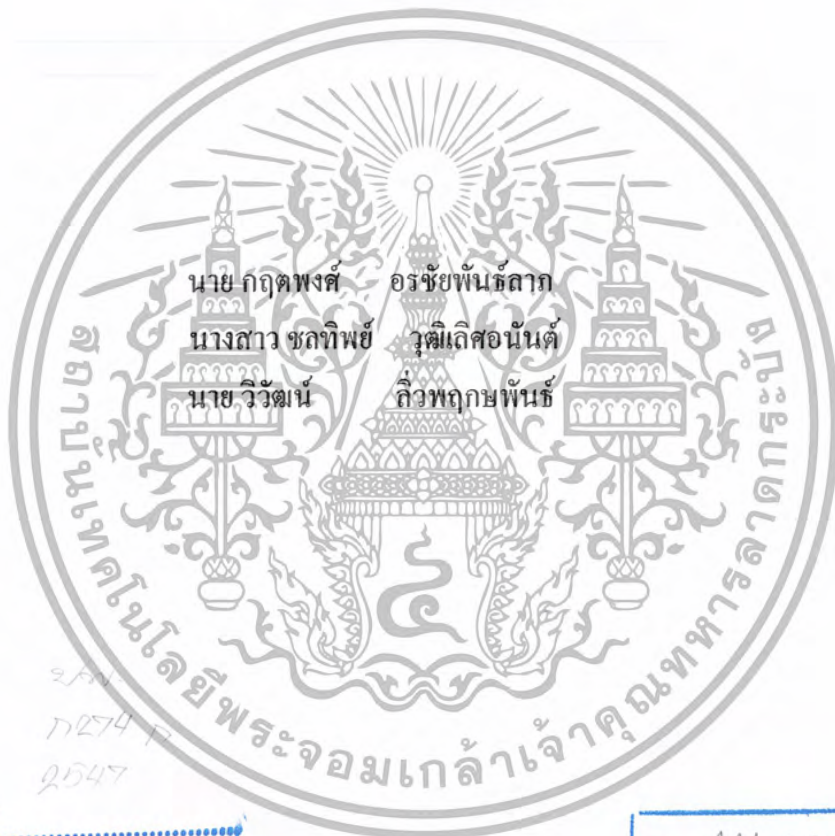


สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักโดย
เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส



นาย กฤตพงศ์ อรชัยพันธ์ลาภ
นางสาว ชลทิพย์ วุฒิเลิศอนันต์
นาย วิวัฒน์ ถีวพฤษภพันท์

๒.๕๗
๓๕๗๔
๒๕๔๗

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

61748

2 1 ก.ค. 2549

b.....
i.....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genetic Aberration of colorectal cancer detected by polymerase chain reaction



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ เรื่อง การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวาร
 หนักโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นักศึกษา นาย กฤตพงศ์ อรชัยพันธ์ลาภ
 นางสาว ชลทิพย์ วุฒิเลิศอนันต์
 นาย วิวัฒน์ ลีวฤกษ์พันธ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
 สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
 อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
 ลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร
 บัณฑิต

	คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ. ดร. อุนเรือน เพชรวัลย์	
กรรมการ	ผศ. ดร. สรัญญา พันธุ์ฤกษ์	
กรรมการ	อาจารย์ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

..... นวพล นนท
 (รศ. ดร. นวพลวรรณ ฒ ระนอง)
 หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ เรื่อง	การศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	
นักศึกษา	นาย กฤตพงศ์	อรชัยพันธ์ลาภ
	นางสาวชลทิพย์	วุฒิเลิศอนันต์
	นาย วิวัฒน์	ถั่วพฤษกษพันธ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

บทคัดย่อ

กลไกการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของ tumor suppressor gene หลายชนิด เช่น มีการขาดหายไปของยีน *p53*, *APC* และ *DCC* ในโครงการพิเศษนี้ ทำการศึกษาเกี่ยวกับการขาดหายไปของอัลลีลไดอัลลีลหนึ่งของยีน *p53* โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักระยะ Dukes' B จำนวน 9 ราย และระยะ Dukes' C จำนวน 3 ราย พบว่า มีการขาดหายไปของอัลลีลของยีน *p53* ในผู้ป่วยทั้งหมด 4 ราย (จาก 12 ราย) คิดเป็นร้อยละ 33.3 โดยแบ่งเป็นระยะ Dukes' B จำนวน 2 ราย และระยะ Dukes' C จำนวน 2 ราย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการขาดหายไปของอัลลีลไดอัลลีลหนึ่งของยีน *p53* มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยส่วนมากจะพบในระยะที่รุนแรงมากกว่าในระยะที่รุนแรงน้อยกว่า

Special Project Title Genetic Aberration of colorectal cancer detected by polymerase chain reaction

Name Krittapong Orachaipanlap
Chonlatip Vuttilerdanun
Wiwat Liewpruksapun

Department Applied Biology

Program Biotechnology

Academic Year 2004

Special Project Advisor Mrs. Supattar Poeaim

ABSTRACT

Several tumor suppressor genes are involved in the genetic aberration of colorectal tumorigenesis such as allelic losses of *p53*, *APC* and *DCC* genes. In this study, we investigated the allelic losses of *p53* in the colorectal cancer tissues of 9 cases in Dukes' B stage and 3 cases in Dukes' C stage by polymerase chain reaction technique (PCR). Of the evaluated cases, allelic losses of *p53* were found in 4 from 12 cases (33.3 percent of all cases). In 4 cases were 2 Dukes' B stage and 2 Dukes' C stage. These results showed that allelic losses of *p53* gene involved in the colorectal tumorigenesis and was found in Dukes' C stage more than Dukes' B stage.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และโครงการพิเศษนี้จะสำเร็จลงไม่ได้หากขาดซึ่งความกรุณาจาก อาจารย์ สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์ตลอดทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูง จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุ้นเรือน เพชรวิทย์ ประธานกรรมการคุมสอบโครงการพิเศษ และ ผศ. ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย กรรมการคุมสอบโครงการพิเศษ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อคุมสอบโครงการพิเศษนี้ รวมทั้ง คำแนะนำต่างๆที่มีประโยชน์แก่ข้าพเจ้า เป็นผลให้โครงการพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์แบบมากขึ้น

ขอขอบคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คุณพัชรินทร์ ขาวสวย เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงการพิเศษนี้ ตลอดทั้งพี่ๆ นักศึกษาปริญญาโท และเพื่อนๆนักศึกษาปริญญาตรีทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เป็นอย่างดีเสมอมาทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานได้อย่างราบรื่นและมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและทุกคนในครอบครัว สำหรับคำแนะนำในการทำงานที่มีคุณค่าและมีประโยชน์อย่างมาก ตลอดทั้งกำลังใจที่มอบให้ด้วยดีตลอดมา

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณที่พึงจะได้รับจาก โครงการพิเศษฉบับนี้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นาย กฤตพงศ์	อรชัยพันธ์ถาก
นางสาว ชลทิพย์	วุฒิเลิศอนันต์
นาย วิวัฒน์	ลิวพฤษพันธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal cancer : CRC)	3
2.2 ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	4
2.3 วิธีการตรวจวินิจฉัยโรค	5
2.4 ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	7
2.5 วิธีการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	9
2.6 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	9
2.7 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง	10
2.8 ขบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
3.1 วัตถุประสงค์ และสารเคมี	15
3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	16
3.3 วิธีการทดลอง	17
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	20
4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	20
4.1.1 ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย	20

	หน้า
4.1.2 ความเข้มข้นของแมกนีเซียม	21
4.1.3 อุณหภูมิในการจับกันของไพรมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย	22
4.1.4 จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	23
4.2 การวิเคราะห์ผลของชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	25
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30



สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงตัวอย่างเนื้อเยื่อ อายุ เพศ และระยะของ โรคของผู้ป่วย โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	16
ตารางที่ 2	แสดงผลการทดลองที่ได้จากการทำปฏิกิริยาอุกโช- โพลีเมอเรสของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนักจำนวน 12 ราย	26
ตารางที่ 3	แสดงจำนวนตัวอย่างที่มีการขาดหายไปของอัลลีลใด อัลลีลหนึ่งของยีน p53	27



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงติ่งเนื้อออก (Polyps) ในลำไส้ใหญ่	4
ภาพที่ 2 แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Sigmoidoscope	5
ภาพที่ 3 แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Colonoscope	6
ภาพที่ 4 แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Barium enema	6
ภาพที่ 5 แสดงระยะต่างๆของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	7
ภาพที่ 6 แสดงขบวนการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน	12
ภาพที่ 7 แสดงชิ้นดีเอ็นเอขนาด 235 คู่เบสในสภาวะที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในระดับ 100 200 และ 300 นาโนกรัม	21
ภาพที่ 8 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมที่ 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์	22
ภาพที่ 9 การหาอุณหภูมิในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 50 52 และ 54 องศาเซลเซียส	23
ภาพที่ 10 การทำงานรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ 28 30 และ 35 รอบ	24
ภาพที่ 11 แสดงผลของการขาดหายไปของอัลลีลโคอัลลีลหนึ่งของยีน <i>p53</i> ในชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก	25

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

ปัจจุบันในประเทศไทยโรคมะเร็งจัดเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากเป็นอันดับ 3 โดยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบมากเป็นอันดับ 3 ในเพศชายรองจากมะเร็งตับและมะเร็งปอด ส่วนในเพศหญิงพบมากเป็นอันดับที่ 6 (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2536) โดยสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักเชื่อว่ามีผลมาจาก 2 ปัจจัย คือ ด้านพันธุกรรม (สารพันธุกรรมที่แตกต่างกัน) และด้านสิ่งแวดล้อม (การสูบบุหรี่ การติดเชื้อ สารเคมี)

การเกิดมะเร็งเป็นขบวนการที่เกิดจากความผิดปกติระดับพันธุกรรม ที่มีการเปลี่ยนแปลงที่มีหลายขั้นตอน โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ oncogene คือ ยีนที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง และ tumor suppressor gene คือ ยีนที่ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง ถ้ายีนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งหรือทั้ง 2 กลุ่ม เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติของกรแบ่งเซลล์ซึ่งโดยความผิดปกติที่พบโดยส่วนใหญ่ oncogene จะมีความผิดปกติชนิดที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอ (amplification) และยีนในกลุ่ม tumor suppressor gene จะมีความผิดปกติชนิดที่มีการขาดหายไปของลำดับดีเอ็นเอ (deletion) มีผลทำให้เกิดความไม่สมดุลในจีโนม เป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิดโรคมะเร็งได้

โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักแบ่งตามระยะของเซลล์มะเร็งได้ 4 ระยะคือ Dukes' A B C และ D โดยอัตราการรอดชีวิตภายหลังจากการผ่าตัด 5 ปี ใน Dukes' A พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 96 สำหรับอัตราการรอดสำหรับ Dukes' D จะเหลือเพียงร้อยละ 5 (Gatta และคณะ, 2003) สำหรับการรักษาโดยส่วนใหญ่ในระยะแรกๆนิยมรักษาด้วยส่องกล้องผ่าตัด ซึ่งเป็นวิธีที่สร้างความเจ็บปวดต่อผู้ป่วยได้มากพอสมควร และมีโอกาสกลับเป็นซ้ำได้ในเวลาต่อมา และยังมีโอกาสที่จะกลายเป็นมะเร็งชนิดที่ลุกลามจนถึงขั้นกล้ำเนื้อของลำไส้ใหญ่และ/หรือกระจายไปตามส่วนต่างๆของร่างกาย ดังนั้นการตรวจสอบวินิจฉัยอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพจะมีผลต่อการตรวจหาระยะและการดำเนินการของโรคได้

จากการศึกษาทาง molecular cytogenetics ด้วยเทคนิค fluorescence in situ hybridization (FISH) ที่เป็นการศึกษาความผิดปกติของยีนหรือตำแหน่งบนโครโมโซม และการศึกษาด้วยเทคนิค comparative genomic hybridization (CGH) ที่เป็นการศึกษาหาความผิดปกติของทั้งจีโนมในชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยส่วนใหญ่พบความผิดปกติตำแหน่งของยีน p53 ดังเช่น Masramon และคณะ (2000) ทำการศึกษาเซลล์โคลนของลำไส้ใหญ่และทวารหนักโดยใช้เทคนิค

G-banding, comparative genome hybridization (CGH) และ whole-chromosome painting (WCP) พบการ translocation ของโครโมโซมคู่ที่ 17 ซึ่งเป็นที่อยู่ของยีน *p53* ต่อมา Kapitanovic และคณะ (2004) พบว่ายีน *APC* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมีการขาดหายไปร้อยละ 30.1 โดยพบในระยะ Dukes' B มากที่สุด ร้อยละ 55.6

เพื่อนำไปสู่การวินิจฉัยโรค การตรวจหาระยะและการดำเนินของโรคได้อย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองได้อย่างรวดเร็ว และใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ได้ในการศึกษาการเกิดและการดำเนินโรคได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อตรวจหาความผิดปกติของยีน *p53* ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความผิดปกติของยีน *p53* กับระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ตรวจหาความผิดปกติเฉพาะตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของยีน *p53* ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal cancer : CRC)

ลำไส้ใหญ่และทวารหนักเป็นอวัยวะในระบบทางเดินอาหาร เนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติบริเวณลำไส้ใหญ่และทวารหนัก เรียกว่า มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal cancer : CRC) มะเร็งชนิดนี้สามารถแพร่กระจายออกไปด้านนอกลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงและอวัยวะอื่นๆ ได้ เมื่อเกิดการแบ่งเซลล์แบบผิดปกติขึ้นแพทย์จะประเมินว่าเป็นก้อนเนื้อเยื่อที่แบ่งเซลล์แบบผิดปกติ (benign tumor) หรือเนื้อร้าย (malignant tumor) โดยการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (biopsy) ไปตรวจทางพยาธิวิทยา ด้วยวิธีฮีสตอล็อกซีที่ตัดเป็นแผ่นบางบนแผ่นแก้ว และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในเนื้อเยื่อมะเร็งจะมีลักษณะที่ผิดปกติเช่น การเรียงตัวไม่สม่ำเสมอ เซลล์มีขนาดใหญ่ รูปร่างของเซลล์จะต่างจากเซลล์ปกติ เซลล์มะเร็งสามารถแพร่กระจายเข้าไปยังเนื้อเยื่อหรืออวัยวะข้างเคียงได้โดยผ่านระบบเลือดหรือระบบน้ำเหลือง เรียกมะเร็งที่แพร่กระจายนี้ว่า metastasis

มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามการถ่ายทอดทางพันธุกรรม คือ

2.1.1 Sporadic colorectal cancer เป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นโดยที่ไม่มีความสัมพันธ์ หรือประวัติการถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการกลายของยีนในตัวผู้ป่วยเอง

2.1.2 Hereditary colorectal cancer เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม ผู้ที่มีความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนักจะมีโอกาสเป็นมะเร็งสูงกว่าคนปกติตั้งแต่แรกเกิด แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.1.2.1 Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: HNPCC เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนักที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมชนิดที่มาตั้งแต่ออกกำเนิดน้อย อัตรการเกิดคิดเป็นร้อยละ 2 ของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักทั้งหมด (Jass และคณะ, 1994)

2.1.2.2 Familial adenomatous polyposis: FAP เป็นมะเร็งชนิดที่พบตั้งแต่ออกกำเนิดจำนวนมาก คิดเป็นปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 1 ของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักทั้งหมด (Campbell และคณะ, 1994)

สมาชิกครอบครัวของคนที่มีประวัติเป็นโรคมะเร็งทั้งชนิด HNPCC และ FAP จะมีการตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมเพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของยีนที่มีความเกี่ยวข้อง สำหรับผู้ที่มีการเปลี่ยนแปลงในยีนนั้นจะได้รับคำแนะนำในการลดความเสี่ยงที่จะเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

2.2 ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

ปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก (Fuchs และคณะ, 1994) มีดังนี้

2.2.1 อายุ โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมากกว่าร้อยละ 90 มีอายุมากกว่า 50 ปี (Fuchs และคณะ, 1994)

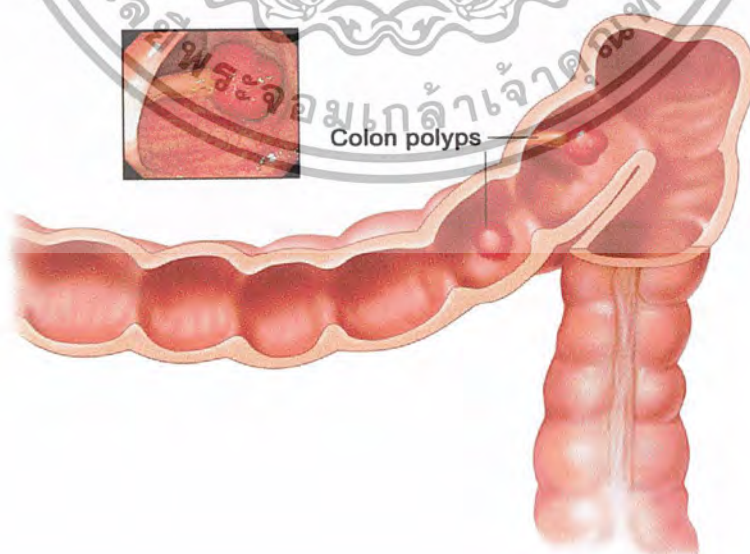
2.2.2 สมาชิกในครอบครัวมีประวัติเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

2.2.3 การมีติ่งเนื้อออกในลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (colorectal polyps) โดยปกติในคนอายุมากกว่า 50 ปีจะมีติ่งเนื้อออกเจริญอยู่ภายในผนังชั้นในของลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ดังภาพที่ 1 ติ่งเนื้อออกโดยส่วนใหญ่ไม่มีคุณสมบัติเป็นมะเร็ง มีเพียงบางลักษณะที่มีคุณสมบัติเป็นมะเร็ง แต่หากพบและผ่าตัดออกก่อนจะช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้

2.2.4 การบริโภคอาหารที่มีไขมัน คอลเลสเตอรอล (cholesterol) และโปรตีนสูง การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ และการไม่ออกกำลังกาย มีส่วนเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรค ในขณะที่การบริโภคอาหารที่มีแคลเซียมสูง ผัก ผลไม้ และอาหารที่มีกากใยสูง มีส่วนช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคได้

2.2.5 การมีประวัติเป็นโรคลำไส้ใหญ่อักเสบเรื้อรัง (chronic ulcerative colitis หรือ Crohn's disease) (Ribeiro และคณะ, 1996)

2.2.6 ผู้ป่วยที่เป็นโรคลำไส้ใหญ่อักเสบที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ (inflammatory bowel disease) มีโอกาสสูงที่จะดำเนินไปเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งความเสี่ยงจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เป็น ความรุนแรงและระดับความผิดปกติของเยื่อลำไส้ (mucosal dysplasia)



ภาพที่ 1 แสดงติ่งเนื้อออก (Polyps) ในลำไส้ใหญ่

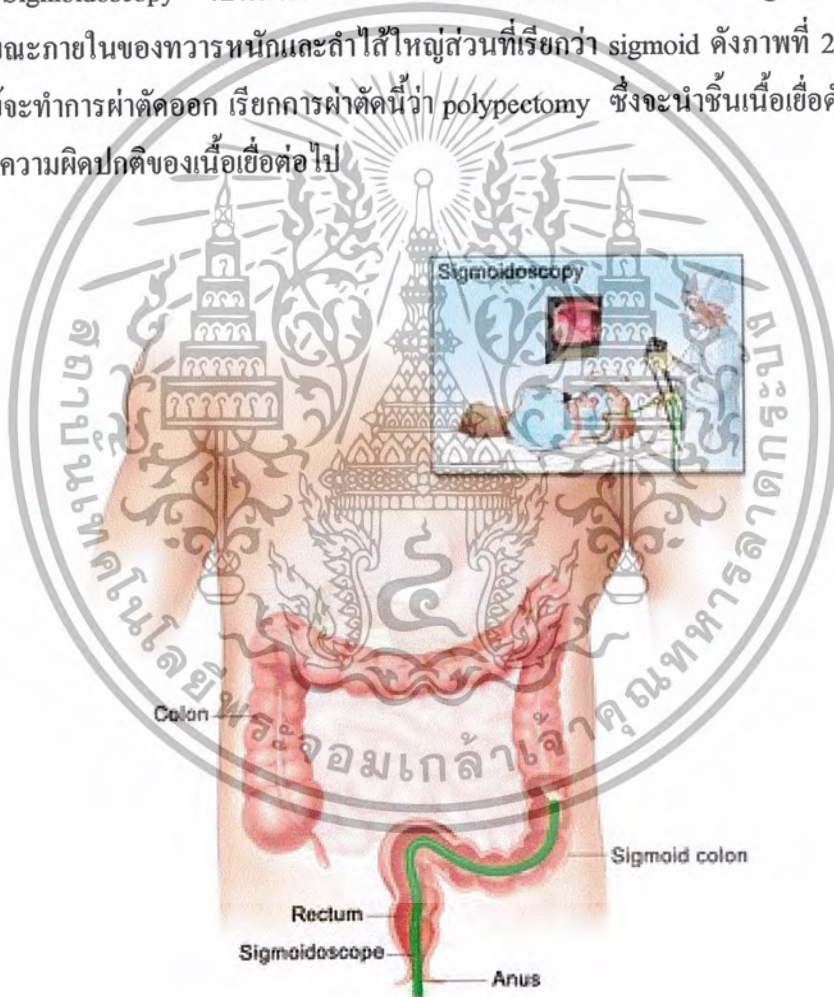
2.3 วิธีการตรวจวินิจฉัยโรค

การตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งก่อนการเกิดอาการจะช่วยให้แพทย์สามารถป้องกันและรักษาได้อย่างทัน่วงที และเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดได้ยาวนานขึ้นได้

การตรวจวินิจฉัยความผิดปกติในลำไส้ใหญ่และทวารหนัก วิธีที่ใช้ในการตรวจหาชนิดนี้ (Levin, 2001)

2.3.1 Fecal occult blood test (FOBT) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณเลือดน้อยๆที่ปนมากับอุจจาระ ในกรณีตรวจพบเลือดจะใช้วิธีอื่นร่วมในการหาแหล่งที่ทำให้เกิดเลือดด้วย

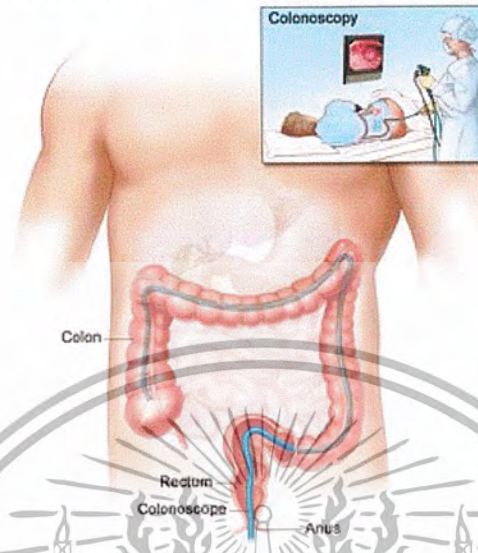
2.3.2 Sigmoidoscopy เป็นการตรวจโดยใช้กล้องขนาดเล็กที่เรียกว่า sigmoidoscope สอดเข้าไปดูลักษณะภายในของทวารหนักและลำไส้ใหญ่ส่วนที่เรียกว่า sigmoid ดังภาพที่ 2 ถ้าพบติ่งเนื้อออกแพทย์จะทำการผ่าตัดออก เรียกการผ่าตัดนี้ว่า polypectomy ซึ่งจะนำชิ้นเนื้อเยื่อดังกล่าวไปตรวจลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อต่อไป



ภาพที่ 2 แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Sigmoidoscope

ที่มา : www.cancer.gov

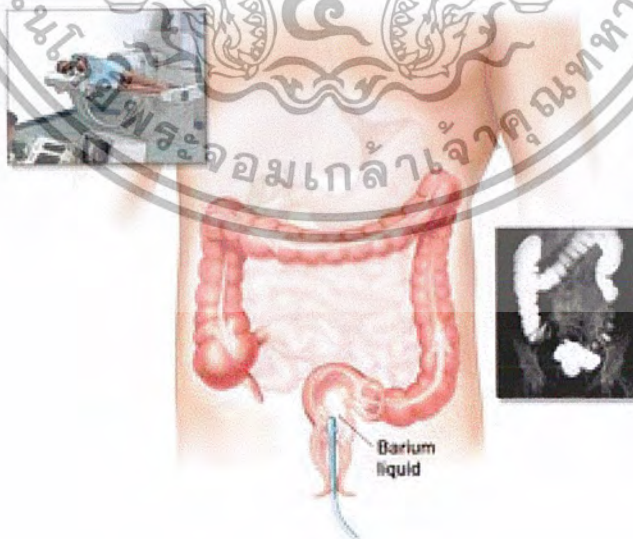
2.3.3 Colonoscopy เป็นการตรวจโดยใช้หลอดแสงแบบยาวที่เรียกว่า colonoscope สอดเข้าไปดูลักษณะของทวารหนักและส่วนของลำไส้ใหญ่ทั้งหมด ดังภาพที่ 3 หากพบติ่งเนื้องอกจะทำการผ่าตัดออกเพื่อนำไปวินิจฉัย ต่อไปเช่นกัน



ภาพที่ 3 แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Colonoscope

ที่มา : www.cancer.gov

2.3.4 Barium enema เป็นการเอ็กซเรย์ลำไส้ใหญ่และทวารหนักพร้อมกับการฉีดสารละลาย barium sulfate เข้าไปในทวารหนัก แล้วทำการเอ็กซเรย์เพื่อศึกษาตำแหน่งของการเกิดโรค ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงการตรวจหาความผิดปกติโดยใช้ Barium enema

ที่มา : www.cancer.gov

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.5 Digital rectal exam (DRE) เป็นการตรวจสอบลำไส้ตรงโดยแพทย์จะใช้นิ้วที่ใส่ถุงมือยางสอดเข้าไปในทวารหนักส่วนล่างเพื่อตรวจหาบริเวณที่ผิดปกติ

2.4 ระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

การแบ่งระยะของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักปัจจุบันที่นิยมมี 3 ระบบ คือ

2.4.1 การจัดจำแนกตาม The American joint committee for cancer staging and end result reporting (AJC) แบ่งระยะตามการแพร่กระจายของโรค ดังนี้

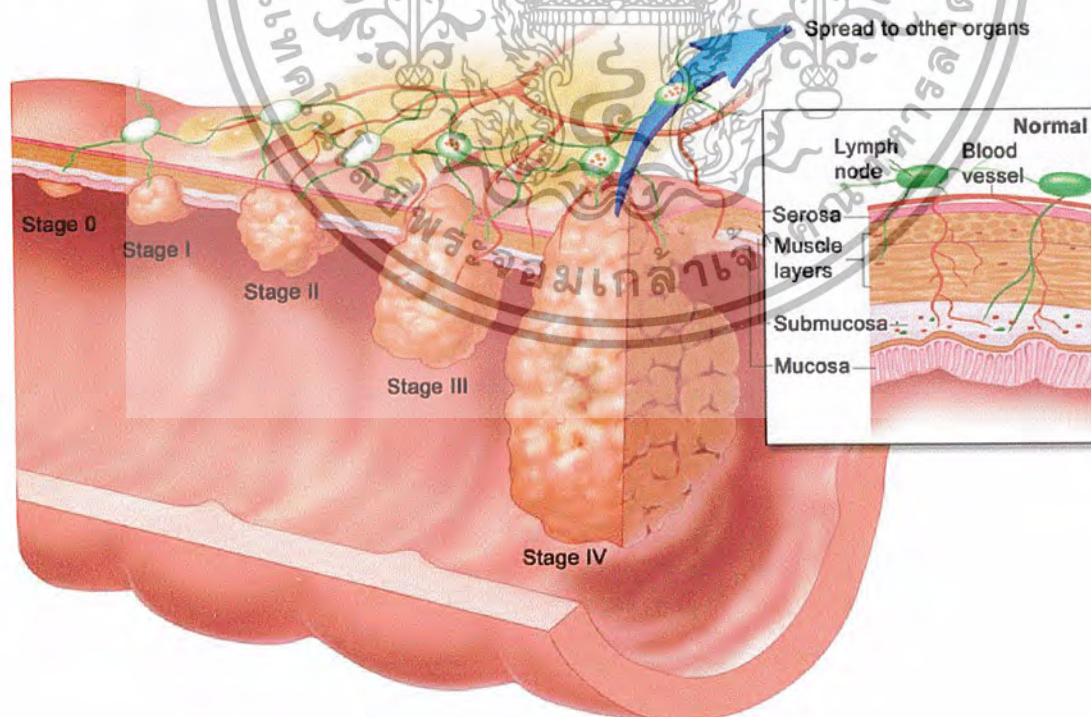
Stage 0 (Carcinoma *in situ*) เซลล์มะเร็งจะพบบริเวณผิวด้านในสุดของลำไส้ใหญ่หรือทวารหนัก ดังภาพที่ 5

Stage I (Dukes' A colon cancer) เซลล์มะเร็งแพร่กระจายเข้าไปในผนังชั้นในของลำไส้ใหญ่หรือทวารหนัก

Stage II (Dukes' B colon cancer) เซลล์มะเร็งแพร่กระจายเข้าไปในเนื้อเยื่อชั้นกลางของลำไส้ใหญ่หรือแพร่กระจายเข้าไปยังเนื้อเยื่อรอบๆลำไส้ใหญ่หรือทวารหนัก

Stage III (Dukes' C colon cancer) เซลล์มะเร็งแพร่กระจายจากเนื้อเยื่อชั้นในสุดของลำไส้ใหญ่ไปสู่เนื้อเยื่อชั้นกลางและกระจายไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่ใกล้เคียง

Stage IV (Dukes' D colon cancer) ระยะนี้เซลล์มะเร็งจะแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองไกลๆ และแพร่ไปยังส่วนอื่นๆของร่างกาย เช่น ตับหรือปอด



ภาพที่ 5 แสดงระยะต่างๆของมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

เอกสารที่มา: www.cancer.gov สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การจัดแนกแบบ Duke (Dukes' classification) คิดค้นโดย Cuthbert Duke (1930) แบ่งระยะตามการแพร่กระจายของโรคเช่นเดียวกับ The American joint committee for cancer staging and end result reporting (AJC) เป็นระยะ Dukes' A, B, C และ D

2.4.3 การจัดจำแนกแบบ TNM (TNM classification) (Sobin and Wittekind, 1997) แบ่งตามการแพร่กระจาย ดังนี้

2.4.3.1 T (Tumor) เป็นสัญลักษณ์บอกถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งบริเวณลำไส้ใหญ่และทวารหนัก แบ่งเป็นระยะได้ดังนี้

T1 เซลล์มะเร็งเริ่มโตและแพร่ไปยังเนื้อเยื่อชั้นในของลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

T2 เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตและแพร่ไปยังชั้นกล้ามเนื้อของลำไส้ใหญ่และทวาร

หนัก

T3 เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตและแพร่ออกจากชั้นกล้ามเนื้อเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นนอกของลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

T4 เซลล์มะเร็งแพร่กระจายออกนอกลำไส้ใหญ่และทวารหนักไปสู่ตับ ปอด และอวัยวะอื่นๆ

2.4.3.2 N (Node) เป็นสัญลักษณ์บอกถึงการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองโดยดูจากปริมาณของต่อมน้ำเหลืองที่โตขึ้นเนื่องจากมีเซลล์มะเร็งเจริญอยู่สามารถแบ่งเป็นระยะต่างๆได้ดังนี้

N0 เป็นระยะที่ยังไม่มีเซลล์มะเร็งแพร่เข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง

N1 มีเซลล์มะเร็งแพร่เข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง 1-3 ต่อมน้ำ

N2 มีเซลล์มะเร็งแพร่เข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองมากกว่า 3 ต่อมน้ำ

2.4.3.3 M (metastasis) เป็นสัญลักษณ์บอกถึงการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆที่อยู่ไกลออกไป แบ่งได้เป็น

M0 เป็นระยะที่ไม่มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ

M1 เป็นระยะที่มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ

ระยะต่างๆของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการดำเนินของโรค และผู้ป่วยจะมีอัตราการรอดชีวิตหลังจากการผ่าตัด 5 ปีเป็นเท่าใด โดยในสหรัฐอเมริกาอัตราการรอดชีวิตหลังจากการผ่าตัด 5 ปีของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก (Gatta และคณะ, 2003) ดังนี้

Stage I มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 96

Stage II มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 87

Stage III มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 55

Stage IV มีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 วิธีการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

การรักษาโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมี 3 วิธี คือ

2.5.1 การผ่าตัด (Surgery) ดึงเนื้องอกขนาดเล็กบริเวณลำไส้ใหญ่หรือทวารหนักส่วนบน ผ่าตัดโดยใช้ colonoscope ช่วย สำหรับมะเร็งที่มีขนาดใหญ่ศัลยแพทย์จะผ่าช่องท้องเพื่อตัดเนื้องอกที่เป็นมะเร็ง และต่อมน้ำเหลืองบริเวณข้างเคียงออก

2.5.2 การบำบัดทางเคมี (Chemotherapy) โดยให้ยาต้านมะเร็งเข้าไปในกระแสเลือดเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็ง การบำบัดทางเคมีอาจใช้ร่วมกับการผ่าตัด เพื่อใช้ในการทำลายเซลล์มะเร็งที่หลงเหลืออยู่หลังการผ่าตัดและใช้ในการป้องกันไม่ให้มะเร็งกลับมาเป็นอีกครั้ง

2.5.3 การบำบัดโดยใช้การฉายรังสี (Radiotherapy) เป็นการให้รังสีพลังงานสูงเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งในบริเวณเฉพาะที่ซึ่งได้กำหนดขอบเขตเอาไว้แล้ว

2.6 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction หรือ PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เป็นเทคนิคใหม่ทางด้านอณูชีววิทยาโมเลกุล เป็นวิธีเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง (in vitro) เนื่องจากยีนแต่ละชนิดจะมีจำนวนน้อยในจีโนม ดังนั้นถ้าจะศึกษายีนใดๆจะต้องมีวิธีเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอชิ้นนั้นให้มากขึ้นเพื่อที่จะมีปริมาณที่พอเพียงในการนำมาทำการทดลองต่างๆได้ วิธีปกติที่ใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการคือ การโคลนนิ่งซึ่งทำได้ยาก มีหลายขั้นตอน และใช้เวลานาน แต่วิธี PCR สามารถทำให้เราศึกษา ยีนต่างๆได้ง่ายขึ้น โดยการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการได้อย่างไม่จำกัดจำนวน (ทวิสต์คิต, 2541)

วิธีการ PCR คิดค้นโดย Kary B. Mullis นักเคมีวิเคราะห์ ชาวอเมริกัน ในปีค.ศ. 1985 โดย PCR มีทฤษฎีคล้ายกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอในเซลล์ (DNA replication) กล่าวคือ เป็นวิธีการที่เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) สร้างดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบโดยการต่อสาย โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (oligonucleotide primer) แต่ขบวนการ PCR อาศัย oligonucleotide primer 2 เส้น ซึ่งแต่ละเส้นจะจับกัน (anneal) กับดีเอ็นเอเส้นตรงข้าม เนื่องจากมีเบสคู่สมกัน (complementary) โดยไพรเมอร์จะหันปลายด้าน 3'-OH ของไพรเมอร์เข้าหากัน ถ้ามีเอนไซม์ DNA Polymerase อยู่ด้วยก็จะเกิดการสร้างดีเอ็นเอขึ้นโดยการต่อปลายจากไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้น ตาม DNA ต้นแบบจนกระทั่งสุดปลายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการสร้างดีเอ็นเอจะทำได้ในทิศทางเดียว คือ จาก 5' ไปยัง 3' ผลที่ได้คือดีเอ็นเอเส้นคู่ใหม่ที่เกิดจากดีเอ็นเอต้นแบบ การสร้างดีเอ็นเอทำซ้ำอีกได้โดยการนำปฏิกิริยามาทำให้อุ่นที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส ก็จะเป็นการแยกดีเอ็นเอเส้นคู่ที่ได้ใหม่ให้เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว ถ้าลดอุณหภูมิลงมาให้เหมาะสม คือ ที่อุณหภูมิซึ่งไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายทั้งเส้นเก่าและเส้นที่สร้างใหม่ จากนั้น DNA polymerase จะสร้างดีเอ็นเอ

เมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอ และการสร้างดีเอ็นเอโดยเอนไซม์ DNA polymerase ในที่สุดจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มเป็นทวีคูณ ถ้าทำแบบนี้ 20 รอบจะได้ดีเอ็นเอจำนวนประมาณ 1 ล้านเท่า (220) นั่นคือเราสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการได้ เอนไซม์ที่ใช้ในการทำ PCR นั้นต้องทนความร้อนได้ดี นั่นคือ Taq polymerase ในอดีตการทำ PCR ใช้อ่างน้ำ 3 เครื่อง ปัจจุบันนี้การทำ PCR ใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถตั้งโปรแกรมการทำงานให้เป็นรอบๆ ได้ การทำ PCR ทำได้โดยการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนเป็นที่เรียบร้อยแล้วซึ่งประกอบด้วย ส่วนประกอบของปฏิกิริยาประกอบไปด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ (primer) dNTP บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีไอออนบวกเช่น Mg^{2+} และเอนไซม์ Taq polymerase

2.7 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็ง

ในการเกิดมะเร็งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

2.7.1 ยีนก่อมะเร็ง (Proto-oncogene) เป็นยีนที่ทำงานโดยการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ยีนกลุ่มนี้จะแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนหยุดแสดงออกเซลล์จะหยุดการแบ่งตัว ดังนั้นหากเกิดการกลายพันธุ์จนยีนแสดงออกมาตลอดเวลา เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด

Oncogene เป็นยีนกลุ่มแรก ๆ ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ยีนนี้พบครั้งแรกในไวรัสก่อมะเร็ง ตัวอย่างของไวรัสพวกนี้คือ Rous sarcoma virus (RSV) เมื่อเข้าไปในเซลล์แล้วจะใช้เอนไซม์ reverse transcriptase สร้างดีเอ็นเอขึ้นจากอาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอนี้เรียกว่า provirus สามารถแทรกตัวเข้ากับดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านแล้วทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งได้ ในธรรมชาติพบ RSV สองกลุ่มคือกลุ่มที่ไม่ทำให้เซลล์เป็นมะเร็งเรียกว่า non acute virus กับกลุ่มที่ทำให้เซลล์เป็นมะเร็งได้เรียกว่า acute transforming virus (Klein และคณะ, 1985) จีโนมของไวรัสพวก acute transforming virus มียีนที่แตกต่างจากพวก non acute virus 1 ยีนที่ทำให้เซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งได้ เรียกว่า viral oncogene หรือ v-oncogene

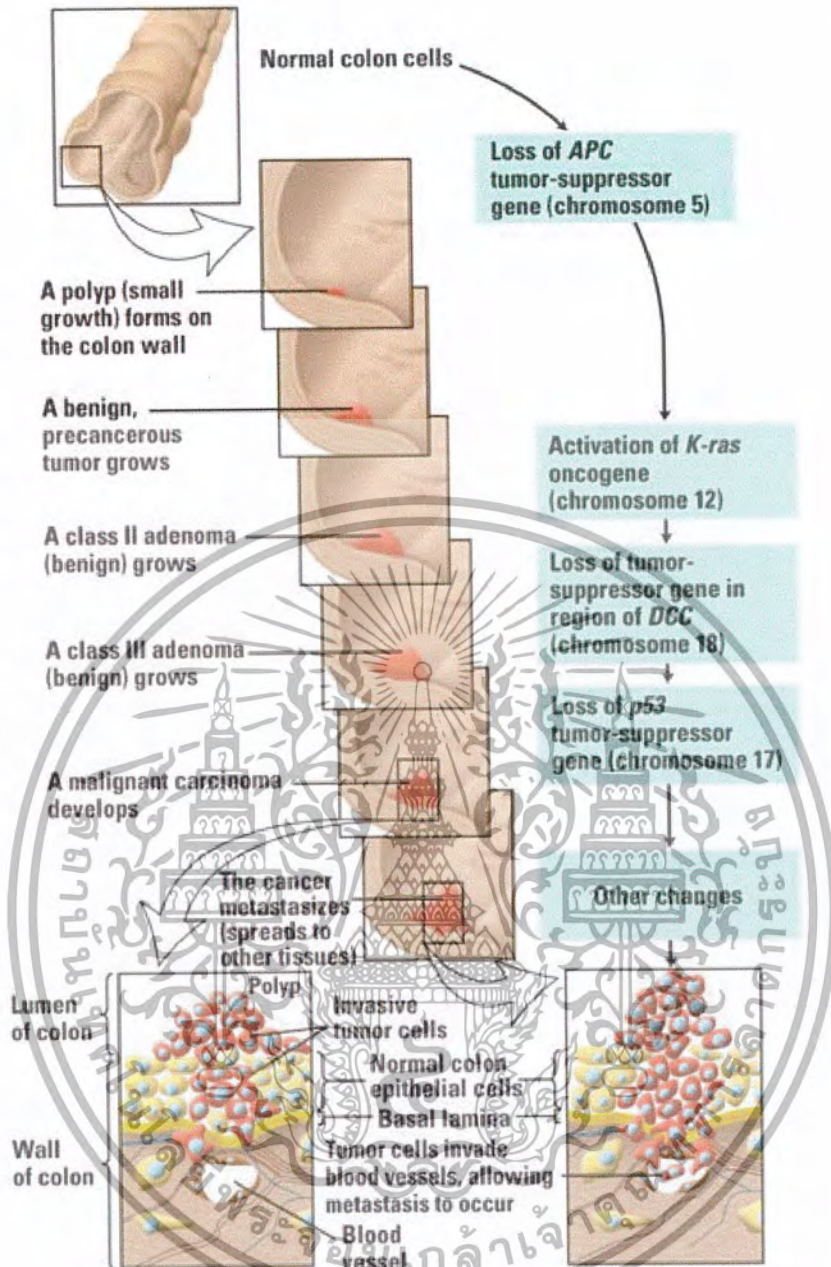
เมื่อศึกษาลึกลงไปพบว่า v-oncogene มีลักษณะคล้ายกับ proto-oncogene มาก มีเพียงบางส่วนที่แตกต่างกันออกไป เชื่อกันว่า v-oncogene นี้มาจาก proto oncogene ซึ่งกลายพันธุ์แล้วไวรัสนำออกจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง proto-oncogene ที่กลายพันธุ์อยู่ในเซลล์แล้วทำให้เซลล์เป็นมะเร็งเรียกว่า cellular oncogene หรือ c-oncogene กลไกการเปลี่ยนจาก proto-oncogene เป็น oncogene นั้นเกิดขึ้นได้หลายแบบ เช่น point mutation translocation overexpression of gene product สืบเนื่องจากการแทรกเข้ามาของไวรัสทำให้เกิดโปรโมเตอร์ใหม่ การแทรกเข้ามาของไวรัสทำให้เกิด enhancer รวมทั้งการเพิ่มจำนวนมาก ๆ ของ proto-oncogene เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 ยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor gene) เป็นยีนที่ทำงานโดยการยับยั้งการแบ่งเซลล์ ยีนกลุ่มนี้มีลักษณะการทำงานที่สำคัญคือ ยีนจะหยุดการแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนทำงานเซลล์จะหยุดการแบ่งตัว เมื่อใดก็ตามที่ยีนกลุ่มนี้สูญเสียหน้าที่ ไม่สามารถแสดงออกได้ เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด ตัวอย่างของยีนในกลุ่มนี้คือ ยีน *p53* โดยยีน *p53* เป็น tumor suppressor gene ยีนหนึ่งซึ่งสร้าง transcription factor จะแสดงออกเมื่อเซลล์ถูกแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งอาจทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายได้ ยีน *p53* จะทำงานโดยหยุดเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่แตกหักเสียหาย ก่อนที่จะปล่อยให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ซึ่งมีการสร้างโครมาทิดใหม่ ในภาวะที่เซลล์ขาด *p53* เซลล์ไม่สามารถหยุดการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายก่อนที่จะเข้าสู่ระยะ S ซึ่งใช้ดีเอ็นเอที่แตกหักเสียหายนั้นเป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอใหม่ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์มากขึ้น ในกรณีที่ดีเอ็นเอแตกหักเสียหายจนไม่อาจซ่อมแซมให้กลับดังเดิมได้ *p53* จะกำหนดให้เซลล์ตาย (apoptosis) (Vogelstein and Kinzler, 1992)

2.8 ขบวนการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

เซลล์มะเร็งมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเซลล์ปกติ คือมีความสามารถแพร่กระจายจากแหล่งกำเนิดไปยังอวัยวะที่อยู่ห่างไกลได้ มะเร็งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ โดยต้องมีการกลายพันธุ์มากกว่า 1 ครั้ง โดยการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้รับความสนใจมากขึ้นเมื่อ Fearon และ Vogelstein (1990) เสนอกลไกการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน (A genetic model for colorectal tumorigenesis) จากการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมในมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักระยะต่างๆ พบว่ามีความผิดปกติที่ยีน 4 ยีน แต่ละยีนควบคุมการเกิดระยะของมะเร็งที่แตกต่างกันดังภาพที่ 6 เริ่มจากการกลายพันธุ์ของยีน *APC* (adenomatous polyposis coli) ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 5 ทำให้เซลล์เยื่อผนังลำไส้ใหญ่แบ่งเซลล์มากกว่าปกติเกิดเป็นก้อนเนื้ออเนกแบบไม่ร้ายแรง (benign adenoma) ต่อมาเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *k-ras* ซึ่งอยู่ที่แขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 12 ก้อนเนื้ออเนกจะเปลี่ยนเป็นแบบที่ร้ายแรงขึ้น และเมื่อมีการสูญเสียการทำงานของยีน *DCC* (deleted in colorectal cancer) ซึ่งอยู่ที่แขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 18 ก้อนเนื้ออเนกจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเนื้ออเนกที่มีผิวยื่นขรุขระของ villi ซึ่งเป็นลักษณะที่ร้ายแรงขึ้นมาอีก จนกระทั่งมีการสูญเสียการทำงานของยีน *p53* บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 17 (Isobe และคณะ, 1986) ซึ่งเป็นยีนควบคุมการเปลี่ยนสถานะ G₁/S transition ของวัฏจักรเซลล์ ก้อนเนื้ออเนกนั้นจึงกลายเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก



ภาพที่ 6 แสดงขบวนการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน (A genetic model for colorectal tumorigenesis)

ที่มา : Fearon และคณะ (1990)

Campo และคณะ (1991) รายงานว่ามีการขาดหายไปของยีน *p53* คิดเป็นร้อยละ 83 เมื่อใช้เทคนิค PCR และ RFLP ศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก นอกจากนี้ยังรายงานความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *p53* กับระยะของมะเร็งด้วย โดยพบความผิดปกติ ในระยะ carcinomas เป็นร้อยละ 67 และในระยะ adenomas พบเพียงร้อยละ 11

Greenwald และคณะ (1992) รายงานว่าในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก มีการขาดหายไปของยีน *p53*, *APC* และ *Rb* (Retinoblastoma) คิดเป็นร้อยละ 47, 33 และ 33 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Iacopetta และคณะ (1994) ใช้เทคนิค Southern blot และ PCR ศึกษาพบการขาดหายไปของยีน *APC*, *p53* และ *DCC* พบว่าเท่ากับร้อยละ 17, 76 และ 34 ตามลำดับ โดยมะเร็งระยะ Dukes' B และ Dukes' C มีความผิดปกติไม่มีความแตกต่างกัน

Campo และคณะ (1994) ได้ทำการการศึกษาความผิดปกติในตำแหน่งของยีน *p53* ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักด้วยเทคนิค PCR และ RFLP พบว่ามีการขาดหายไปของยีน *p53* คิดเป็นร้อยละ 63 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักทั้งหมด โดยระยะของโรคมี่ความสัมพันธ์กับความผิดปกติ โดยในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก โดยใน stage III พบการขาดหายไปของยีนมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 46

Lui และคณะ (1996) รายงานการขาดหายไปของยีน *APC* และ *DCC* คิดเป็นร้อยละ 28 และ 55.3 ตามลำดับ ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักโดยใช้เทคนิค PCR และ RFLP พบว่าในมะเร็งระยะรุนแรงจะมีเปอร์เซ็นต์การขาดหายไปของยีน *DCC* มากกว่าในมะเร็งระยะรุนแรงน้อยกว่า

Zauber และคณะ (1999) ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *k-ras* และการขาดหายไปของยีน *APC* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักระยะ Carcinoma in situ โดยใช้เทคนิค PCR พบว่า ไม่มีการขาดหายไปของยีน *APC* และมีการกลายพันธุ์ของยีน *k-ras* คิดเป็นร้อยละ 22

Zauber และคณะ (2004) ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *k-ras* การขาดหายไปของยีน *APC* และ *DCC* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะ Dukes' B พบว่าในระยะนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ศึกษา

Kapitanovic และคณะ (2004) พบว่ายีน *APC* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่มีการขาดหายไปร้อยละ 30.1 โดยพบในระยะ Dukes' B มากที่สุด ร้อยละ 55.6

Ko และคณะ (1999) พบการขาดหายไปของยีน *APC* และ *DCC* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักในช่องอก คิดเป็นร้อยละ 31 และร้อยละ 44

สำหรับการศึกษายีน *p53* ในมะเร็งชนิดอื่น ๆ นั้น Fujimoto และคณะ (1992) พบว่าความผิดปกติของยีน *p53* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่จะเกิดในระยะลุกลามและระยะที่รุนแรง ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Sidransky และคณะ (1991) และ Oumi และคณะ (1990)

ต่อมา Uchida และคณะ (1995) ศึกษาการขาดหายไปของยีน *p53* และการสูญบุหรืต่อการกลายพันธุ์ของยีน *p53* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยใช้เทคนิค RFLP และ PCR-SSCP โดยเทคนิค RFLP พบว่าการขาดหายไปของยีน *p53* คิดเป็นร้อยละ 47.6 และในเทคนิค PCR-SSCP พบยีน *p53* มีความผิดปกติคิดเป็นร้อยละ 46.5

Miyamoto และคณะ (1996) ศึกษาการขาดหายไปของยีน *p53*, *DCC* และ *APC* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยเทคนิค PCR และ RFLP พบว่า มีการขาดหายไปของยีน *p53*, *DCC*

และ APC คิดเป็นร้อยละ 38, 36 และ 6 ตามลำดับ โดยส่วนมากการขาดหายไปของยีนจะพบใน มะเร็งเกร็ดรุนแรง

Kim และคณะ (1997) ศึกษาการขาดหายไปของยีน *p53* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูก พบ การขาดหายไปร้อยละ 5.5

An และคณะ (2002) รายงานการขาดหายไปของยีน *p53* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดคิดเป็น ร้อยละ 65

Masramon และคณะ (2000) ทำการศึกษาเซลล์ไลน์ของลำไส้ใหญ่โดยใช้เทคนิค G-banding Comparative Genome Hybridization (CGH) และ Whole-Chromosome Painting (WCP) พบการ translocation ของโครโมโซมคู่ที่ 17 ซึ่งเป็นที่อยู่ของยีน *p53*



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin

- 3.1.1.1 หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.1.2 Buffer T1
- 3.1.1.3 สารละลาย Proteinase K
- 3.1.1.4 Buffer B3
- 3.1.1.5 Ethanol
- 3.1.1.6 Nucleospin tissue column
- 3.1.1.7 Buffer BW
- 3.1.1.8 Buffer B5
- 3.1.1.9 Buffer BE
- 3.1.1.10 งานเพาะเชื้อ
- 3.1.1.11 ไบมีคโคโน
- 3.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
 - 3.1.2.1 น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
 - 3.1.2.2 10X PCR Buffer (ของ Invitrogen)
 - 3.1.2.3 แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ (ของ Invitrogen)
 - 3.1.2.4 Primer Forward ความเข้มข้น 20 พิโคโมล/ ไมโครลิตร (ของ Invitrogen)
 - 3.1.2.5 Primer Reverse ความเข้มข้น 20 พิโคโมล/ ไมโครลิตร (ของ Invitrogen)
 - 3.1.2.6 dNTP ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ (ของ Invitrogen)
 - 3.1.2.7 เอนไซม์ Tag DNA polymerase ความเข้มข้น 2 U/ μ l (ของ Invitrogen)
 - 3.1.2.8 ดีเอ็นเอเป้าหมาย
 - 3.1.2.9 หลอด PCR
 - 3.1.2.10 หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

ไพรเมอร์ *p53* ที่ใช้ตัดแปลงมาจากรายงานของ Miyamoto, H. และคณะ (1996) ได้

ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 235 คู่เบส มีลำดับเบสดังนี้

Forward 5' GCTGTCCCCGGACGATATTG 3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reverse 5' AATGCAAGAAGCCCAGACGG 3'

3.1.3 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.1.3.1 สารละลาย TBE

3.1.3.2 สีย้อม

3.1.3.3 ethidium bromide

3.1.3.4 agarose gel

3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ได้รับความอนุเคราะห์จากวิทยาลัยแพทยศาสตร์ และวชิรพยาบาล ดังข้อมูลในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างเนื้อเยื่อ อายุ เพศ และระยะของ โรคของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	อายุ (ปี)	เพศ	ระยะ
1	57	ชาย	Dukes' B
2	64	ชาย	Dukes' B
3	48	ชาย	Dukes' B
4	62	ชาย	Dukes' B
5	82	หญิง	Dukes' B
6	59	หญิง	Dukes' C
7	60	ชาย	Dukes' B
8	66	ชาย	Dukes' B
9	65	หญิง	Dukes' C
10	63	ชาย	Dukes' B
11	51	ชาย	Dukes' C
12	35	ชาย	Dukes' B

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin มีขั้นตอนดังนี้

1. ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อประมาณ 25 มิลลิกรัมโดยใบมีดโกนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
2. หั่นเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปใส่ลงในหลอด microcentrifuge
3. เติม Buffer T1 180 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย proteinase K ทำการผสมโดยใช้เครื่อง Vortex
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน
5. ทำการผสมโดยการ vortex แล้วเติม Buffer B3 200 ไมโครลิตร
6. ทำการผสมโดยการ vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
7. นำไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 / 5 นาที
8. ย้ายส่วนใส (supernatant) ไปใส่หลอด microcentrifuge ใหม่
9. เติม ethanol ความเข้มข้นประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ 210 ไมโครลิตร
10. ทำการผสมให้เข้ากัน
11. ย้ายไปใส่ Nucleospin tissue column
12. ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 / 1 นาที
13. เติม Buffer BW 500 ไมโครลิตร
14. ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 / 1 นาที
15. เติม Buffer B5 600 ไมโครลิตร
16. ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 / 1 นาที
17. เทส่วนที่อยู่ด้านล่าง columnทิ้ง
18. ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 / 1 นาที
19. ย้าย Nucleospin tissue column ด้านบนที่มี membrane จับกับดีเอ็นเอไปวางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิตร
20. เติม Buffer BE ที่บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที
21. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11000 / 1 นาที ส่วนใสที่อยู่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิตร คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.3.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอ ตรวจสอบได้ 2 วิธี คือ การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหา

ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และการทำอิลคโตรโฟรีซิส

3.3.2.1 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจางและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 260 กับ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยที่ 260 นาโนเมตรจะวัดดีเอ็นเอ และ 280 นาโนเมตรจะวัดโปรตีน ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอหาได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)} = A \times 50 (\text{ไมโครกรัม/มิลลิลิตร}) \times B$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

B = ค่าการเจือจาง(เท่า)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ดูได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280

ค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่างที่ 1.65-1.85

ในกรณี ค่าที่ได้มากกว่า 1.85 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน และ

ค่าที่ได้น้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือสารละลายฟีนอลเจือปนอยู่

3.3.2.2 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล เพื่อตรวจสอบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดมาได้มีดีเอ็นเอตามที่เรากำลังต้องการหรือไม่ โดยเทียบจากแถบมาตรฐานที่ทราบขนาดของดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดโดยใช้กระแสไฟฟ้า แยกขนาดบนอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ นำไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต มีขั้นตอนต่างๆดังนี้

1. เตรียมเจล โดยซึ่งอะกาโรส ให้ความเข้มข้นของเจลเท่ากับร้อยละ 1 ละลายในสารละลายที่บีบีพีเฟอร์ ใส่ในขวดคูเรนหรือพลาสติก เขย่าให้เข้ากัน
2. ปิดฝาอย่าให้แน่นนำไปให้ความร้อนโดยใช้ไมโครเวฟประมาณ 2 นาที ให้อะกาโรสละลายเป็นสารละลายใส
3. ปลอ่ยทิ้งไว้ให้เย็น ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส
4. เทลงในถาดใส่เจลที่เตรียมไว้ตามขนาดที่เราต้องการ ควรมีพื้นที่ผิวหน้าประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร เพื่อป้องกันเจลหักขณะทำการทดลอง
5. เสียบหัวลงไป ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ประมาณ 15 นาที
6. เอาหัวออก นำวุ้นไปใส่ในอ่างที่ใช้สำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส
7. เทสารละลาย TBE buffer ลงไปให้ท่วมเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร
8. เตรียมหยอดดีเอ็นเอที่ต้องการลงในหลุมในเจล โดยทำการหยดน้ำกลั่นและดี ลง

บนแผ่นพาราฟิล์ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ดูดีเอ็นเอมาผสมกับน้ำกลั่นและสีที่อยู่บนพาราฟิล์ม ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน
10. หยดลงในหลุมตามเลนที่เรากำหนดให้ครบ
11. ต่อสายขั้วบวกและลบ แล้วเปิดเครื่อง โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที

โดยให้สีวิ่งไปประมาณร้อยละ 80ของความยาวของเจล

3.3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาอุกโช-
โพลีเมอเรสโดยสภาวะที่สำคัญมีดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (Template concentration)

ความเข้มข้นของแมกนีเซียม (Magnesium concentration)

อุณหภูมิในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (Primer annealing)

จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Cycle number)

การทดลองนี้เริ่มหาสภาวะที่เหมาะสม โดยเริ่มจาก

1. การหาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 100 200 และ 300 นาโนกรัม ตามลำดับ
2. การหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสม ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่เหมาะสมเท่ากับ 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ
3. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่อุณหภูมิ 50 52 และ 54 องศาเซลเซียส ตามลำดับ
4. การหาจำนวนรอบที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่จำนวน 30 และ 35 รอบตามลำดับ

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์

ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ในสภาวะต่างๆ คือ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้นของแมกนีเซียม ระดับอุณหภูมิของการจับกันของไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอเป้าหมาย และจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

4.1.1 ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ได้ทำการศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ในระดับ 100 200 และ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าชิ้นดีเอ็นเอขนาด 235 คู่เบส (base pair) มีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอต่างๆ กัน และเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดอื่น ดังแสดงในภาพที่ 7 ช่องที่ 1 และ ช่องที่ 2 คือผลิตภัณฑ์การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 235 คู่เบสที่ชัดเจน ช่องที่ 3 และช่องที่ 4 คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เมื่อใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และช่องที่ 5 และช่องที่ 6 คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรที่ไม่ปรากฏดีเอ็นเอขนาด 235 คู่เบส ส่วน M คือคัมบังขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ จากรูปจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เมื่อใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรให้ผลิตภัณฑ์มากที่สุด ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของดีเอ็นเอเป้าหมายคือ 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จึงใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 7 แสดงชั้นดีเอ็นเอขนาด 235 คู่เบสในสภาวะที่มีปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในระดับ 100 200 และ 300 นาโนกรัม

4.1.2 ความเข้มข้นของแมกนีเซียม

ได้ทำการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นของแมกนีเซียม ในการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส ในระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียม ที่ 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ พบว่าแถบของดีเอ็นเอขนาด 235 คู่เบส มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจง และความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น ที่ 10 ดังแสดงในภาพที่ 8 เลขที่ 1 2 และ 3 คือผลิตภัณฑ์การทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียม 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์ ส่วน M คือ

ตัวอย่างชิ้นส่วนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จากรูปจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรสที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียม 10 มิลลิโมลาร์ มีผลิตภัณฑ์มากที่สุด มีแถบดีเอ็นเอที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือนำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเพาะเจาะจง และความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคือ 10 มิลลิโมลาร์ จึงใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาขั้นต่อไป

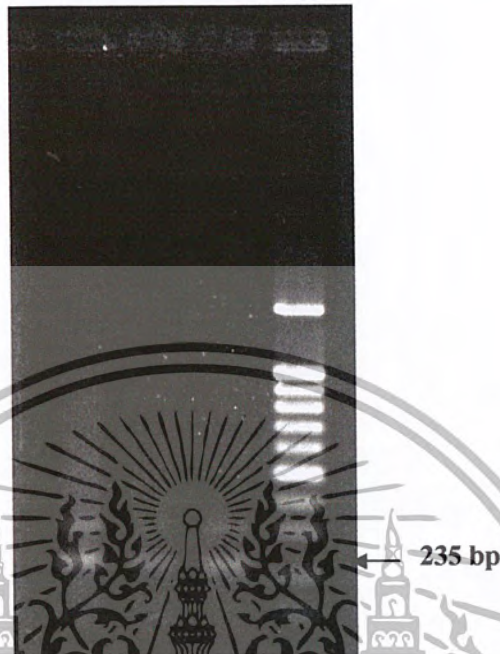


ภาพที่ 8 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมที่ 5 10 และ 15 มิลลิโมลาร์

4.1.3 อุณหภูมิในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย

ได้ทำการทดลองสถานะของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับกันของไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 50 52 และ 54 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 9 โดยเลนที่ 1 2 และ 3 คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้อุณหภูมิในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 50 54 และ 52 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วน M คือ marker ชนิด 100 คู่เบส (base pair; bp) ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในขนาดของดีเอ็นเอที่มีความยาว 235 คู่เบส ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียสมีผลิตภัณฑ์และมีความจำเพาะมากที่สุด ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมินี้ในการศึกษาขั้นต่อไป

52 องศาเซลเซียส
54 องศาเซลเซียส
50 องศาเซลเซียส
1 2 3 M



ภาพที่ 9 อุณหภูมิในการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ 50 52 และ 54 องศาเซลเซียส

4.1.4 จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของจำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ 28 30 และ 35 รอบ พบว่าจำนวนรอบที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสชัดเจน และมีความจำเพาะคือที่ 30 รอบ ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยเลนที่ 1 2 และ 3 คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสเมื่อใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 28 30 และ 35 รอบ ตามลำดับ ส่วน M คือ marker ชนิด 100 คู่เบส (base pair) ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ในขนาดของดีเอ็นเอที่มีความยาว 235 คู่เบส จำนวนรอบที่ 30 รอบ มีผลิตภัณฑ์และมีความจำเพาะมากที่สุด ดังนั้นจึงใช้จำนวนรอบนี้ในการศึกษาขั้นต่อไป

28 รอบ
1

30 รอบ
2

35 รอบ
3

M



ภาพที่ 10 จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ 28 30 และ 35 รอบ

3.1.3 สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการทำการปฏิบัติการลูกโซ่-โพลีเมอเรสได้ดังนี้

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	เวลา 3 นาที
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส	เวลา 30 วินาที
	อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส	เวลา 30 วินาที
	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เวลา 1 นาที 30 วินาที
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	เวลา 5 นาที

4.2 การวิเคราะห์ผลของชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก

ได้ทำการวิเคราะห์ผลของชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาวะที่เหมาะสม ในตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงผลของการขาดหายไปของอัลลีลโคอัลลีลหนึ่งของยีน *p53* ในชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก

จากภาพที่ 11 แสดงผลของการขาดหายไปของอัลลีลโคอัลลีลหนึ่งของยีน *p53* ในชิ้นเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก โดยแสดงรายละเอียดในช่อง ดังนี้

ในช่อง M เป็นตัวบ่งชี้ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ขนาดระยะห่างเท่ากับ 100 คู่เบส

ในช่องที่ 1 เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อน (contaminate control)

ในช่องที่ 2 ผลึกพันซ์ขนาด 235 คู่เบสของตัวอย่างดีเอ็นเอของคนปกติ

ในช่องที่ 3 ผลึกพันซ์ขนาด 235 คู่เบสจากชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ใหญ่และทวาร

หน้า ส่วนที่ปกคิของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก คนที่ 6

ในช่องที่ 4 ผลัดกันขนาด 235 คู่เบสจากจีนเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ใหญ่และทวาร
หน้า ส่วนที่เป็นมะเร็งของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก คนที่ 6

ในช่องที่ 5 ผลัดกันขนาด 235 คู่เบสจากจีนเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ใหญ่และทวาร
หน้า ส่วนที่ปกคิของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก คนที่ 2

ในช่องที่ 6 ผลัดกันขนาด 235 คู่เบสจากจีนเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ใหญ่และทวาร
หน้า ส่วนที่เป็นมะเร็งของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนัก คนที่ 2

ซึ่งผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสตัวอย่างทั้ง 12 ราย แสดงในตารางที่ 2

3.1.4 ตารางที่ 2 แสดงผลการทดลองที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
ของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจำนวน 12 ราย

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ	เพศ	ระยะ	ผล
1	ชาย	Dukes' B	-
2	ชาย	Dukes' B	+
3	ชาย	Dukes' C	+
4	ชาย	Dukes' B	-
5	หญิง	Dukes' B	-
6	หญิง	Dukes' C	-
7	ชาย	Dukes' B	-
8	ชาย	Dukes' B	-
9	หญิง	Dukes' C	+
10	ชาย	Dukes' B	-
11	ชาย	Dukes' B	-
12	ชาย	Dukes' B	+

หมายเหตุ

- คือ ไม่มีการขาดหายไปของอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งของยีน *p53*
- + คือ มีการขาดหายไปของอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งของยีน *p53*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกรณีแบ่งตามระยะของโรคในผู้ป่วยจำนวน 12 ราย พบว่าระยะ Dukes' B มีความผิดปกติ 2 รายจากจำนวนทั้งหมด 9 ราย และ Dukes' C แสดงความผิดปกติจำนวน 2 รายจากจำนวนทั้งหมด 3 ราย ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนตัวอย่างที่มีการขาดหายไปของอัลลีลได้อัลลีลหนึ่งของยีน *p53*

ระยะ	จำนวนตัวอย่าง (ราย)	จำนวนตัวอย่างที่แสดงการขาดหายไป ของอัลลีลของยีน <i>p53</i> (ร้อยละ)
Dukes' B	9	22.22 (2/9)
Dukes' C	3	66.67 (2/3)
รวม	12	33.33 (4/12)

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการขาดหายไปของอัลลีลได้อัลลีลหนึ่งของยีน *p53* ในเนื้อเยื่อโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจำนวน 12 รายแบ่งเป็นผู้ป่วยเพศชาย 9 ราย เพศหญิง 3 ราย จากผลที่ได้พบว่ามี การขาดหายไปของยีน *p53* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักจำนวน 4 ราย จากทั้งหมด 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.33 ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดโดยพบการขาดหายไปของอัลลีลได้อัลลีลหนึ่งของยีน *p53* ในผู้ป่วยระยะ Dukes' B จำนวน 2 ราย จากผู้ป่วยในระยะนี้ทั้งหมด 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.22 และพบการขาดหายไปของอัลลีลได้อัลลีลหนึ่งของยีน *p53* ในผู้ป่วยระยะ Dukes' C จำนวน 2 ราย จากผู้ป่วยในระยะนี้ทั้งหมด 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.67 สอดคล้องกับรายงานของ Campo และคณะ (1994) ที่ทำการศึกษาความผิดปกติของตำแหน่งยีน *p53* ในเนื้อเยื่อมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักพบว่ามี การขาดหายไปของยีน *p53* คิดเป็นร้อยละ 63 ของผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักทั้งหมด โดยใน stage III (Dukes' C) พบการขาดหายไปของยีนมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 46

ในการศึกษาความผิดปกติของตำแหน่งยีน *p53* ในเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดอื่นๆ ให้ผลที่สอดคล้องเช่นเดียวกัน ดังรายงานของ Fujimoto และคณะ (1992) ซึ่งพบว่ามี ความผิดปกติของยีน *p53* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่จะเกิดในระยะลุกลามและระยะรุนแรง ต่อมา Miyamoto และคณะ (1996) พบว่ามี การขาดหายไปของยีน *p53* ในผู้ป่วยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะคิดเป็นร้อยละ 38 โดยการขาดหายไปของยีนจะพบในมะเร็งในระยะที่รุนแรง ปี ค.ศ. 2000 Masramon และคณะ ทำการศึกษาเซลล์โคลนของลำไส้ใหญ่โดยใช้เทคนิค G-banding, comparative genome hybridization (CGH) และ whole-chromosome painting (WCP) พบการ translocation ของโครโมโซมคู่ที่ 17 ซึ่งเป็นที่อยู่ของยีน *p53*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษา tumor suppressor gene ที่สอดคล้องกับการขาดหายไปของยีน *p53* ตามรายงานของ Lui และคณะ (1996) พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักมีการขาดหายไปของยีน *APC* และ *DCC* คิดเป็นร้อยละ 28 และ 55.3 ตามลำดับ โดยในมะเร็งระยะรุนแรงจะมีโอกาสการขาดหายไปของยีน *DCC* มากกว่าในมะเร็งระยะรุนแรงน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ไม่เป็นไปตามรายงานของ Iacopetta และคณะ (1994) ซึ่งศึกษาพบการขาดหายไปของยีน *p53* สูงเท่ากับร้อยละ 76 โดยเมื่อเปรียบเทียบความผิดปกติในระยะต่างๆพบว่ามะเร็งระยะ Dukes' B และ Dukes' C ความผิดปกติของตำแหน่งยีน *p53* ไม่มีความแตกต่างกัน



บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาโครงการพิเศษนี้ พบว่าการขาดหายไปของอัลลีลไดอัลลีลหนึ่งในตำแหน่งของยีน *p53* มีความเกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ซึ่งในผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ และทวารหนักที่อยู่ในระยะที่รุนแรงกว่า จะมีโอกาสพบความผิดปกติชนิดการขาดหายไปของยีนส่วนดีเอ็นเอมากกว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักที่อยู่ในระยะที่รุนแรงน้อยกว่า ในการขาดหายไปของ *p53* นั้นสามารถตรวจสอบผู้ป่วยโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้ตั้งแต่ในระยะแรก ซึ่งจะทำให้มีอัตราการรอดชีวิตสูง ดังนั้นการขาดหายไปของอัลลีลไดอัลลีลหนึ่งของ *p53* นี้สามารถนำมาพยากรณ์ความเสี่ยงที่จะมีโอกาสในการป่วยเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักได้เพื่อที่จะสามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและสามารถดำเนินการรักษาโรคได้อย่างถูกต้อง และทันท่วงที แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาดูการศึกษานี้ในหลายๆตำแหน่ง ของยีนนี้ และในหลายๆยีน เนื่องจากการเกิดมะเร็งเป็นการกลายพันธุ์ที่มีหลายขั้นตอน (multistep)

ข้อเสนอแนะ

- 5.1 ตัวอย่างควรมากกว่านี้ ในการวิเคราะห์เพื่อความน่าเชื่อถือของข้อมูล
- 5.2 ควรทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดเจาะเฉพาะ (restriction fragment length polymorphism; RFLP) ด้วย เพื่อวิเคราะห์ผลได้จำเพาะเจาะจงมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์. 2541. อนุชีวะวิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด.
- สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2536. สถิติโรคมะเร็งที่พบในประเทศไทยประจำปี พ.ศ. 2536. กรุงเทพฯ.
- หน่วยศัลยกรรมลำไส้ใหญ่และทวารหนัก. 2005. มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก ฉบับประชาชน. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ราชวิทยาลัย ศัลยแพทย์แห่งประเทศไทย.
- An, Q.; Liub, Y.; Gaoa, Y.; Huang, J.; Fonga, X.; Liua, L.; Zhanga, D.; Zhanga, J. and Chenga, S. 2002. Deletion of tumor suppressor genes in Chinese non-small cell lung cancer. *Cancer Letters*. 184: 189–195.
- Campbell, W.J.; Spence, R.A.J. and Parks, T.G. 1994. Familial adenomatous polyposis. *Br J Surg*. 81: 1722-33.
- Campo, E.; Calle-Martin, O.; Miquel, R.; Palacin, A.; Romero, M.; Fabregat, V.; Vives, J.; Cardesa, A. and Yague, J. 1991. Loss of heterozygosity of *p53* gene and *p53* protein expression in human colorectal cancer. *Cancer research*. 51: 4436-4442.
- Campo, E.; Miquel, R.; Jares, P.; Bosch, F.; Juan, M.; Leone, A.; Vives, J.; Cardesa, A. and Yague, J. 1994. Pronostic significance of Loss of heterozygosity of *Nm23-H1* and *p53* gene in human colorectal cacinoma. *Cancer*. 73: 2913-2921.
- Dukes, C.E. 1930. The spread of cancer of the rectum. *Br J Surg*. 12: 643-648
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61: 759-767.
- Fuchs, C.S.; Gionvannucci, E.L.; Colditz, G.A.; et al. 1994. A prospective study of family history and risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 331: 1669-1674.
- Fujimoto, K.; Yamada, Y.; Okajima, E.; Kakizoe, T.; Sasaki, H.; Sugimura, T. and Terada, M. 1992. Frequent association of *p53* gene mutation in invasive bladder cancer. *Cancer research*. 52: 1393-1398.
- Gatta, G.; Ciccolallo, L.; Capocaccia, R.; Coleman, M.P.; Hakulinen, T.; Moller, H.;

- Berrino, F. and EURO CARE Working Group. 2003. Differences in colorectal cancer survival between European and US populations: the importance of sub-site and morphology. *Eur J Cancer*. 39(15): 2214-22.
- Gentile, M.; Bergman, M.; Jungstroem, B.; Olsen, K.E.; Soderkvist, P. and Wingren, S. 1999. *p53* and Survival in Early Onset Breast Cancer: Analysis of Gene Mutations, Loss of Heterozygosity and Protein Accumulation. *European Journal of Cancer*. 35(8): 1202-1207.
- Greenwald, B.D.; Harpaz, N.; Yin, J.; Huang, Y.; Tong, Y.; Brown, V.L.; McDaniel, T.; Resau, J.H. and Meltzer, S.J. 1992. Loss of heterozygosity affecting the *p53*, *Rb*, *mcc/apc* tumor suppressor gene of dysplastic and cancerous ulcerative colitis. *Cancer research*. 52: 741-745.
- Iacopetta B, Di Grandi S, Dix B, Haig C, Soong R & House A (1994). Loss of heterozygosity of tumour suppressor gene loci in human colorectal carcinoma. *European Journal of Cancer*, 30A: 664-670.
- Isobe, M.; Emanuel, B.S.; Givol, D.; Oren, M. and Croce, C.M. 1986. Localization of gene for human *p53* tumour antigen to band 17p13. *Nature*. 320: 84-85.
- Jass, J.R.; Smyrk, T.C.; Stewart, S.M.; et al. 1994. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res*. 14: 1631-5.
- Kapitanovic, S.; Cacev, T.; Radosevic, S.; Spaventic, S.; Spaventic, R. and Pavelic, K. 2004. APC gene loss of heterozygosity, mutations, E1317Q, and I1307K germ-line variants in sporadic colon cancer in Croatia. *Experimental and Molecular Pathology*. 77: 193–200.
- Kim, J.W.; Lee, C.G.; Han, S.M.; Kim, K.S.; Kim, J.O.; Lee, J.M.; Kim, K. and Namkoong, S.E. 1997. Loss of Heterozygosity of the Retinoblastoma and *p53* Genes in Primary Cervical Carcinomas with Human Papillomavirus Infection. *Gynecology Oncology*. 67: 215–221.
- Klein, G. and Klein, E. 1985. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature*. 315: 190-195.
- Ko, J.M.; Cheung, M.H.; Kwan, M.W.; Wong, C.M.; Lau, K.W.; Tang, C.M. and Lung, M.L. 1999. Genomic instability and alterations in *Apc*, *Mcc* and *Dcc* in Hong Kong patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 84(4): 404-9.

- Levin, B. 2001. Overview of colorectal cancer screening in the United States. *Journal of Psychological Oncology*. 19:9–19.
- Lui, Y.; Fang, D. and Lu, R. 1996. A study on the loss of heterozygosity at the *APC/MCC* and *DCC* genetic loci in colorectal cancers. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 35: 439-443.
- Masramon, L.; Ribas, M.; Cifuentes, P.; Arribas, R.; García, F.; Egozcue, J.; Peinado, M.A. and Miro, R. 2000. Cytogenetic Characterization of Two Colon Cell Lines by Using Conventional G-Banding, Comparative Genomic Hybridization, and Whole Chromosome Painting. *Cancer Genet Cytogenet*. 121: 17–21.
- Miyamoto, H.; Shuin, T.; Ikeda, I.; Hosaka, M. and Kubota, Y. 1996. Loss of heterozygosity at the *p53*, *RB*, *DCC* and *APC* tumor suppressor gene loci in human bladder cancer. *Journal of Urology*. 155: 1444-1447.
- Ribeiro, M.B.; Greenstein, A.J.; Sachar, D.B.; et al. 1996. Colorectal adenocarcinoma in Crohn's disease. *Ann Surg*. 223: 186-93.
- Sobin, L.H. and Wittekind, C.H. 1997. TNM classification of malignant tumor (5th ed). Wiley and Sons, New York.
- Takahashi, Y.; Nagata, T.; Asai, S.; Shintaku, K.; Eguchi, T.; Ishii, Y.; Fujii, M. and Ishikawa, K. 2000. Detection of Aberrations of 17p and *p53* Gene in Gastrointestinal Cancers by Dual (Two-color) Fluorescence In Situ Hybridization and GeneChip *p53* Assay. *Cancer Genet Cytogenet*. 121: 38–43.
- The American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting (AJC): Manual for staging of cancer, 1997. American Joint Committee. Chicago, Illinois, 1997.
- Uchida, T.; Wada, C.; Ishida, H.; Wang, C.; Egawa, S.; Yokoyama, E.; Kameya, T. and Koshiha, K. 1995. *p53* mutations and prognosis in bladder tumors. *J. Urol*. 153: 1097-1104.
- Van den Berg, F.M.; Tigges, A.J.; Schipper, M.E.I.; Kroes, W.G.M. and Walboomers, J.M.M. 1989. Expression of the oncogen *p53* in colon tumours. *J. Pathol*. 157: 193-199.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. 1992. *p53* function and dysfunction. *Cell*. 70(4): 523-6.

- Vogelstein, B.; Eric, R.; Fearon, B.A.; Hamilton, S.R.; Kern, S.E.; Preisinger, A.C.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A.M.M. and Bos, J.L. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Eng. J. Med.* 319: 525-532.
- Zauber, N.P.; Sabbath-Solitare, M.; Marotta, S.P. and Bishop, D.T. 1999. *K-ras* mutation and loss of heterozygosity of the adenomatous polyposis coli gene in patients with colorectal adenomas with *in situ* carcinoma. *Cancer.* 86: 31-36.
- Zauber, N.P.; Wang, C.; Lee, P.S.; Redondo, T.C.; Bishop, D.T. and Goel A. 2004. *K-ras* gene mutation, LOH of the *APC* and *DCC* gene, and microsatellite instability in primary colorectal carcinoma are not associated with micrometastases in pericolic lymph nodes or with patients' survival. *J. Clin. Pathol.* 57: 938-942.

<http://www.surgeons.or.th/public/colorectalcancer.pdf>

<http://www.cancer.gov>

