. S., et al. (2012). CD44/CD24 expression in recurrent gastric cancer: a retrospective analysis. *BMC gastroenterology*. 12(95). 95.
- Zhou, J., et al. (2010). Unique SNP in CD44 intron 1 and its role in breast cancer development. *Anticancer research*. 30(4). 1263-1272.
- Zhou, J., et al. (2011). Implications of single nucleotide polymorphisms in CD44 exon 2 for risk of breast cancer. *Eur J Cancer Prev*, 20(5). 396-402.

ภาคผนวก ก

บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. Phosphate buffered saline (PBS) เข้มข้น 0.15 โมลาร์ pH 7.2

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8.0 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	0.2 กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na ₂ HPO ₄)	1.15 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

2. Blocking solution และ antibody diluent ความเข้มข้น 1.5%

Normal serum	15 ไมโครลิตร
PBS (pH 7.5)	985 ไมโครลิตร

ประวัตินักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ทวีศักดิ์ ทองทวี เป็นอาจารย์สาขาวิชาศัลยศาสตร์ สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เกิดเมื่อวันที่ 14 มีนาคม พ.ศ. 2521 เกิดจังหวัดสุรินทร์ การศึกษาระดับปริญญาตรี แพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัย มหิดล ปีที่สำเร็จการศึกษา 2547 หลังจากจบการศึกษาทำงานที่ โรงพยาบาลสุรินทร์ เป็นเวลา 3 ปี ก่อนมารับตำแหน่งเป็นอาจารย์สาขาวิชาศัลยศาสตร์ สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สถานที่ติดต่อ สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี หมายเลขโทรศัพท์ที่ติดต่อได้ทั้งในและนอกเวลาราชการ 081-9010891 E-mail address : Taweesak.t@sut.ac.th

ผลงานตีพิมพ์(ย้อนหลัง 5 ปี)

- 1) **Tongtawee, T.**, Bartpho, T., Wattanawongdon, W., Dechsukhum, C., Leeanansaksiri, W., Matrakool,L., Panpimanmas, S.Role of toll-like receptor 10 gene polymorphism and gastric mucosal pattern in patients with chronic gastritis (2017) Turkish Journal of Gastroenterology, 28 (4), pp. 243-247. DOI: 10.5152/tjg.2017.16673
- 2) **Tongtawee, T.**, Bartpho, T., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Dechsukhum, C., Leeanansaksiri, W., Loyd, R.A., Talabnin, K., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Genetic polymorphisms in TLR1, TLR2, TLR4, and TLR10 of Helicobacter pylori-associated gastritis: a prospective cross-sectional study in Thailand (2017) European Journal of Cancer Prevention, 27(2), pp. 118-123.
- 3) Kaewpitoon, S.J., Rujirakul, R., Wakuwattapong, P., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Panpimanmas, S., Kujapun, J., Norkaew, J., Photipim, M., Ponphimai, S., Chavengkun, W., Komporn, P., Padchasuwan, N., Sawaspol, S., Phandee, M.C., Phandee, W., Phanurak,

W., Kaewpitoon, N. Overweight relation to liver fluke infection among rural participants from 4 districts of Nakhon Ratchasima province, Thailand (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (5), pp. 2565-2571.

4) **Tongtawee, T.**, Dechsukhum, C., Leraanansaksiri, W., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Role of the Mdm2 SNIP 309 polymorphism in gastric mucosal morphologic patterns of patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (3), pp. 1057-1060. Cited 1 time.

5) Kaewpitoon, S.J., Kaewpitoon, N., Rujirakul, R., Wakkuwattapong, P., Matrakul, L., **Tongtawee, T.**, Loyd, R.A., Norkaew, J., Kujapun, J., Chavengkun, W., Ponphimai, S., Polsripradist, P., Eksanti, T., Phatisena, T. Nurses and television as sources of information effecting behavioral improvement regarding liver flukes in Nakhon Ratchasima Province, Thailand (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (3), pp. 1097-1102.

6) Kaewpitoon, S.J., Rujirakul, R., Sangkudloa, A., Kaewthani, S., Khemplila, K., Cherdjirapong, K., Kujapun, J., Norkaew, J., Chavengkun, W., Ponphimai, S., Polsripradist, P., Padchasuwan, N., Joosiri, A., Wakkhuwattapong, P., Loyd, R.A., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Panpimanmas, S., Kaewpitoon, N. Distribution of the population at risk of cholangiocarcinoma in Bua Yai district, Nakhon Ratchasima Of Thailand using google map (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (3), pp. 1433-1436.

7) **Tongtawee, T.**, Dechsukhum, C., Matrakool, L., Panpimanmas, S., Loyd, R.A., Kaewpitoon, S.J., Kaewpitoon, N. High prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to

clarithromycin: A hospital-based cross-sectional study in Nakhon Ratchasima Province, Northeast of Thailand (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (18), pp. 8281-8285.

8) Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Bartpho, T., Dechsukhum, C., Loyd, R.A., Kaewpitoon, S.J., Kaewpitoon, N. Improved detection of *Helicobacter pylori* infection and premalignant gastric mucosa using conventional white light source gastroscopy (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (4), pp. 2099-2103.

9) **Tongtawee, T.**, Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Dechsukhum, C., LEEANANSAKSIRI, W., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Characteristics and risk factors of *Helicobacter pylori* associated gastritis: A prospective cross-sectional study in northeast Thailand (2016) *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, art. no. 9130602.

10) **Tongtawee, T.**, Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Dechsukhum, C., LEEANANSAKSIRI, W., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (4), pp. 1631-1635.

11) Kaewpitoon, S.J., Rujirakul, R., **Tongtawee, T.**, Matrakool, L., Panpimanmas, S., WAKKUWATTAPONG, P., Loyd, R.A., Kaewpitoon, N. Detection of the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* using a Mini Parasep SF Faecal parasite concentrator (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (1), pp. 373-376.

12) **Tongtawee, T.**, Bartpho, T., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Dechsukhum, C., LEEANANSAKSIRI, W., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. TLR1 polymorphism associations with gastric mucosa morphologic patterns on magnifying NBI endoscopy: A

prospective cross-sectional study (2016) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17 (7), pp. 3391-3394.

13) Kaewpitoon, S.J., Rujirakul, R., Wakkuwattapong, P., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Norkaew, J., Kujapun, J., Kampangsri, W., Kaewpitoon, N. Implementation of health behavior education concerning liver flukes among village health volunteers in an epidemic area of Thailand (2016) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17 (4), pp. 1713-1716.

14) **Tongtawee, T.**, Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Dechsukhum, C., Leraanansaksiri, W., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Helicobacter pylori associated gastritis increases risk of colorectal polyps: A hospital based-cross-sectional study in Nakhon Ratchasima Province, Northeastern Thailand (2016) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17 (1), pp. 341-345.

15) **Tongtawee, T.**, Dechsukhum, C., Leraanansaksiri, W., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Improved detection of Helicobacter pylori infection and premalignant gastric Mucosa using "site specific biopsy": A randomized control clinical trial (2016) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 16 (18), pp. 8487-8490.

16) Kaewpitoon, S.J., Rujirakul, R., Wakkuwattapong, P., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Panpimanmas, S., Pengsaa, P., Jomkoa, D., Joosiri, A., Kaewpitoon, N. Opisthorchis viverrini infection among people in the border areas of three provinces, northeast of Thailand (2016) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17 (6), pp. 2973-2977.

17) Kaewpitoon, S.J., Rujirakul, R., Loyd, R.A., Panpimanmas, S., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Komporn, P., Norkaew, J., Chavengkun, W., Kujapun, J., Polphimai, S., Phatisena, T., Eaksunti, T., Polsripradist, P., Padchasuwan, N., Kaewpitoon, N. Re-examination of *Opisthorchis viverrini* in Nakhon Ratchasima Province, Northeastern Thailand, indicates continued needs for health intervention (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (1), pp. 231-234.

18) Kaewpitoon, S.J., Namwichaisirikul, N., Loyd, R.A., Churproong, S., Ueng-Arporn, N., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Rujirakul, R., Nimkhuntod, P., Wakhuwathapong, P., Kaewpitoon, N. Nutritional status among rural community elderly in the risk area of liver fluke, Surin Province, Thailand (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (18), pp. 8391-8396.

19) Mongsawaeng, C., Kokorn, N., Kujapun, J., Norkaew, J., Kootanavanichpong, N., Chavengkun, W., Ponphimai, S., Kaewpitoon, S.J., **Tongtawee, T.**, Padchasuwan, N., Pengsaa, P., Komporn, P., Kaewpitoon, N. Knowledge, attitude, and practice regarding cervical cancer among rural community women in Northeast Thailand (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (1), pp. 85-88.

20) Phatisena, P., Eaksanti, T., Wichantuk, P., Tritipsombut, J., Kaewpitoon, S.J., Rujirakul, R., Wakhuwattapong, P., **Tongtawee, T.**, Matrakool, L., Panpimanmas, S., Norkaew, J., Kujapun, J., Chavengkun, W., Komporn, P., Pothipim, M., Ponphimai, S., Padchasuwan, N., Kaewpitoon, N. Behavioral modification regarding liver fluke and cholangiocarcinoma with a health belief model using integrated learning (2016) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (6), pp. 2889-2894.

- 21) Kaewpitoon, S.J., Loyd, R.A., Rujirakul, R., Panpimanmas, S., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Kootanavanichpong, N., Pengsaa, P., Komporn, P., Chavengkun, W., Kujapun, J., Norkaew, J., Ponphimai, S., Padchasuwan, N., Polsripradist, P., Eksanti, T., Phatisena, T., Kaewpitoon, N. Helicobacter species are possible risk factors of Cholangiocarcinoma (2016) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17 (1), pp. 37-44.
- 22) Kaewpitoon, S.J., Loyd, R.A., Rujirakul, R., Panpimanmas, S., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Kootanavanichpong, N., Komporn, P., Chavengkun, W., Kujapun, J., Norkaew, J., Ponphimai, S., Padchasuwan, N., Pholsripradist, P., Eksanti, T., Phatisena, T., Kaewpitoon, N. Benefits of metformin use for cholangiocarcinoma (2016) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 16 (18), pp. 8079-8083.
- 23) Kaewpitoon, S.J., Rujirakul, R., Loyd, R.A., Panpimanmas, S., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Komporn, P., Norkaew, J., Chavengkun, W., Wakkhuwattapong, P., Kujapun, J., Ponphimai, S., Phatisena, T., Eksanti, T., Polsripradist, P., Joosiri, A., Sukkasam, I., Padchasuwan, N., Kaewpitoon, N. Surveillance of populations at risk of cholangiocarcinoma development in rural communities of Thailand using the Korat-CCA verbal screening test (2016) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17 (4), pp. 2205-2209.
- 24) **Tongtawee, T.**, Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Dechsukhum, C., Loyd, R.A., Matrakool, L. Correlation between gastric mucosal morphologic patterns and histopathological severity of helicobacter pylori associated gastritis using conventional

narrow band imaging gastroscopy (2015) *BioMed Research International*, 2015, art. no. 808505.

25) Kaewpitoon, S.J., Kaewpitoon, N., Rujirakul, R., Ueng-arporn, N., Matrakool, L., **Tongtawee, T.** The carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* among rural community people in Northeast Thailand: A cross-sectional descriptive study using multistage sampling technique (2015) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (17), pp. 7803-7807.

26) **Tongtawee, T.**, Dechsukhum, C., Leeanansaksiri, W., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Genetic polymorphism of MDM2 SNP309 in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis (2015) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (16), pp. 7049-7052.

27) **Tongtawee, T.**, Kaewpitoon, S.J., Loyd, R., Chanvitan, S., Leelawat, K., Praditpol, N., Jujinda, S., Kaewpitoon, N. High expression of matrix metalloproteinase-11 indicates poor prognosis in human cholangiocarcinoma (2015) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (9), pp. 3697-3701.

28) **Tongtawee, T.**, Dechsukhum, C., Talabnin, K., Leeanansaksiri, W., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Correlation between Patterns of Mdm2 SNIP 309 and histopathological severity of *Helicobacter pylori* associated gastritis in Thailand (2015) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16 (17), pp. 7781-7784.

29) **Tongtawee, T.**, Dechsukhum, C., Leeanansaksiri, W., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Effect of pretreatment with *Lactobacillus*

delbrueckii and Streptococcus thermophilus on tailored triple therapy for Helicobacter pylori eradication: A prospective randomized controlled clinical trial (2015) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 16 (12), pp. 4885-4890.

30) **Tongtawee, T.**, Dechsukhum, C., Leeanansaksiri, W., Kaewpitoon, S., Kaewpitoon, N., Loyd, R.A., Matrakool, L., Panpimanmas, S. Improved helicobacter pylori eradication rate of tailored triple therapy by adding lactobacillus delbrueckii and streptococcus thermophilus in Northeast Region of Thailand: A prospective randomized controlled clinical trial (2015) Gastroenterology Research and Practice, 2015, art. no. 518018.

31) Kaewpitoon, N., Kootanavanichpong, N., Komporn, P., Chavenkun, W., Kujapun, J., Norkaew, J., Ponphimai, S., Matrakool, L., **Tongtawee, T.**, Panpimanmas, S., Rujirakul, R., Padchasuwan, N., Pholsripadit, P., Eksanti, T., Phatisena, T., Loyd, R.A., Kaewpitoon, S.J. Review and current status of *opisthorchis viverrini* infection at the community level in Thailand (2015) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 16 (16), pp. 6825-6830.