

การศึกษาการส่องกล้องสลายกลาสเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับการตรวจความผิดปกติโครโมโซมด้วย
เทคนิคแพนครีทีโคปิโรรีฟิซในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A study of cholangioscopy guided biopsy (Spybite[®]) combined with pancreaticobiliary Fluorescence in situ hybridization (PB FISH) for the diagnosis of malignant biliary stricture



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาการส่องกล้องสลายกลาสเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับ
การตรวจความผิดปกติโครโมโซมด้วยเทคนิคแพนครีทีโคบี
ริอะรีฟิซในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับ
อ่อน

โดย

นางสาวจิรวรรณ เมธากา

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. แพทย์หญิงรุ่งฤดี ชัยธีรกิจ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ นายแพทย์พรเทพ อังศุวัชรากร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐชัย ศรีสวัสดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. แพทย์หญิงรุ่งฤดี ชัยธีรกิจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ นายแพทย์พรเทพ อังศุวัชรากร)

..... กรรมการ

(อาจารย์ นายแพทย์ไวยวุฒิ ไทยพิสุทธิกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ แพทย์หญิงบุบผา พรธินสาร)

จิรัชช์ เมธากา : การศึกษาการส่องกล้องสลายกอลาสเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับการตรวจความผิดปกติโครโมโซมด้วยเทคนิคแพนครีโตโคบิโรอะรีฟิชในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อน (A study of cholangioscopy guided biopsy (Spybite[®]) combined with pancreaticobiliary Fluorescence in situ hybridization (PB FISH) for the diagnosis of malignant biliary stricture) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. พญ.รุ่งฤดี ชัยธีรกิจ, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. นพ.พรเทพ อังศวีรารกร, 60 หน้า.

การศึกษาการส่องกล้องสลายกอลาสเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับการตรวจความผิดปกติโครโมโซมด้วยเทคนิคแพนครีโตโคบิโรอะรีฟิชในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อน

บทนำ การส่องกล้องทางเดินน้ำดี (ERCP) เป็นหัตถการที่นิยมในปัจจุบันในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มาด้วยท่อน้ำดีตีบตันเนื่องมาจากสามารถทำการตัดชิ้นเนื้อและเก็บเซลล์ภายใต้ฟลูออโรสโคปี้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันเนื่องจากความไวในการวินิจฉัยค่อนข้างต่ำ ปัจจุบันมีอุปกรณ์ในการส่องกล้องท่อน้ำดีชนิดใหม่ คือ กล้องสลายกอลาส ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นลักษณะท่อน้ำดีที่ชัดเจนและสามารถบอกตำแหน่งของความผิดปกติได้ การศึกษานี้มีจุดประสงค์ในการหาความไวและความจำเพาะของท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็ง โดยการตัดชิ้นเนื้อด้วยกล้องสลายกอลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช

วิธีการวิจัย ผู้ป่วยที่สงสัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งจะได้รับการส่องกล้องทางเดินน้ำดี (ERCP) ร่วมกับการส่องกล้องทำการตัดชิ้นเนื้อด้วยกล้องสลายกอลาส (Spybite) เก็บเซลล์วิทยา (brush cytology) จากนั้นนำชิ้นเนื้อและเซลล์ที่ได้ไปส่งพยาธิวิทยาและทำการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคแพนครีโตโคบิโรอะรีฟิช คือ การใช้ตัวตรวจจับ (probe) ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ไปจับกับโครโมโซมที่ตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง โดยตัวตรวจจับของโครโมโซมแพนครีโตโคบิโรอะรีฟิช (PB probe) คือโครโมโซม 1q21 (สีเหลือง), 7p12 (สีเขียว), 8q24 (สีฟ้า) และ 9p21 (สีแดง) โดยเซลล์มะเร็งสามารถตรวจพบการเพิ่มหรือลดของจำนวนโครโมโซมได้ การศึกษานี้เปรียบเทียบความไวและความจำเพาะการตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากกล้องสลายกอลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH), การตรวจชิ้นเนื้อจากกล้องสลายกอลาสด้วยพยาธิวิทยา (Spybite), การตรวจเซลล์วิทยาร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (FISH brushing) และการตรวจเซลล์โดยพยาธิวิทยา (cytology)

ผลการวิจัย ผู้ป่วยมีภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งจำนวน 30 รายเข้าร่วมการวิจัย โดย 27 รายได้รับการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง โดยสาเหตุเกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีมากที่สุด (15 ราย, 55.6%), รองลงมาคือมะเร็งตับอ่อนและมะเร็งท่อน้ำดีชนิด IPNB (3 ราย, 11.1%). ความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีที่เกิดจากมะเร็งด้วยการตรวจเซลล์วิทยาร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (FISH brushing) และการตรวจเซลล์โดยพยาธิวิทยา (cytology) คือ 33.3% และ 75% ตามลำดับ ความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีที่เกิดจากมะเร็งด้วยการตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากกล้องสลายกอลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) และการตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากกล้องสลายกอลาสด้วยพยาธิวิทยา (Spybite) คือ 96.3% และ 62.9% ความจำเพาะเท่ากับ 33.3% and 100% ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย การตรวจชิ้นเนื้อด้วยกล้องสลายกอลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซม (Spybite FISH) สามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งได้มากกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากกล้องสลายด้วยพยาธิวิทยา (Spybite) เพียงอย่างเดียว ดังนั้นการตรวจชิ้นเนื้อด้วยกล้องสลายกอลาสร่วมกับการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชสามารถนำมาใช้วินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันทางคลินิก ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากแก่ผู้ป่วยที่มาด้วยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งในการวางแผนรักษาต่อไปในอนาคต

ภาควิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5974051430 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: SPYGLASS / SPYBITE / FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION(FISH) / MALIGNANT BILIARY STRICTURE

JEERAWAT MAYTAPA: A study of cholangioscopy guided biopsy (Spybite[®]) combined with pancreaticobiliary Fluorescence in situ hybridization(PB FISH) for the diagnosis of malignant biliary stricture. ADVISOR: ROONGRUDEE CHAITEERAKIJ, M.D.,Ph.D., CO-ADVISOR: PHONTHEP ANGSUWATCHARAKON, M.D., 60 pp.

A study of cholangioscopy guided biopsy (Spybite[®]) combined with pancreaticobiliary Fluorescence in situ hybridization (PB FISH) for the diagnosis of malignant biliary stricture

Jeerawat Maytapa, MD¹, Phonthep Angsuwatcharakon, MD¹, Roongruedee Chaiteerakij, MD, PhD¹

¹ Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand

Background & Aims: Endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) is commonly used diagnostic procedure for diagnosis of malignant biliary stricture. ERCP provides tissue samples for brush cytology and endoscopic intraductal biopsies for histopathology. However, distinguishing malignant biliary stricture from benign biliary stricture is challenging due to low sensitivity of brush cytology and intraductal biopsy. This study aimed to assess sensitivity and specificity of PB FISH combined with Spybite[®] for diagnosis of malignant biliary strictures.

Method: Patients who were evaluated for malignant biliary strictures and underwent ERCP were enrolled. Bile duct tissue were obtained from the biliary stricture sites using SpyGlass[™] Direct Visualization System for direct target biopsy. The tissue was then examined histologically and by PB FISH. The PB FISH assay used a mixture of fluorescence-labeled probes to chromosomes 1q21 (gold), 7p12 (green), 8q24 (aqua), and 9p21 (red) to identify chromosome number alterations. Cytologic specimens were also obtained during ERCP using a cytology brush before Spybite[®] biopsy. The biliary brushing samples were tested for routine cytology and PB FISH. Sensitivities and specificities of Spybite[®] FISH, Spybite[®] pathology, FISH brushing and cytology brushing were compared.

Result: Of the 30 patients enrolled, 27 were diagnosed with malignancy. The most common cancer was cholangiocarcinoma (n=15, 55.6%), followed by pancreatic cancer and IPNB (n=3, 11.1%). The sensitivities of cytology brushing and FISH brushing for detection of malignancy were 33.33% and 75%, respectively. The sensitivities of Spybite[®] FISH and Spybite[®] biopsy were 96.3% and 62.9%. The specificities of Spybite[®] FISH and Spybite[®] biopsy were 33.3% and 100%.

Conclusion: PB FISH is more sensitive for detection of malignant biliary strictures in Spybite[®] specimen than Spybite biopsy alone. PB FISH combined with Spybite[®] may improve the clinical management of patients who are being evaluated for malignant biliary stricture.

Department: Medicine

Field of Study: Medicine

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้เนื่องจากความเมตตากรุณา และความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก อาจารย์ดอกเตอร์แพทย์หญิงรุ่งฤดี ชัยธีรกิจ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์นายแพทย์พรเทพ อังศุวัชรกร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้เสียสละเวลาในการให้คำปรึกษาอย่างดีเสมอมา ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอบพระคุณพยาบาลและเจ้าหน้าที่หน่วยงานห้องส่องกล้องทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บข้อมูล และขอบพระคุณผู้ป่วยและผู้ดูแลทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าร่วมโครงการครั้งนี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามในที่นี้ ซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณมารดาและครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ.....	1
สารบัญตาราง.....	4
บทที่ 1 บทนำ.....	5
1.1. ความสำคัญและที่มาของการวิจัย.....	5
1.2 คำถามของการวิจัย (research questions).....	9
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (objectives).....	10
1.4 สมมุติฐาน (hypothesis).....	10
1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	10
1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (conceptual Framework).....	10
1.7 การให้คำนิยามในเชิงปฏิบัติ.....	11
1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	12
1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการในการแก้ไข.....	13
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
3.1 รูปแบบวิจัย.....	18
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย.....	18
3.3 ขนาดตัวอย่าง.....	19
3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย.....	19

3.5 การรวบรวมข้อมูล.....	26
3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย.....	27
3.7 การเปิดเผยข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วย	27
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล	27
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	28
4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา	28
4.2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย	30
4.3 การแปลผลความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช	34
4.4 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยการตรวจหาผิดปกติ ของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช.....	35
4.4.1 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยชิ้นเนื้อจากการ ส่องกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิค ฟิช (Spybite FISH).....	35
4.4.2 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยชิ้นเนื้อการส่อง กล้องสลายกลาส (Spybite biopsy).....	43
4.4.3 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยเซลล์วิทยา ร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (FISH brushing).....	44
4.4.4 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยเซลล์วิทยา (Brush cytology)	46
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	48
5.1 อภิปรายผล	48
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	51
5.3 ข้อดีของการศึกษานี้.....	51
5.4 ข้อด้อยของการศึกษานี้.....	52

5.5 ข้อเสนอแนะ.....	53
รายการอ้างอิง.....	54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	60



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	อุปกรณ์การตัดชิ้นเนื้อภายในท่อน้ำดี (Intraductal forcep biopsy) ใส่เข้าไปในแอมพูลลา (Ampulla) ไปยังบริเวณท่อน้ำดี ซึ่งทั้ง Brush cytology และ intraductal forcep biopsy ต้องอาศัยฟลูออโรสโคปีในการบอกตำแหน่งที่ตีบตัน (ภาพถ่ายฟลูออโรสโคปี).....	6
ภาพที่ 2	อุปกรณ์เก็บเซลล์วิทยา (Brush cytology) ที่สามารถใส่เข้าไปในแอมพูลลา (Ampulla) ไปยังบริเวณท่อน้ำดีเพื่อทำการแปรงท่อน้ำดีและเก็บเซลล์บริเวณที่มีการตีบตัน.....	8
ภาพที่ 3	A. กล้องสเปกโทรสโกปีที่สามารถใส่เข้าไปในกล้องตรวจท่อน้ำดี B. ชุดอุปกรณ์ประมวลผลกล้องสเปกโทรสโกปี.....	9
ภาพที่ 4	กรอบแนวความคิดในการวิจัย (conceptual Framework)	10
ภาพที่ 5	การตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคพีซีให้ผลบวกด้วย PB probe โดย probe 1q21 มีจำนวนโครโมโซม 12 copies (สีเหลือง), Probe 7p12 มีจำนวน 3 copies (สีเขียว), Probe 8q24 มีจำนวน 3copies (สีฟ้า) และ 9p21 มีจำนวน 2 copies แสดงผลปกติ (สีแดง).....	12
ภาพที่ 6	ภาพจากกล้องสเปกโทรสโกปีเห็นลักษณะของท่อน้ำดีมีการขยายตัวและคดเคี้ยวของหลอดเลือด (tumor vessels).....	16
ภาพที่ 7	A.ภาพฟลูออโรสโคปีแสดงลักษณะท่อน้ำดีที่มีความผิดปกติ (filling defect) หลังจากการฉีดสี B.ภาพจากกล้องสเปกโทรสโกปีแสดงให้เห็นลักษณะก้อนในท่อน้ำดีในตำแหน่งที่มีความผิดปกติจากภาพฟลูออโรสโคปี.....	17
ภาพที่ 8	สารเก็บเซลล์วิทยา (the ThinPrep® Non Gyn).....	20
ภาพที่ 9	สารละลายเซลล์วิทยาประมาณ 50 มิลลิลิตรเทลงหลอดทดลองเพื่อนำไปปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที (Revolutions per minute)	22
ภาพที่ 10	สารละลายเซลล์วิทยาที่ผ่านขั้นตอนการตรึงเซลล์และปั่นจนเหลือตะกอนที่บริเวณด้านใต้หลอดก่อนที่จะนำไปเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็ก(microcentrifuge)	23
ภาพที่ 11	ตัวอย่างสไลด์ที่มีเซลล์ที่มีคุณภาพ (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X).....	24
ภาพที่ 12	ตัวอย่างสไลด์ที่มีเซลล์ที่มีคุณภาพ (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X).....	25

ภาพที่ 13	ภาพแสดงผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย.....	29
ภาพที่ 14	ตารางแสดงผลการแปลผลความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (15).....	35
ภาพที่ 15	การตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) ให้ผลบวกด้วย PB probe โดย probe1q21 มีจำนวนโครโมโซม 3 copies (สีเหลือง), Probe 8q24 มีจำนวน 3copies (สีฟ้า) มีจำนวนเพิ่มของโครโมโซมต่อตัวตรวจจับ (Probe) ส่วน Probe7p12 มีจำนวน 2 copies (สีเขียว) และ 9p21 มีจำนวน 2 copies แสดงจำนวนโครโมโซมปกติ (สีแดง).....	36
ภาพที่ 16	ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสง DAPI แสดงให้เห็นขอบเขตและลักษณะเซลล์ก่อนทำการอ่านสัญญาณ (signal) แต่ละตัวตรวจจับ (probe).....	37
ภาพที่ 17	ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีเหลือง (spectrum gold) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 1q21 (probe, labelled with Spectrum Gold).....	37
ภาพที่ 18	ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีเขียว (spectrum green) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 7p12 (probe, labelled with Spectrum Green).....	38
ภาพที่ 19	ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีฟ้า (spectrum aqua) probe ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 8q24 (probe, labelled with Spectrum Aqua).....	38
ภาพที่ 20	ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีแดง (spectrum red) probe ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 9p21 locus (LST 9p21, probe, Spectrum Red).....	39
ภาพที่ 21	ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ภายใต้ทุกตัวกรองแสง.....	39
ภาพที่ 22	ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีเหลือง (spectrum gold) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 1q21 (probe, labelled with Spectrum Gold).....	40
ภาพที่ 23	ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีเขียว (spectrum green) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 7p12 (probe, labelled with Spectrum Green).....	41

- ภาพที่ 24** ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีแดง (spectrum red) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 9p21 locus (LST 9p21, probe, Spectrum Red)..... 41
- ภาพที่ 25** ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีฟ้า (spectrum aqua) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 8q24 (probe, labelled with Spectrum Aqua)..... 42
- ภาพที่ 26** ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ภายใต้ทุกตัวกรองแสง..... 42
- ภาพที่ 27** การตรวจเซลล์วิทยาร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) ให้ผลบวกด้วย PB probe โดย Probe7p12 (สีเขียว) มีจำนวน 3 copies, Probe 8q24 มีจำนวน 3 copies (สีฟ้า) มีจำนวนเพิ่มของโครโมโซมต่อตัวตรวจจับ (Probe) ส่วน probe1q21 มีจำนวนโครโมโซม 2 copies (สีเหลือง) และ9p21 มีจำนวน 2 copies แสดงจำนวนโครโมโซมปกติ (สีแดง)..... 45
- ภาพที่ 28** ภาพตัวอย่างกลุ่มเซลล์จากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตรวจเซลล์วิทยาร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชมีผลการย้อมเป็นบวก 46



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตารางแสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่ร่วมการวิจัยการส่องกล้องสลายกาสเพื่อตัดชิ้นเนื้อ ร่วมกับการตรวจความผิดปกติโครโมโซมด้วยเทคนิคแพนครีทีโคบิโอะรีฟิช (จำนวน 30 คน)....	32
ตารางที่ 2 ตารางแสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจการส่องกล้อง ร่วมกับการตรวจเซลล์วิทยา (brush cytology).....	33
ตารางที่ 3 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกาส ร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคชฟิช (Spybite FISH).....	43
ตารางที่ 4 ตารางแสดงความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยการตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกาสด้วยพยาธิวิทยา (Spybite biopsy)	44
ตารางที่ 5 ตารางแสดงความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยเซลล์วิทยาร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคชฟิช (FISH brushing)	45
ตารางที่ 6 ความสามารถของเซลล์วิทยา(Brush cytology)ในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง.....	47
ตารางที่ 7 ตารางสรุปความสามารถของสิ่งส่งตรวจในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง	47
ตารางที่ 8 ตารางสรุปผลความไวและความจำเพาะของสิ่งส่งตรวจในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง.....	49

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

มะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนยังเป็นปัญหาสำคัญในเกิดความเจ็บป่วยและเพิ่มอัตราการตายทั่วโลกทั้งในสหรัฐอเมริกาและประเทศไทยอาจมาด้วยภาวะท่อน้ำดีตีบตันได้อุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในสหรัฐอเมริกา 8.66 ต่อประชากร 100,000 คน และมะเร็งตับอ่อน 12.45 ต่อประชากร 100,000 คน ในประเทศไทยอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีไทยสูงกว่าสหรัฐอเมริกามากเนื่องจากมีความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis Viverrini* ซึ่งพบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อุตบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี 85 ต่อประชากร 100,000 คน, ภาคเหนือ 14.6 ต่อประชากร 100,000 คน และภาคกลาง 14.4 ต่อประชากร 100,000 คน(1)

ภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็ง (Malignant biliary stricture) สาเหตุส่วนมากเกิดจากมะเร็งท่อน้ำดี มะเร็งตับอ่อน มะเร็งแอมพูลลา (periampullary cancer) การแยกภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งหรือสาเหตุที่ไม่ใช่มะเร็งจากภาวะท่อน้ำดีอักเสบอื่นๆ เช่น cholelithiasis, chronic pancreatitis, primary sclerosing cholangitis เป็นต้น ยังคงเป็นปัญหาในการวินิจฉัยเนื่องจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่ ลักษณะของมะเร็งจะเจริญตามแนวของท่อน้ำดีทำให้ไม่สามารถแยกขอบเขตที่ชัดเจน นอกจากนี้การได้ชิ้นเนื้อหรือเซลล์วิทยาค่อนข้างยากถ้าตำแหน่งของท่อน้ำดีที่สงสัยอยู่ลึก อีกทั้งการเก็บชิ้นเนื้อหรือเซลล์อาจจะได้ตัวอย่างไม่เพียงพอ คนไข้ส่วนมากเมื่อมีภาวะตีบตันท่อน้ำดีมักจะเป็นระยะที่รุนแรงและส่วนมากจะผ่าตัดไม่ได้ ส่วนผู้ป่วยท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งเข้ารับการผ่าตัดเพื่อวินิจฉัยพบผลชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดไม่ใช่มะเร็งถึงร้อยละ 7-10(2, 3) ดังนั้นการยืนยันการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีด้วยชิ้นเนื้อและเซลล์วิทยา (Cytology) เป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นก่อนพิจารณาทำการผ่าตัดการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งได้รวดเร็วจะสามารถวางแผนการรักษาได้รวดเร็วและถูกต้อง(4)

การส่องกล้องทางเดินน้ำดี (Endoscopic retrograde cholangiopancreatography: ERCP) ซึ่งโดยทั่วไปการส่องกล้องท่อน้ำดีจะใช้

เครื่องเอกซเรย์ฟลูออโรสโคปีช่วยในการใส่สายสวนท่อน้ำดี (ภาพที่1) เพื่อช่วยยืนยันว่าใส่สายเข้าไปยังท่อน้ำดีและทำการฉีดสารทึบแสงช่วยในการบอกตำแหน่งของท่อน้ำดีตีบตันโดยภาพถ่ายรังสีท่อน้ำดี (cholangiography) จากนั้นใช้อุปกรณ์ตัดชิ้นเนื้อและหรืออุปกรณ์แปรงช่วยในการเก็บเซลล์วิทยา (Brush cytology)(ภาพที่2) ตามตำแหน่งที่สงสัยการส่องกล้องทางเดินน้ำดีเป็นหัตถการที่ใช้ในการช่วยวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งเนื่องจากทำได้ง่ายและภาวะแทรกซ้อนน้อย แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่ความไวในความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันรวมด้วยเซลล์วิทยา จากการศึกษาทบทวน (5) มีความไว (pooled sensitivity of brush cytology) เท่ากับ 45% ถือว่าต่ำ เนื่องจากลักษณะและตำแหน่งของท่อน้ำดีตีบตัน ขนาดของการตีบ รวมถึงปฏิกิริยาตอบสนองต่อมะเร็งที่ทำให้เกิดพังผืดทำให้ไม่ได้เซลล์มะเร็ง ทำให้เครื่องมือไม่สามารถเก็บเซลล์ได้มีประสิทธิภาพ(6-8)



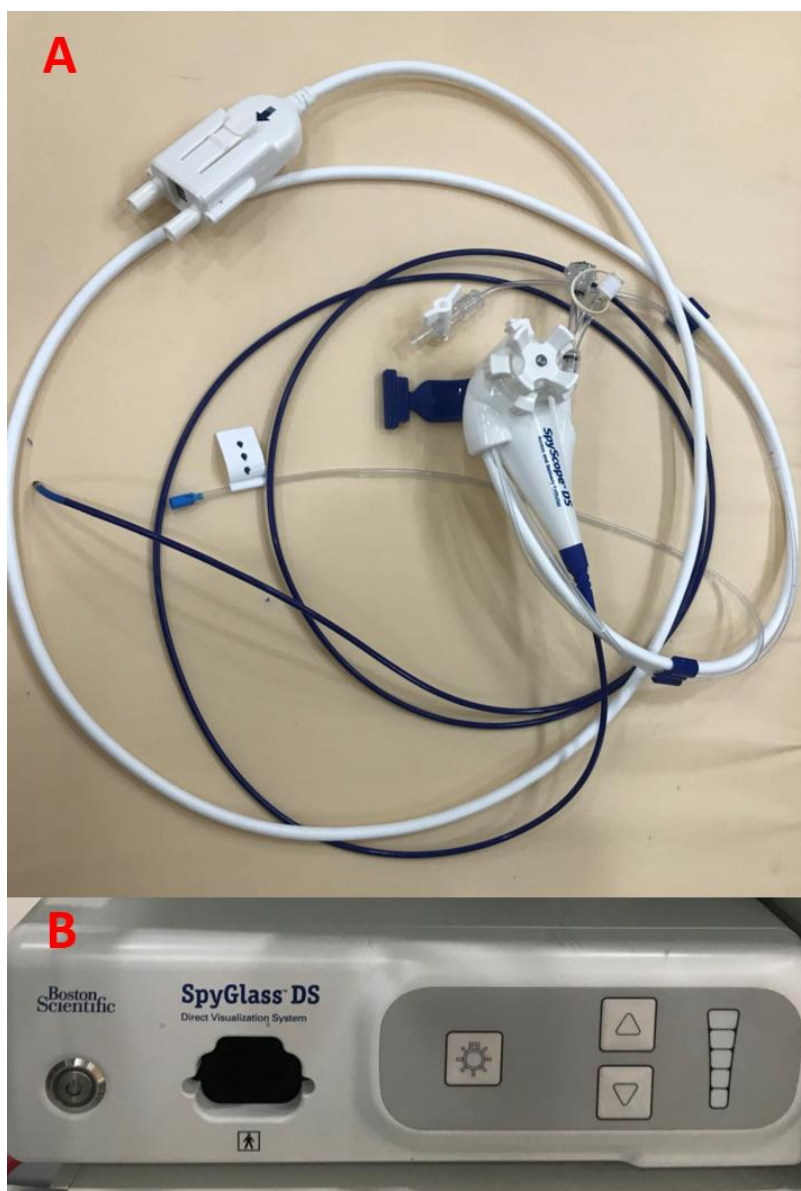
ภาพที่ 1 อุปกรณ์การตัดชิ้นเนื้อภายในท่อน้ำดี (Intraductal forcep biopsy) ใส่เข้าไปในแอมพูลลา (Ampulla) ไปยังบริเวณท่อน้ำดี ซึ่งทั้ง Brush cytology และ intraductal forcep biopsy ต้องอาศัยฟลูออโรสโคปีในการบอกตำแหน่งที่ตีบตัน (ภาพถ่ายฟลูออโรสโคปี)

ต่อมาได้มีการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Fluorescence in situ hybridization: FISH) จากเซลล์วิทยา เพื่อเพิ่มความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีอูดตันที่สงสัยมะเร็ง เป็นการใช้ fluorescence-labeled probe คือการใช้ตัวตรวจจับ (probe) ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ไปจับกับโครโมโซมที่ตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจง เพื่อประเมินการเพิ่มหรือลดหายของจำนวนโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งกลุ่มน้ำดี (aneuploid) ข้อดีของการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชที่เหนือกว่าการตรวจทางเทคนิคโมโลกุลแบบอื่นคือเซลล์ที่มีลักษณะปกติ (disomic benign cells) แต่นิวเคลียสมีความผิดปกติของโครโมโซมเมื่อใช้การตรวจด้วยเทคนิคฟิชจะส่งลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมซึ่งจะช่วยให้การวินิจฉัยท่อน้ำตีอูดตันที่สงสัยมะเร็ง แม้จะไม่ได้เซลล์ที่ผิดปกติก็ตาม(9-11)

ในปัจจุบันมีอุปกรณ์ในการส่องกล้องท่อน้ำดีชนิดใหม่ คือ กล้องสปายกลาส (SpyGlass® DS system; Boston scientific) คือกล้องขนาดเล็กที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.6 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถใส่เข้าไปในช่องใส่อุปกรณ์ของกล้องตรวจท่อน้ำดีเพื่อตรวจดูในท่อน้ำดีได้โดยตรง (ภาพที่ 3) กล้องสามารถช่วยแยกรอยตีบของท่อน้ำดีได้ว่าเป็นรอยโรคที่เกิดจากมะเร็งหรือไม่ใช่มะเร็งจากลักษณะของรอยโรคที่เห็นและยังสามารถใช้ในการเลือกตำแหน่งการตัดชิ้นเนื้อมาตรวจได้อย่างแม่นยำสามารถใช้งานง่าย และให้ภาพที่มีคุณภาพสูง อุปกรณ์สำหรับการตรวจชิ้นเนื้อ (SypBite biopsy forcep) ได้รับการออกแบบให้พอดีกับช่องใส่อุปกรณ์ของกล้องสปายกลาส สายมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 1 มม. โดยปลายของ forcep กางได้ 55 ° ความกว้างของการเปิด 4.1 มิลลิเมตร (12-14) คณะผู้วิจัยจึงเห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำกล้องสปายกลาสมาใช้ในการช่วยวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีอูดตันที่สงสัยมะเร็งโดยการส่องดูและประเมินท่อน้ำดี รวมถึงตัดชิ้นเนื้อในตำแหน่งที่สงสัยร่วมกับการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช



ภาพที่ 2 อุปกรณ์เก็บเซลล์วิทยา (Brush cytology) ที่สามารถใส่เข้าไปในแอมพูลลา (Ampulla) ไปยังบริเวณท่อน้ำดีเพื่อทำการแปรงท่อน้ำดีและเก็บเซลล์บริเวณที่มีการตีบตัน



ภาพที่ 3 A. กล้องสปายกลาสที่สามารถใส่เข้าไปในกล้องตรวจท่อน้ำดี B. ชุดอุปกรณ์ประมวลผล กล้องสปายกลาส

1.2 คำถามของการวิจัย (research questions)

คำถามหลัก (Primary research question)

การส่องกล้องสปายกลาสเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับการตรวจโครโมโซมด้วยวิธี pancreaticobiliary Fluorescence in situ hybridization (PB FISH) สามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยโรคในผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนได้หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (objectives)

เพื่อศึกษาหาความไว (Sensitivity) ในการวินิจฉัยโรคในกลุ่มผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนด้วยการส่องกล้องสลายกาสเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี Pancreaticobiliary fluorescence in situ hybridization(FISH)

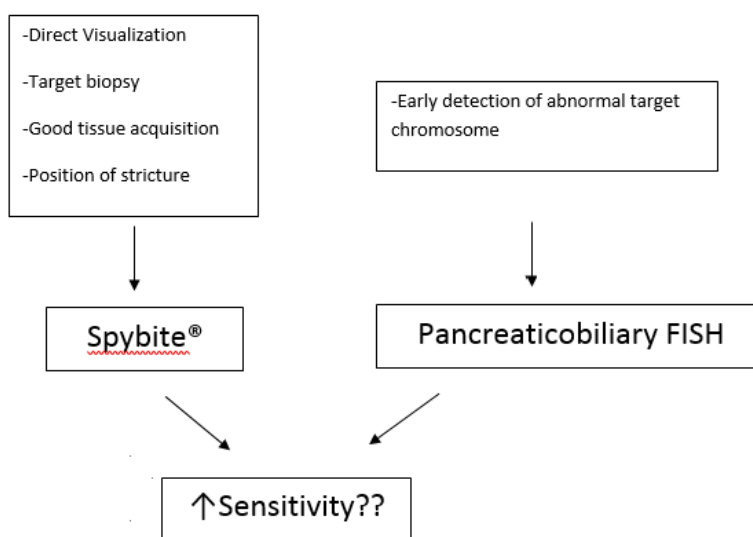
1.4 สมมุติฐาน (hypothesis)

การส่องกล้องสลายกาสเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี pancreaticobiliary Fluorescence in situ hybridization(FISH) สามารถเพิ่มการวินิจฉัยโรคในกลุ่มผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนจาก 60% เพิ่มเป็น 80% ได้หรือไม่

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

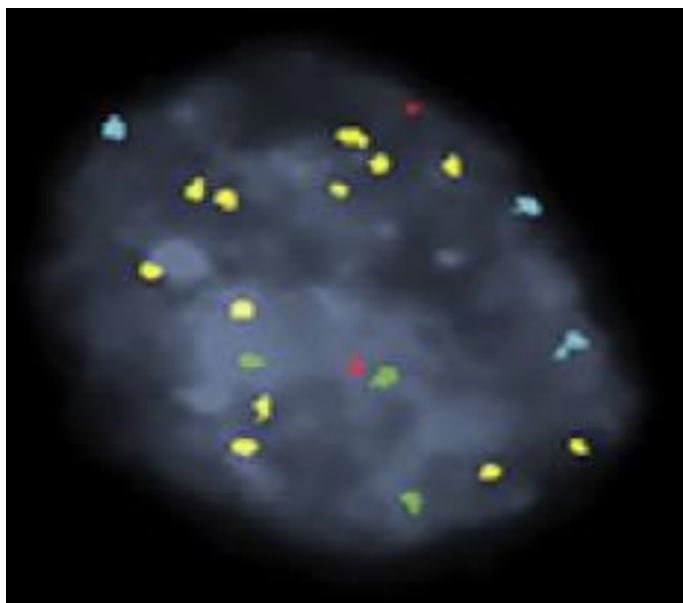
1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (conceptual Framework)



ภาพที่ 4 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (conceptual Framework)

1.7 การให้คำนิยามในเชิงปฏิบัติ

1. การวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง (Diagnosis of malignant disease) ยืนยันการวินิจฉัยจากเซลล์วิทยา (cytology) ผลพยาธิวิทยาที่ได้จากการผ่าตัด การส่องกล้องทางเดินน้ำดีเพื่อตัดชิ้นเนื้อหรือเก็บเซลล์วิทยาที่เข้าได้กับมะเร็ง หรือเมื่อติดตามอาการทางคลินิกพบอาการเปลี่ยนแปลง เช่น เหลือง น้ำหนักลด หรือเมื่อติดตามเอกซเรย์คอมพิวเตอร์พบลักษณะท่อน้ำดีตีบตันมากขึ้นหรือมีก้อน
2. การวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็ง (Diagnosis of benign biliary lesion) ยืนยันการวินิจฉัยโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่มะเร็งจากเซลล์วิทยา (cytology) ผลพยาธิวิทยาที่ได้จากการผ่าตัด การส่องกล้องทางเดินน้ำดีเพื่อตัดชิ้นเนื้อหรือเก็บเซลล์วิทยาหรือในกรณีเมื่อไม่ได้คำตอบจากพยาธิวิทยาเมื่อติดตามอาการทางคลินิกและเอกซเรย์คอมพิวเตอร์แล้วไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ระยะเวลา 1 ปี
3. การวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด (Diagnosis of indeterminate stricture) การตรวจเซลล์วิทยาหรือผลพยาธิวิทยายังคงสงสัยมะเร็ง (Inconclusive or suspicion of malignancy)
4. การตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนซ์อินไซตูไฮบริดไรเซชัน (Fluorescence in situ hybridization) โดยใช้ pancreaticobiliary probe (PB probe) โดยให้ผลบวกเมื่อมีจำนวนของโครโมโซมเพิ่มขึ้นมากกว่าเท่ากับ 3 copy อย่างน้อย 2 probe หรือเรียกว่า Polysomy โดยค่า cutoff value คือพบมากกว่าเท่ากับ 4 cell ใน 1 ชิ้นเนื้อ (ภาพที่ 5)(15)
5. มาตรฐานอ้างอิง (Gold standard) ในการยืนยันการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันคือ ผลพยาธิวิทยาที่ได้จากการผ่าตัดทั้งการผ่าตัดแบบเปิดหรือการผ่าตัดส่องกล้อง การส่องกล้องทางเดินน้ำดีโดยการตัดชิ้นเนื้อ รวมถึงผลชิ้นเนื้อในตำแหน่งอื่นๆ ที่ช่วยในการวินิจฉัยโรคทั้งที่เกิดจากมะเร็งและโรคที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็ง ในกรณีที่ผลชิ้นเนื้อไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้จะใช้การติดตามอาการทางคลินิกร่วมกับภาพทางรังสีวิทยาที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายในระยะเวลา 1 ปี ในการวินิจฉัยว่าผู้ป่วยรายนั้นเป็นภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็ง



ภาพที่ 5 การตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชให้ผลบวกด้วย PB probe โดย probe 1q21 มีจำนวนโครโมโซม 12 copies (สีเหลือง), Probe 7p12 มีจำนวน 3 copies (สีเขียว), Probe 8q24 มีจำนวน 3copies (สีฟ้า) และ 9p21 มีจำนวน 2 copies แสดงผลปกติ (สีแดง)

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การส่องกล้องทางเดินน้ำดีร่วมกับการใช้กล้องสพายกาส (Spyglass®) เป็นการส่องกล้องเทคนิคใหม่ทำให้เห็นลักษณะการติบตันของท่อน้ำดีอีกทั้งยังช่วยเพิ่มความแม่นยำในการตัดชิ้นเนื้อบริเวณที่สงสัย ซึ่งผลจากการศึกษานี้อาจทำให้มีการใช้กล้องสพายกาสแพร่หลายมากขึ้นในการช่วยวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันไม่ทราบสาเหตุ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการความผิดปกติของโครโมโซมโรคคลุ่มมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิคฟิช (Fluorescence in situ Hybridization: FISH) ทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการสร้างระบบการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์วิทยาหรือชิ้นเนื้อด้วยเทคนิคฟิช เนื่องจากยังไม่มีการตรวจทางห้องปฏิบัติการชนิดนี้ในโรคคลุ่มมะเร็งท่อน้ำดีในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มาก่อน ในอนาคตสามารถพัฒนาการตรวจทางห้องปฏิบัติการความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชในมะเร็งกลุ่มท่อน้ำดีและโรคอื่นๆได้

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการในการแก้ไข

การส่องกล้องสลายกาสเป็นวิธีการส่องกล้องแบบใหม่ ผู้ช่วยส่องกล้องและพยาบาลยังไม่คุ้นเคยกับการส่องกล้องแบบนี้ จึงอาจทำให้ใช้เวลาในการส่องกล้องนานกว่าปกติ จึงแก้ไขโดยการจัดฝึกอบรม และแนะนำอุปกรณ์ที่ใช้ให้กับ ผู้ช่วยส่องกล้องและพยาบาล เป็นระยะตั้งแต่ก่อนการเริ่มการศึกษา

การตรวจทางห้องปฏิบัติการความผิดปกติของโครโมโซมโครคลุ่มมะเร็งท่อน้ำดีด้วยเทคนิคฟิช(Fluorescence in situ Hybridization: FISH) เป็นการตรวจแบบใหม่ ทางคณะผู้วิจัยได้จัดประชุมกับอาจารย์ผู้มีความชำนาญด้านการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช แพทย์พยาบาล ผู้ช่วยวิจัยในการเก็บชิ้นเนื้อ ขั้นตอนการส่งตรวจ การวิเคราะห์ผลเป็นประจำ เพื่อติดตามการดำเนินงาน รวมถึงความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นเพื่อที่จะได้มาแก้ไขและปรับปรุง



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับอ่อนมักมาด้วยอาการท่อน้ำดีตีบตันซึ่งมักแยกได้ยากจากสาเหตุอื่นที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็ง การวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยเซลล์วิทยา (cytology) จะช่วยในการวางแผนการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพและหลีกเลี่ยงการผ่าตัดที่ไม่จำเป็น ซึ่งหัตถการส่องกล้องท่อน้ำดี (ERCP) สามารถช่วยการวินิจฉัยบริเวณท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยโดยเซลล์วิทยา (brush cytology) หรือตัดชิ้นเนื้อ (intraductal forcep biopsy) (10, 16-19)

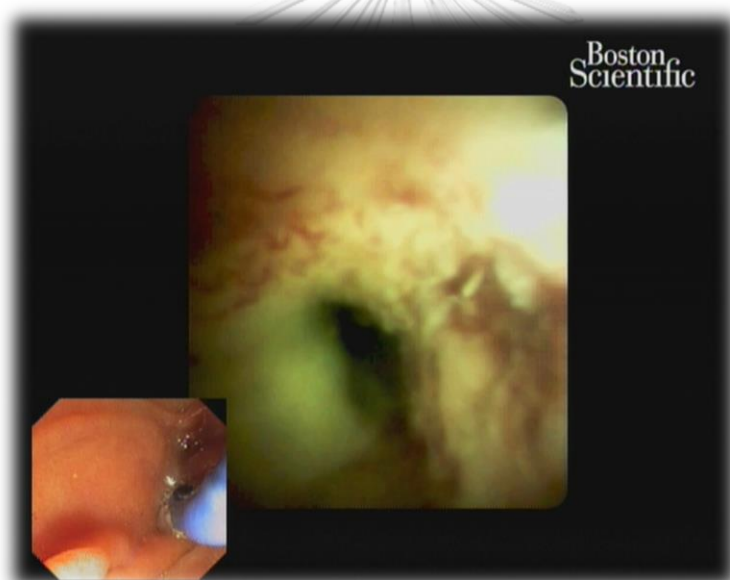
การศึกษาแบบ systematic review and meta-analysis ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการส่องกล้องท่อน้ำดีเพื่อเก็บเซลล์วิทยา (brush cytology) และการตัดชิ้นเนื้อ (intraductal forceps biopsy) ในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งจากทั้งหมด 9 การศึกษา จำนวนคนไข้ 730 คน(5) พบว่าความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันรวมด้วยเซลล์วิทยา (pooled sensitivity of brush cytology) เท่ากับ 45% pooled sensitivity of intraductal biopsy เท่ากับ 48.1% และ pooled sensitivity of brush and intraductal biopsy 59.4% ส่วนความจำเพาะของการวินิจฉัยเท่ากับ 99%, 99.2% และ 100% จาก meta-analysis จะเห็นได้ว่าการตัดชิ้นเนื้อและการเก็บเซลล์วิทยาจะมีความไวมากที่สุดในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง แต่อย่างไรก็ตามยังคงต้องการวิธีแบบอื่นที่มีความไวในการวินิจฉัยมากกว่านี้ สาเหตุที่ทำให้ความไวในการวินิจฉัยด้วย brush cytology and biopsy มีความไวค่อนข้างต่ำเนื่องมาจากการตำแหน่งเก็บเซลล์และชิ้นเนื้ออาจไม่มีมะเร็ง ถ้ามะเร็งไม่ได้แพร่กระจายมายังตำแหน่งที่ทำการเก็บ

ต่อมาได้มีการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Fluorescence in situ hybridization: FISH) ในการช่วยวินิจฉัยมะเร็ง โดยพบลักษณะ aneuploidy ซึ่งเป็นการเพิ่มหรือลดหายของจำนวนโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งกลุ่มน้ำดี โดยสามารถทำการตรวจชิ้นเนื้อหรือเซลล์ที่สงสัยได้มีรายงานการพบ aneuploidy ถึง 80% ในมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) และ primary sclerosing cholangitis (PSC)(20) FISH assay ที่เป็นที่ยอมรับในปัจจุบันที่ใช้ในการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมที่สงสัยมะเร็ง carcinoma คือ URoVysion™(Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL, USA) ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) ในการวินิจฉัยภาวะมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (bladder cancer) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 3 (CEP 3 probe, labelled with Spectrum Red), 7 (CEP 7 probe, labelled with Spectrum Green), 17 (CEP 17 probe, labelled with Spectrum Auqa) และ the 9p21 locus(LST 9p21, probe, Spectrum Gold) ที่มีความผิดปกติ(21) มีการ

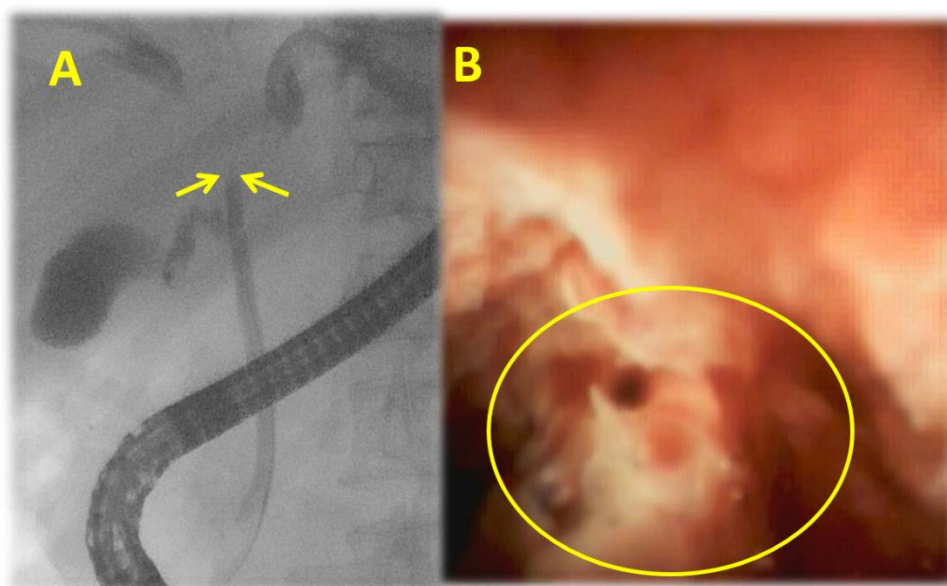
หลายศึกษาใช้ URoVysion™ ตรวจสอบความผิดปกติโครโมโซมในเซลล์ในการช่วยเพิ่มความไวในการวินิจฉัยมะเร็งในกลุ่มท่อน้ำดีและตับอ่อน(22-24) จากการศึกษาแบบทบทวน (review) การตรวจความผิดปกติของโครโมโซมในการวินิจฉัยมะเร็งในกลุ่มท่อน้ำดีและตับอ่อนพบความไวของ FISH ในการวินิจฉัยเท่ากับ 38-47% ความจำเพาะ 89-100%(8, 24-27) นอกจากนี้การศึกษาของ Roongruedee Chaiteerakij และคณะ ได้ศึกษาถึงความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนในคนไทยจำนวน 99 คน โดยมีความไวของการตรวจเซลล์ร่วมกับ UroVysion FISH probe ร้อยละ 55 เมื่อเทียบกับการตรวจเซลล์วิทยาเพียงอย่างเดียวซึ่งมีความไวร้อยละ 38 (55% VS 38%, $P < 0.001$) (28) ต่อมาได้มีการศึกษาเพื่อพัฒนา FISH assay ขึ้นมาเพื่อให้จำเพาะต่อมะเร็งในกลุ่มท่อน้ำดีและตับอ่อน(15) ผลของการทำตัวทดสอบ(combination of FISH probes) คือ 1q21, 7p12, 8q24 และ 9p21 หรือเรียกว่า pancreatobiliary probe (PB probe) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 1q21 (probe, labelled with Spectrum Gold), 7p12 (probe, labelled with Spectrum Green), 8q24 (probe, labelled with Spectrum Auqa) และ the 9p21 locus(LST 9p21, probe, Spectrum Red) ที่มีความผิดปกติเมื่อนำมาทำสอบตัวอย่างเซลล์วิทยาที่วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนจำนวน 272 ตัวอย่างแล้ว พบว่ามีความไวในการวินิจฉัย 93% และความจำเพาะ 100% และนำมาศึกษาแบบไปข้างหน้ากับผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนจำนวน 183 คนพบว่ามีความไวในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีตับอ่อนเท่ากับ 64.7% เมื่อเทียบกับ URoVysion™Probe คือ 45.9% ($P < .001$) ความจำเพาะใกล้เคียงกันคือ 92.9% และ 90.8% ตามลำดับ ($P < .001$) โดยสรุป pancreatobiliary probe สามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีมากกว่า URoVysion™Probe จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีการศึกษาทางคลินิกที่สนับสนุนว่า PB probe มีความจำเพาะกับยีนมะเร็งท่อน้ำดี โดยการยืนยันด้วยวิธี genomic hybridization เพื่อเปรียบเทียบพันธุกรรมโดยยีนมะเร็ง (oncogenes) ที่จำเพาะกับ PB probe ได้แก่ MCL1 อยู่บนโครโมโซมที่ตำแหน่ง 1q, EGFR อยู่บนโครโมโซมที่ตำแหน่ง 7p และ MYC อยู่บนโครโมโซมที่ตำแหน่ง 8q ซึ่งผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดีจะมีโครโมโซมในตำแหน่งเหล่านี้มากขึ้น(29-32) การศึกษาของ Shiraiish และคณะในการประเมินผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดี 50 คน พบว่ามีการเพิ่มของจำนวนโครโมโซมที่ตำแหน่ง 1q (42%), 7p (36%) และ 8q (36%)(33) ส่วนยีน CDKN2A(P16) ซึ่งเป็น tumor suppressor gene อยู่บนโครโมโซม 9p21 มักพบหายของจำนวนโครโมโซมตำแหน่งนี้ในผู้ป่วยมะเร็งตับอ่อนและท่อน้ำดี(34, 35) การหายของโครโมโซม 9p21 จำเพาะเจาะจงทั้งการเกิด dysplasia และมะเร็งในระยะแรกของมะเร็งท่อน้ำดี การศึกษาตัวอย่างมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนจำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่าการหายของ 9p21 (Homozygous loss of 9p21) พบได้ถึง 41%(15)

การส่องกล้องท่อน้ำดีชนิดใหม่ คือ กล้องสปายกลาส (SpyGlass™ DS system; Boston) เป็นตรวจดูในท่อน้ำดีได้โดยตรงทำให้เห็นลักษณะของท่อน้ำดีได้ชัดเจน ซึ่งแตกต่างจากกล้องส่องท่อน้ำดีที่มีข้อจำกัดในการประเมินภาวะท่อน้ำดีตีตันเนื่องจากจะเห็นลักษณะท่อน้ำดีจากเอกซเรย์ฟลูออโรสโคปี นอกจากนี้ยังสามารถตัดชิ้นเนื้อตรงตำแหน่งที่สงสัยภายใต้การมองเห็นที่ชัดเจน (Direct vision)(12-14,24-26) ส่วนลักษณะการตีตันที่สงสัยภาวะมะเร็งมากคือ 1.การขยายตัวและคดเคี้ยวของหลอดเลือด (tumor vessels) (ภาพที่ 6) 2.มีก้อนภายในท่อน้ำดี (intraductal mass) (ภาพที่ 7) 3.ลักษณะของผิวท่อน้ำดีเป็นเม็ด (irregular mucosal nodularity)(11, 36) การศึกษาประสิทธิภาพของกล้องสปายกลาสในการตัดชิ้นเนื้อภายใต้การมองเห็นที่ชัดเจนในตำแหน่งที่สงสัยภาวะท่อน้ำดีตีตันจากมะเร็งแบบ systematic review and meta-analysis(37) จาก 10 การศึกษาที่ทำในผู้ป่วย 456 คนพบ pooled sensitivity 60.1% และ pool specificity 98%



ภาพที่ 6 ภาพจากกล้องสปายกลาสที่เห็นลักษณะของท่อน้ำดีมีการขยายตัวและคดเคี้ยวของหลอดเลือด (tumor vessels)



ภาพที่ 7 A.ภาพฟลูออโรสโคปีแสดงลักษณะท่อน้ำดีที่มีความผิดปกติ (filling defect) หลังจากการฉีดสี B.ภาพจากกล้องสพายกลาสแสดงให้เห็นลักษณะก้อนในท่อน้ำดีในตำแหน่งที่มีความผิดปกติจากภาพฟลูออโรสโคปี

การวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งยังคงเป็นสิ่งที่ท้าทายเนื่องจากความไวในการวินิจฉัยค่อนข้างต่ำ ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการส่องกล้องสพายกลาสเพื่อเก็บชิ้นเนื้อ (Spybite®) ร่วมกับการส่งตรวจหาความผิดปกติโครโมโซมด้วย pancreatobiliary probe จากชิ้นเนื้อและเซลล์วิทยา ดังนั้นจึงเป็นการศึกษาแรกที่ประเมินความไวในการวินิจฉัยท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยจากมะเร็ง

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบวิจัย

Descriptive cross-sectional study

เพื่อศึกษาหาความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value), ค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) และความแม่นยำ (Accuracy) ในการวินิจฉัยโรคในกลุ่มผู้ป่วยที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนด้วยการส่องกล้องสลายกาสเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี Pancreaticobiliary fluorescence in situ hybridization (PB FISH)

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

สถานที่ : โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 1873 ถนน พระรามที่ 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

ประชากร(population)

ประชากรเป้าหมาย (Target population) ผู้ป่วยที่มีภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อน (malignant biliary stricture) ในประเทศไทย

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) ผู้ป่วยที่มีภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อน (malignant biliary stricture) ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์การคัดเลือกประชากรเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปมีภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีสามารถทำหัตถการส่องกล้องทางเดินน้ำดี (ERCP)

เกณฑ์การคัดเลือกประชากรออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีปัญหาสัญญาณชีพไม่คงที่ไม่พร้อมทำหัตถการส่องกล้องทางเดินน้ำดี
2. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยสาเหตุท่อน้ำดีตีบตันด้วยชิ้นเนื้อที่ตำแหน่งอื่น
3. สตรีตั้งครรภ์
4. ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือดโดยที่เกล็ดเลือดน้อยกว่า 80,000 /mm³ หรือการแข็งตัวของเลือด (INR) > 1.2 แม้ว่าได้รับการแก้ไขด้วยสารประกอบของเลือดอย่างเต็มที่แล้ว

3.3 ขนาดตัวอย่าง

การคำนวณตัวอย่าง (Sample size determination)

$$n = (Z^2 \alpha_{/2} P(1-P)) / d^2 p$$

n = ขนาดตัวอย่าง (จำนวนรอยโรค)

P = probability of expected sensitivity=0.8

A = ความผิดพลาดของการสรุปลักษณะประชากรจากค่าสถิติของตัวอย่างกำหนดให้เป็น 0.05

$Z\alpha_{/2}$ = ค่า Z ที่ระดับ alpha error two-tailed รวมกันมีค่าเท่ากับ 0.05 =1.96

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ ซึ่งให้เท่ากับ 0.15

p = prevalence = 90%

$$n = 1.96^2(0.8)(0.2)/(0.15)^2 0.9 = 30$$

3.4 ขั้นตอนการทำวิจัย

1. ติดต่อผู้ป่วยที่วินิจฉัยท่อน้ำดีตีบตันไม่ทราบสาเหตุที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์โดยปรึกษามายังหน่วยทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ.2559
2. ผู้ที่เข้าร่วมในการวิจัยทุกคนจะได้รับข้อมูลรายละเอียดของโครงการวิจัยโดยละเอียดและ ผู้เข้าร่วมวิจัยทุกคนต้องลงชื่อให้การยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (informed consent) ก่อนเริ่มทำการศึกษาวิจัย
3. นัดวันส่องกล้องท่อน้ำดีที่ห้องส่องกล้องทางเดินอาหารของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตึกภูมิสิริมังคลานุสรณ์ ชั้น 10 โดยให้ผู้ป่วยงดน้ำและอาหารอย่างน้อย 6 ชั่วโมงก่อนทำการส่องกล้องโดยในวันส่องกล้องปฏิบัติดังนี้
 - 1.1 จัดเครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ กล้องตรวจท่อน้ำดี กล้องสปายกลาสและยาต่างๆให้พร้อม
 - 1.2 พยาบาลทำการฉีดยาเพทริดีน (Pethidine) ขนาด 0.5 มก. ต่อน้ำหนักตัวผู้ป่วย 1 กก. และยามิดาโซแลม (midazolam) ขนาด 0.05 มก. ต่อน้ำหนักตัวผู้ป่วย 1 กก. เข้าสู่หลอดเลือดดำ
 - 1.3 แพทย์ทำการส่องกล้องท่อน้ำดีโดยการสอดกล้องตรวจท่อน้ำดีผ่านทางปากเข้าไปในส่วนที่สองลำไส้เล็กส่วนต้น (second part duodenum)

- 1.4 แพทย์ใส่สายสวนเข้าไปยังท่อน้ำดีรวมผ่านทางแอมพูลลาของวาเตอร์ (ampulla of Vater) โดยใช้ขดลวดนำ (guided wire) จนดูตได้น้ำดีผ่านทางสายสวนแปลว่าสายสวนและขดลวดเข้าไปอยู่ในท่อน้ำดีรวมแล้ว
- 1.5 แพทย์ทำการผ่าหูดท่อน้ำดีโดยการส่องกล้อง (endoscopic sphincterotomy) โดยใช้มีดผ่าตัดหูด (sphincterotomy)
- 1.6 แพทย์ทำการส่องกล้องสปายกลาส (Spyglass®) โดยสอดผ่านทางช่องอุปกรณ์ (working channel) ของกล้องตรวจท่อน้ำดี จากนั้นทำการประเมินลักษณะพยาธิสภาพของท่อน้ำดี (Direct visualization) พร้อมทำการเก็บภาพของท่อน้ำดี
- 1.7 แพทย์นำอุปกรณ์สำหรับตัดชิ้นเนื้อ (Spybite) โดยสอดผ่านทางช่องอุปกรณ์ของกล้องสปายกลาส จากนั้นทำการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณที่มีพยาธิสภาพ
- 1.8 แพทย์นำอุปกรณ์สำหรับเก็บเซลล์วิทยา (Brush cytology) สอดผ่านทางช่องอุปกรณ์ของกล้องสปายกลาสเพื่อทำการเก็บเซลล์วิทยา (Cytology) จากนั้นนำอุปกรณ์สำหรับเก็บเซลล์วิทยาไปจุ่มในสารเก็บเซลล์วิทยา (the ThinPrep® Non Gyn) (ภาพที่ 8) สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 8 สารเก็บเซลล์วิทยา (the ThinPrep® Non Gyn)

- 1.9 นำชิ้นเนื้อและเซลล์วิทยาส่งไปทำการวิเคราะห์เพื่อหาเซลล์มะเร็งโดย แพทย์พยาธิวิทยาที่เชี่ยวชาญ นอกจากนั้นยังนำชิ้นเนื้อไปตัดเพื่อนำลง แผ่นสไลด์จากนั้นทำการย้อมเซลล์โดยวิธี hybridization และติด pancreaticobiliary probe เพื่อหา abnormal chromosome โดย แพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านโครโมโซมที่ภาควิชาพยาธิ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยขั้นตอนการย้อมชิ้นเนื้อ FISH และขั้นตอน การย้อมเซลล์ FISH เป็นดังต่อไปนี้

ขั้นตอนการย้อมชิ้นเนื้อด้วยวิธีการตรวจโครโมโซมด้วย

pancreaticobiliary Fluorescence in situ hybridization (FISH)

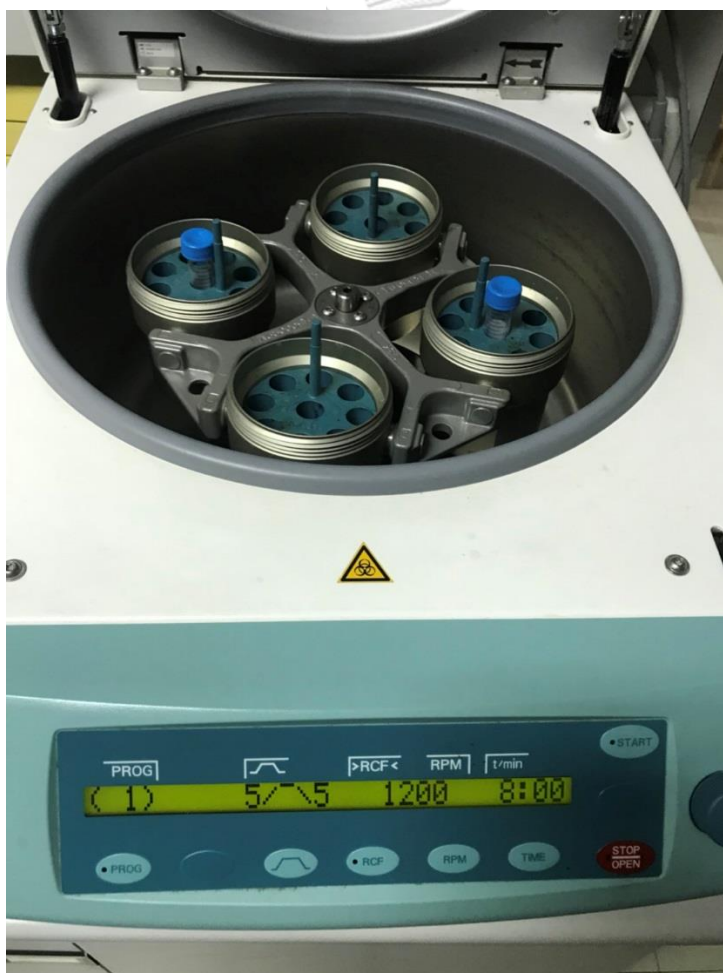
1. อบสไลด์ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
2. แช่สไลด์ในน้ำยา xyline เป็นเวลา 5 นาที ทั้งหมดสามครั้ง
3. แช่สไลด์ใน 100% alcohol 1 นาที จากนั้นตากให้แห้ง
4. แช่สไลด์ในน้ำยา pretreatment ที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 25 นาที
5. แช่สไลด์ใน purified water ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที
6. แช่สไลด์ในสารละลาย pepsin และ protease ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
7. แช่สไลด์ใน purified water ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที
8. แช่สไลด์ใน 70% EtOH, 85% EtOH, 100% EtOH อย่างละ 1 นาที ตามลำดับจากนั้นตากให้แห้ง
9. ทำการติด pancreaticobiliary probe บนสไลด์ปิดด้วย cover slip และ seal cover slip ด้วย rubber cement แล้วนำสไลด์อบที่ อุณหภูมิ 73 °C เป็นเวลา 5 นาทีต่อด้วยอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
10. นำ coverslip ออก
11. แช่สไลด์ใน สารละลาย 2X SCC/0.3% NP-40 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
12. แช่สไลด์ใน สารละลาย 2X SCC/0.3% NP-40 ที่อุณหภูมิ 73°C เป็นเวลา 2 นาที
13. ใส่ DAPI บริเวณชิ้นเนื้อแล้วปิด coverslip

14. นำสไลด์ไปอบที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที
15. นำสไลด์ไปดูภายใต้เครื่อง fluorescence เพื่อทำการวิเคราะห์ผลโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้าน chromosome

ขั้นตอนการย้อมเซลล์ด้วยวิธีการตรวจโครโมโซมด้วย pancreaticobiliary Fluorescence in situ hybridization(FISH) (8)

ขั้นตอนการเตรียมเซลล์

1. นำสารละลายเซลล์วิทยาประมาณ 50 มิลลิลิตรเทลงหลอดทดลองเพื่อนำไปปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที (Revolutions per minute) เป็นเวลา 8 นาที(ภาพที่9)



ภาพที่ 9 สารละลายเซลล์วิทยาประมาณ 50 มิลลิลิตรเทลงหลอดทดลองเพื่อนำไปปั่นที่ 2,000 รอบต่อนาที (Revolutions per minute)

2. นำสารละลายที่อยู่ด้านบน (Supernatant) ของหลอดทดลองออกให้เหลือสารละลายประมาณ 2-5 มิลลิลิตรโดยใช้ปิเปต พยายามอย่าดูดตะกอนของสารละลายออก (pellet)
3. ใส่ 3:1 metanol/acetic acid ปริมาณ 20 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเพื่อเป็นตัวตรึงเซลล์ (fixative)
4. เขย่าหลอดทดลองโดยใช้เครื่องเขย่า 5-15 วินาที
5. ปั่นหลอดทดลอง 1,200 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 8 นาที
6. ดูดสารละลายที่อยู่ด้านบนออกอย่างระมัดระวังให้เหลือสารละลายประมาณ 2 มิลลิลิตรโดยใช้ปิเปต ระวังอย่าดูดตะกอนออก
7. จากนั้นนำตะกอนที่เหลือ (Centrifuge specimen) มาเก็บใส่ไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge 1.8 ml) (ภาพที่10) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



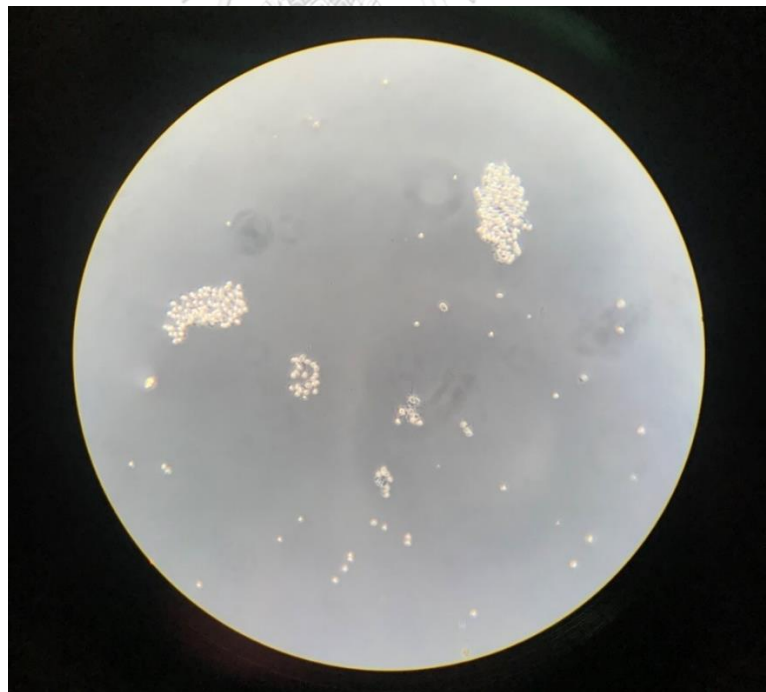
ภาพที่ 10 สารละลายเซลล์วิทยาที่ผ่านขั้นตอนการตรึงเซลล์และปั่นจนเหลือตะกอนที่บริเวณด้านใต้หลอดก่อนที่จะนำไปเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็ก(microcentrifuge)

ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ลงสไลด์

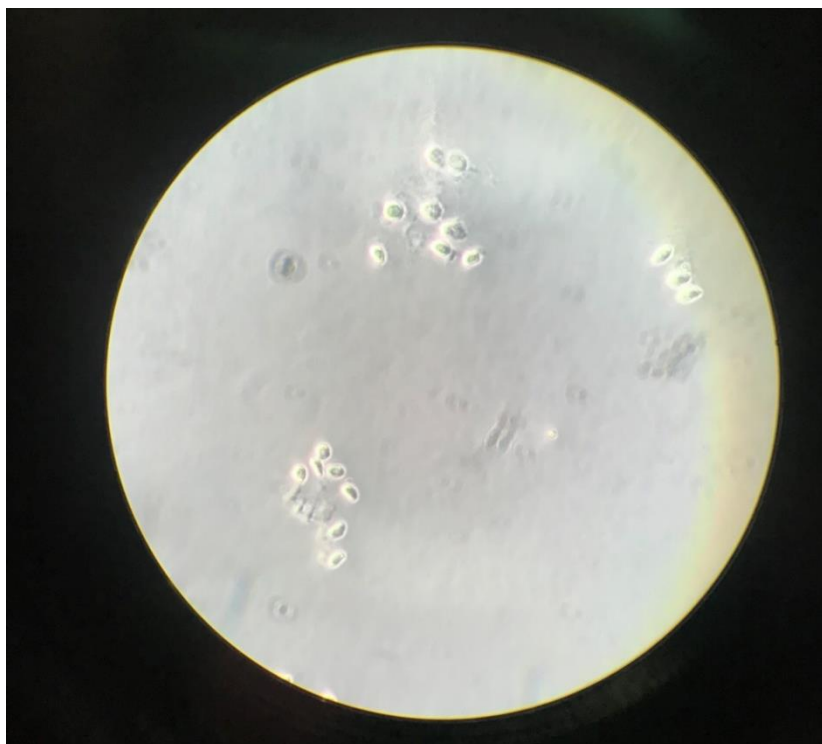
1. นำตะกอนที่เหลือ (Centrifuge specimen) ที่เก็บอยู่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge 1.8 ml) นำมาปั่นที่ 2,000 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เครื่อง Fisher Scientific accuSpin™
Micro Centrifuge

2. จากนั้นทำการนำสารละลายด้านบนตะกอนออกให้เหลือสารละลายกับตะกอนในหลอดเป็นสัดส่วน 1:1
3. เขย่าหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge 1.8 ml) ประมาณ 3-5 วินาที
4. นำสไลด์เปล่าไปอบในเครื่อง Thermotron ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ความชื้นที่ 60-70 เปอร์เซ็นต์
5. ดูดสารที่อยู่ในหลอดทดลองขนาดเล็กปริมาณ 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหยดลงสไลด์
6. นำเซลล์ที่หยดลงในสไลด์ไปส่องที่กล้องจุลทรรศน์เพื่อประเมินว่ามีเซลล์เพียงพอหรือไม่ ก่อนนำสไลด์ไปย้อมเซลล์ด้วย PB FISH probe เมื่อได้สไลด์ที่มีคุณภาพทำการวางสไลด์ในอุณหภูมิห้องเพื่อปล่อยให้สไลด์แห้ง (ภาพที่11-12)



ภาพที่ 11 ตัวอย่างสไลด์ที่มีเซลล์ที่มีคุณภาพ (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X)



ภาพที่ 12 ตัวอย่างสไลด์ที่มีเซลล์ที่มีคุณภาพ (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X)

ขั้นตอนการย้อมเซลล์ด้วยวิธีการตรวจโครโมโซมด้วย pancreaticobiliary Fluorescence in situ hybridization(FISH)

1. อบสไลด์ที่มีเซลล์ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
2. แช่สไลด์ในน้ำยา 2XSSC ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
3. แช่สไลด์ใน 0.5% pepsin in HCL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 13 นาที จากนั้นตากให้แห้ง
4. แช่สไลด์ในน้ำยา PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
5. แช่สไลด์ใน 70% EtOH ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
6. แช่สไลด์ใน 85% EtOH ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
7. แช่สไลด์ใน 100% EtOH ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นตากสไลด์ให้แห้ง
8. แช่สไลด์ในสารละลาย pepsin และ protease ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

9. ทำการติด pancreaticobiliary probe บนสไลด์ปิดด้วย cover slip และ zeal cover slip ด้วย rubber cement แล้วนำสไลด์อบที่อุณหภูมิ 76 °C เป็นเวลา 5 นาทีต่อด้วยอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง
10. นำ coverslip ออก
11. แช่สไลด์ใน สารละลาย 0.4X SCC/0.3% NP-40 ที่อุณหภูมิ 74°C เป็นเวลา 2 นาที
12. แช่สไลด์ใน สารละลาย 0.4X SCC/0.3% NP-40 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
13. ใส่ DAPI บริเวณชิ้นเนื้อแล้วปิด coverslip
14. นำสไลด์ไปอบที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที
15. นำสไลด์ไปดูภายใต้เครื่อง fluorescence (Olympus bx60) เพื่อทำการวิเคราะห์ผลโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้าน chromosome

3.5 การรวบรวมข้อมูล

เริ่มจากการเก็บข้อมูลพื้นฐานตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัย และข้อมูลการส่องกล้องท่อน้ำดีของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยจากสาขาวิชาระบบทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ผู้ดำเนินการวิจัยเป็นผู้เก็บข้อมูลและผู้บันทึกข้อมูล

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยได้แก่ เพศ, อายุ, ประวัติ, การแพทย์, โรคประจำตัว และค่าการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ
2. บันทึกระยะเวลาที่ทำหัตถการโดยเริ่มจับเวลาเมื่อใส่กล้องส่องตรวจท่อน้ำดีเข้าในปากของผู้ป่วยและสิ้นสุดการทำหัตถการเมื่อนำกล้องตรวจท่อน้ำดีออกจากปากผู้ป่วย บันทึกระยะเวลาที่ใช้กล้องสเปกตรัมในการตรวจท่อน้ำดีรวมถึงการทำหัตถการตัดชิ้นเนื้อและเก็บเซลล์วิทยา
3. บันทึกสัญญาณชีพในระหว่างทำหัตถการทุก 5-10 นาที
4. บันทึกภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นเช่น ภาวะลำไส้ทะลุ, ภาวะเลือดออกหลังการผ่าตัดท่อน้ำดี

น้ำดี

3.6 ข้อจำกัดในการวิจัย

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยเป็นผู้ป่วยที่เข้ามารักษาตัวที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์อาจจะไม่ได้เป็นตัวแทนของประชากรทั้งหมดในผู้ป่วยที่มาด้วยภาวะท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งสาเหตุของการเกิดท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งท่อน้ำดีอาจมีอุบัติการณ์แตกต่างกันตามภูมิภาคได้ ยกตัวอย่างเช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนืออุบัติการณ์การเกิดมะเร็งที่น้ำดีสูงกว่าภาคอื่นๆมาก เนื่องจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis Viverrini* ซึ่งอาจมีผลต่องานวิจัย อีกทั้งประเทศไทยมีอุบัติการณ์การเกิดท่อน้ำดีอักเสบแข็งปฐมภูมิ (primary sclerosing cholangitis) ต่ำมาก ซึ่งภาวะนี้พบบ่อยในประเทศแถบตะวันตกซึ่งภาวะนี้มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี จะเห็นได้ว่าความเสี่ยงของประเทศไทยและประเทศตะวันตกแตกต่างกัน นอกจากนี้ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการเลือกตามเกณฑ์ซึ่งไม่ได้รับการสุ่มเลือกเพื่อเข้าร่วมการวิจัย

3.7 การเปิดเผยข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วย

ข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วยจะถูกเก็บไว้เป็นความลับ จะไม่มีการนำข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วยไปเปิดเผยโดยเด็ดขาด สำหรับการนำข้อมูลไปวิเคราะห์จะใช้รหัสแทนตัวผู้ป่วยแต่ละรายในการตีพิมพ์ผลงานการวิจัย รวมถึงการนำเสนอผลงานวิชาการจะเสนอในภาพรวมของผลการวิจัย จะไม่มีการนำข้อมูลที่แสดงตัวตนของผู้ป่วยไปเปิดเผยโดยเด็ดขาด หากมีความจำเป็นต้องแสดงข้อมูลของผู้ป่วยจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยเป็นลายลักษณ์อักษรเท่านั้น

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูล continuous variable แสดงข้อมูลที่ได้เป็นค่าเฉลี่ย (Mean) และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)

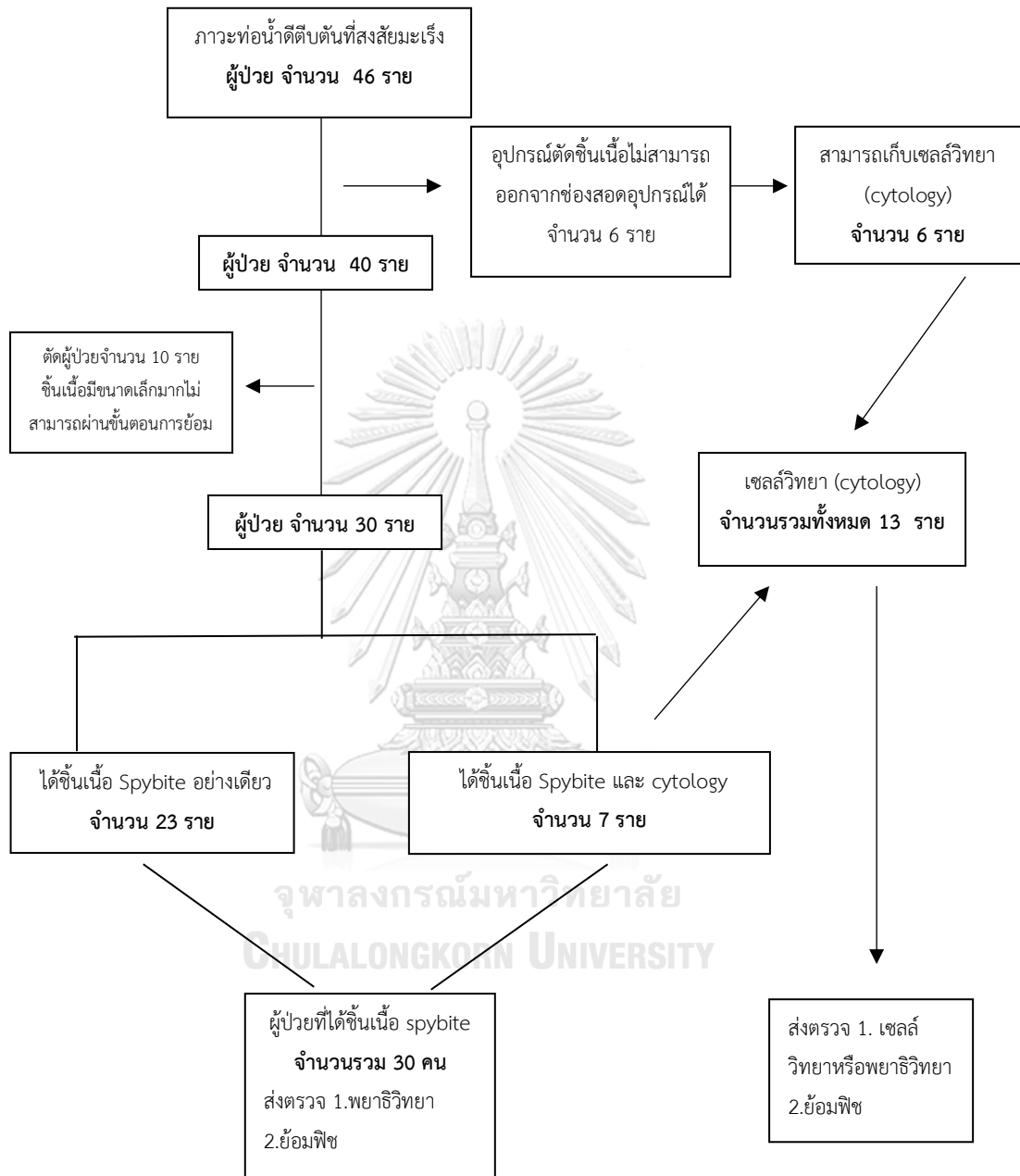
ข้อมูล categorical variable แสดงข้อมูลที่ได้เป็นจำนวนนับและร้อยละ (Percent) นำข้อมูลที่ได้หาค่าความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) ค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) และความแม่นยำ (accuracy) ในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตัน (malignant biliary stricture) ด้วยการส่องกล้องสลายท่อน้ำดีเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับการตรวจด้วยวิธี Fluorescence in situ hybridization (FISH) โดยเทียบกับการยืนยันวินิจฉัยด้วยชิ้นเนื้อ เซลล์วิทยา หรืออาการทางคลินิกที่ติดตามต่อเนื่อง (clinical progression)

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา

ผู้ป่วยจำนวน 46 คนที่มาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยภาวะท่อน้ำดีตีบตันไม่ทราบสาเหตุ ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 จนถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2561 เข้าเกณฑ์การวิจัยได้ถูกรวบรวมเพื่อเข้าร่วมการ มีผู้ป่วยจำนวน 46 คนที่เข้าร่วมในการวิจัยในครั้งนี้ โดยผู้ป่วยทุกรายให้ความยินยอมในการเข้าร่วมการวิจัย โดยผู้ป่วยทุกคนจะได้รับการส่องกล้องทางเดินน้ำดีด้วยกล้องส่องทางเดินน้ำดี (ERCP) ร่วมกับการใช้กล้องสลายกลาสกลอส (Spyglass®) ในการตัดชิ้นเนื้อภายใต้การมองเห็นท่อน้ำดีที่ชัดเจน (Spybite) ผู้ป่วยจำนวน 6 ราย เมื่อทำการส่องกล้องทางเดินน้ำดีร่วมกับสลายกลาส หลังจากนำอุปกรณ์ตัดชิ้นเนื้อสอดผ่านทางช่องอุปกรณ์กล้องสลายกลาสพบว่าเครื่องมือไม่สามารถผ่านเข้าท่อน้ำดีได้เนื่องจากท่อน้ำดีตีบตันมาก แต่สามารถใส่เครื่องมือเพื่อเก็บเซลล์วิทยา (brush cytology) ได้ และนำเซลล์นั้นไปตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธีพีช ผู้ป่วยจำนวน 10 คนสามารถตัดชิ้นเนื้อภายใต้การมองเห็นท่อน้ำดีที่ชัดเจน แต่เมื่อนำไปย้อมชิ้นเนื้อเพื่อตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธีพีชพบว่าชิ้นเนื้อชิ้นเล็กมากหรือมีความเสียหายจากการกระชากด้วยอุปกรณ์ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมได้ เหลือผู้ป่วยจำนวน 30 รายที่ทำการส่องกล้องทางเดินน้ำดีร่วมกับสลายกลาสและสามารถตัดชิ้นเนื้อเพื่อทำการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธีพีชได้ โดยผู้ป่วยจำนวน 7 รายจาก 30 รายได้รับการตรวจเซลล์วิทยา และนำเซลล์วิทยานั้นไปย้อมเพื่อหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธีพีช โดยจำนวนรวมของผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจด้วยเซลล์วิทยาและย้อมดูความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธีพีชมีจำนวน 13 คน ดังแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ภาพแสดงผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย

4.2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

ผู้ป่วยที่สงสัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันจำนวนทั้งสิ้น 30 คนที่เข้าร่วมการวิจัยโดยได้รับการส่องกล้องสลายท่อน้ำดีเพื่อตัดชิ้นเนื้อร่วมกับการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธีพีช โดยวินิจฉัยว่าสาเหตุเกิดจากมะเร็งจำนวน 27 ราย คิดเป็นร้อยละ 90 และสาเหตุที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็ง 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 10 โดยพบว่าเป็นเพศชาย 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.7 ของผู้ป่วยทั้งหมด และเป็นผู้หญิงทั้งหมด 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 53.3 ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยมีอายุเฉลี่ย 63.6 ปี (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 11.8 ปี) ระดับ CA19-9 ค่าเฉลี่ย 314.19 ยูนิตต่อมิลลิเมตร (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 194.3) ผู้ป่วยได้รับการส่องกล้องทางเดินน้ำดีด้วยข้อบ่งชี้ได้แก่ ภาวะเหลือง (obstructive Jaundice) จำนวน 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 93.3 และภาวะท่อน้ำดีตีบตัน จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.7 โดยไม่มีผู้ป่วยคนใดมีโรคประจำตัวหรือได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นท่อน้ำดีอักเสบแข็งปฐมภูมิ (Primary sclerosing cholangitis)

โดยผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่ามีภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งจำนวน 27 ราย โดยผู้ป่วยจำนวน 23 ราย คิดเป็นร้อยละ 85 ยืนยันการวินิจฉัยโดยชิ้นเนื้อ และผู้ป่วยจำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 15 ยืนยันการวินิจฉัยโดยติดตามอาการทางคลินิก เช่น น้ำหนักลดร่วมกับอาการเหลืองมากขึ้น หรือเมื่อติดตามด้วยการถ่ายภาพรังสีเห็นก้อนหรือต่อมน้ำเหลืองในระยะเวลา 1 ปี โดยผู้ป่วยภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งที่ยืนยันวินิจฉัยโดยชิ้นเนื้อจำนวน 23 รายพบว่าเป็นเพศชาย 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 52.2 ของผู้ป่วยทั้งหมด และเป็นผู้หญิงทั้งหมด 11 ราย คิดเป็นร้อยละ 47.8 ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยมีอายุเฉลี่ย 64.5 ปี (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 11.5 ปี) ระดับ CA19-9 ค่าเฉลี่ย 413.5 ยูนิตต่อมิลลิเมตร (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 409) และโดยผู้ป่วยภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งที่ยืนยันวินิจฉัยโดยอาการทางคลินิกหรือภาพถ่ายรังสีจำนวน 4 รายพบว่าเป็นเพศชาย 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 25 ของผู้ป่วยทั้งหมด และเป็นผู้หญิงทั้งหมด 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 75 ของผู้ป่วยทั้งหมด โดยผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยมีอายุเฉลี่ย 63.8 ปี (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 16.4 ปี) ระดับ CA19-9 ค่าเฉลี่ย 156.6 ยูนิตต่อมิลลิเมตร (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 142.6)

ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่ามีภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งจำนวน 27 ราย ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 55.6, มะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer) 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.1, มะเร็งท่อน้ำดีชนิดแปปิลารี (Intraductal papillary neoplasm of bile duct) 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.1, มะเร็งท่อน้ำดีและตับ

(Hepatocolangiocarcinoma) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.7, มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.7, มะเร็งแอมพูลลา (Ampullary cancer) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.7, มะเร็งจีสต์ (gastrointestinal stromal tumor (GIST)) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.7, มะเร็งเมลาโนมา (Malignant melanoma) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.7 และ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Diffuse large B cell lymphoma) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.7

ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่ามีภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งยื่นยื่นการวินิจฉัยโดยชิ้นเนื้อจำนวน 23 ราย ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 55.6, มะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.3, มะเร็งท่อน้ำดีชนิดแปปิลารี (Intraductal papillary neoplasm of bile duct) 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 13, มะเร็งท่อน้ำดีและตับ (Hepatocolangiocarcinoma) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.3, มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.3, มะเร็งแอมพูลลา (Ampullary cancer) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.3, มะเร็งจีสต์ (gastrointestinal stromal tumor (GIST)) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.3, มะเร็งเมลาโนมา (Malignant melanoma) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.3 และ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Diffuse large b cell lymphoma) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.3

ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่ามีภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งยื่นยื่นการวินิจฉัยโดยติดตามอาการทางคลินิกหรือภาพถ่ายรังสีวิทยาจำนวน 4 ราย ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 50 และมะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer) 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 50

ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่ามีภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็งจำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 10 ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากภูมิคุ้มกันชนิด IgG4 cholangitis 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.3, ภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากภูมิคุ้มกันชนิด Autoimmune cholangitis และภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากนิ่ว (CBD stone) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.3 (ตารางที่1) ผู้ป่วยทุกรายได้รับการติดตามครบ 1 ปีพบว่าไม่มีอาการเปลี่ยนแปลงทางคลินิกและภาพรังสีที่เข้าได้กับมะเร็ง

ตารางที่ 1 ตารางแสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่ร่วมการวิจัยการส่องกล้องสลายท่อน้ำดีเพื่อตัดชิ้นเนื้อ ร่วมกับการตรวจความผิดปกติโครโมโซมด้วยเทคนิคแพนครีทีโคบิโรอะรีพีซ (จำนวน 30 คน)

ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย	จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด (%)	ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งโดยยืนยันจากชิ้นเนื้อ, จำนวน(%)	ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งโดยการติดตามอาการทางคลินิก, จำนวน(%)
จำนวน	30 (100%)	23/27 (85%)	4/27 (15%)
เพศชาย	14 (46.7)	12 (52.2%)	1 (25%)
อายุ (ปี), ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	63.6 ± 11.8	64.5 ± 11.5	63.8 ± 16.4
CA19-9(u/mL), mean±SD	314.19 ± 194.3	413.5 ± 409	156.6 ± 142.6
วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็ง	27/30 (90)		
มะเร็งท่อน้ำดี	15 (55.6)	13 (55.6)	2 (50)
มะเร็งตับอ่อน	3 (11.1)	1 (4.3)	2 (50)
มะเร็งท่อน้ำดีชนิด Intraductal papillary neoplasm of bile duct(IPNB)	3 (11.1)	3 (13)	0
มะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อน	1 (3.7)	1 (4.3)	0
มะเร็งตับ	1 (3.7)	1 (4.3)	0
มะเร็งแอมพูลลารี	1 (3.7)	1 (4.3)	0
มะเร็งจีสต์ (GIST)	1 (3.7)	1 (4.3)	0
มะเร็งเมลาโนมา	1 (3.7)	1 (4.3)	0
มะเร็งต่อมไขมันเหลือง	1 (3.7)	1 (4.3)	0
ภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ใช่มะเร็ง	3 (10)	ไม่มีลักษณะมะเร็ง	

ผู้ป่วยที่สงสัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันจำนวนทั้งสิ้น 13 คนที่ได้รับการส่องกล้องร่วมกับการตรวจเซลล์วิทยา (brush cytology) วินิจฉัยว่าสาเหตุเกิดจากมะเร็งจำนวน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 92.3 และสาเหตุที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็ง 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.7 พบว่าเป็นเพศชาย 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 46.1 ของผู้ป่วยทั้งหมด และเป็นผู้หญิงทั้งหมด 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 53.9 ของผู้ป่วยทั้งหมด ผู้ป่วยมีอายุเฉลี่ย 64 ปี (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 14.8 ปี ไม่มีผู้ป่วยคนใดมีโรคประจำตัวหรือได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นท่อน้ำดีอักเสบแข็งปฐมภูมิ (Primary sclerosing cholangitis)

ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่ามีภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็ง ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 38.5, มะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer) 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 23.1, มะเร็งลำไส้ 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.4, มะเร็งท่อน้ำดีชนิดแปงปีลารี (Intraductal papillary neoplasm of bile duct) 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.6, และมะเร็งถุงน้ำดี 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.6 ผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่ามีภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็งจำนวน 1 ราย โดยได้รับการวินิจฉัยว่าภาวะท่อน้ำดีตีบตันจาก oriental cholangiohepatitis ดังตารางที่ 2

ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย	จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด (13 คน)
ผู้ชาย	6 (46.15%)
อายุ (ปี), ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบน	64 ± 14.8
การวินิจฉัย	
มะเร็งท่อน้ำดี	5 (38.5%)
มะเร็งตับอ่อน	3 (23.1%)
มะเร็งลำไส้	2 (15.4%)
มะเร็งถุงน้ำดี	1 (7.6%)
มะเร็งท่อน้ำดีชนิด Intraductal papillary neoplasm of bile duct (IPNB)	1 (7.6%)
ภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ใช่มะเร็ง : โรคท่อน้ำดีและตับอักเสบออกเลนทริล (Oriental cholangiohepatitis)	1 (7.6%)

4.3 การแปลผลความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคพีซ

ผู้วิจัยได้ทำการจำแนกความผิดปกติของโครโมโซมเป็นดังต่อไปนี้

1. Polysomy มีความผิดปกติของโครโมโซมโดยการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมมากกว่า 2 สัญญาณต่อตัวตรวจตรวจจับ (probe) อย่างน้อย 2 ตัวตรวจจับ โดยต้องมีความผิดปกติของเซลล์ อย่างน้อย 4 เซลล์

2. Tetrasomy มีความผิดปกติของโครโมโซมโดยการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมมากกว่า 2 สัญญาณต่อตัวตรวจจับ (probe) ทุกตัวตรวจจับ

3. Single locus gain with concurrent 9p21 loss มีความผิดปกติของโครโมโซมโดยการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมมากกว่า 2 สัญญาณ ในตัวตรวจจับ (probe) ใดตัวทดสอบหนึ่งของตัวทดสอบ 1q21, 7p12 or 8q24 ร่วมกับมีการลดลงหรือการหายของสัญญาณ 9p21 ในเซลล์นั้น

4. Single locus gain 1q21, 8q24 หรือ 9p21 มีความผิดปกติของโครโมโซมโดยการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมมากกว่า 2 สัญญาณ ในหนึ่งตัวตรวจจับ (probe) ของ 1q21 หรือ 8q24 หรือ 9p21 โดยที่ตัวตรวจจับอื่นมีจำนวนโครโมโซมปกติ

5. homozygous 9p21 loss มีความผิดปกติของโครโมโซมโดยมีการหายของโครโมโซมทั้งหมดในตัวตรวจจับ (probe) 9p21 โดยที่ตัวตรวจจับอื่นมีจำนวนโครโมโซมปกติ




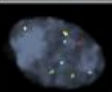

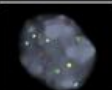
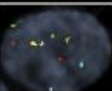
6. Single locus gain 7p12 มีความผิดปกติของโครโมโซมโดยการเพิ่มจำนวนของโครโมโซมมากกว่า 2 สัญญาณ ในตัวตรวจจับ (probe) 7p12

โดยกำหนดให้ผลการย้อมความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธีพีซเป็น (ภาพที่14)(15)

- ผลบวกเมื่อ polysomy อย่างน้อย 4 เซลล์
- ผลไม่ทราบแน่ชัด (equivocal) กำหนดการแปลผลเป็นลบ โดยการแสดงผลไม่ทราบแน่ชัดมีลักษณะดังต่อไปนี้
 - Tetrasomy อย่างน้อย 10% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด
 - Single locus gain with concurrent 9p21 loss อย่างน้อย 5% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด
 - Single locus gain 1q21, 8q24 หรือ 9p21 อย่างน้อย 8% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด
 - Homozygous 9p21 loss อย่างน้อย 5% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด
 - Single locus gain 7p12 อย่างน้อย 10% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด

- ลักษณะที่แปลผลไม่ได้ (Nondiagnostic pattern) ขึ้นเนื้อที่มีจำนวนเซลล์น้อยมากจนไม่สามารถทำการย้อมให้เห็นลักษณะเซลล์ (inadequate cellularity) หรือลักษณะเซลล์เสียมากจนไม่สามารถทำการ hybridization (failed hybridization)

โดยต้องนับเซลล์ที่มีการย้อมติด PB FISH probe ทั้ง 4 probe อย่างน้อย 100 cell (จึงถือว่าขึ้นเนื้อที่ทำการส่งตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมมีคุณภาพที่ดีพอในการแปลผลตรวจ

FISH Cell Type	FISH Result	Signal Pattern Definition	Signal Pattern Example				FISH Cell Example	Cutoff Value
			1q21	7p12	8q24	9p21		
Disomy	Negative	2 copies of each probe	2	2	2	2		NA
Polysomy	Positive	≥3 copies of 2 or more probes, excluding tetrasomy	12	3	3	2		≥4 cells on entire slide
Tetrasomy	Equivocal	4 copies of each probe	4	4	4	4		≥10%*
Single Locus Gain with 9p21 Loss	Equivocal	≥3 copies of one locus, 0-1 copy 9p21 and 2 copies of other probes	2	2	3	1		≥5%*
Homozygous 9p21 Loss	Equivocal	0 copies of 9p21 and 2 copies of other probes	2	2	2	0		≥5%*
Single Locus Gain 1q21, 8q24 or 9p21	Equivocal	≥3 copies of 1q21, 8q24, or 9p21 and 2 copies of other probes	3	2	2	2		≥8%*
Single Locus Gain 7p12	Equivocal	≥3 copies of 7p12 and 2 copies of other probes	2	3	2	2		≥10%*

ภาพที่ 14 ตารางแสดงผลการแปลผลความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (15)

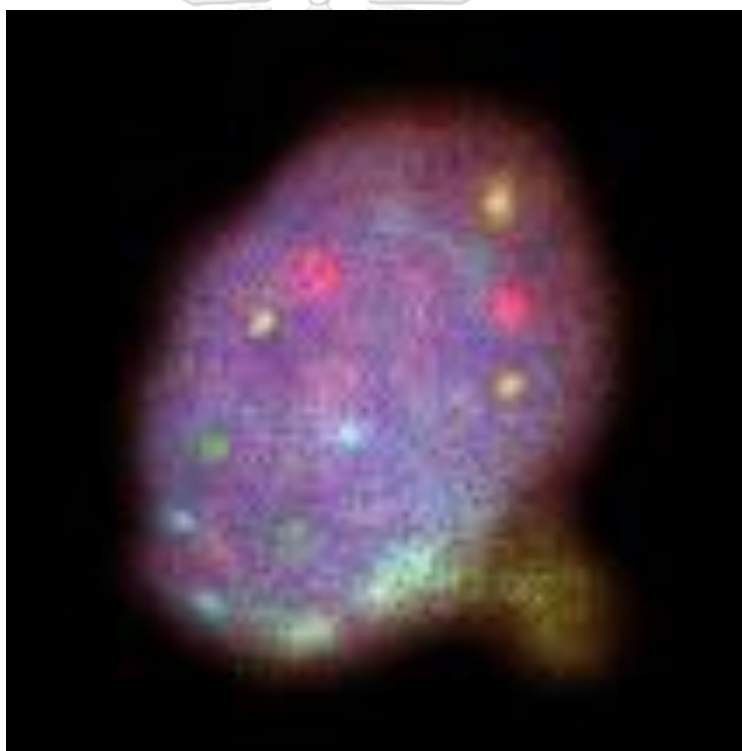
4.4 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยการตรวจหาผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช

4.4.1 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH)

ผลการย้อมชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสเพื่อหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชพบผลเป็นบวก (polysomy)(ภาพที่15) 28 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 30 ราย โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งทั้งหมด 26 ราย และ

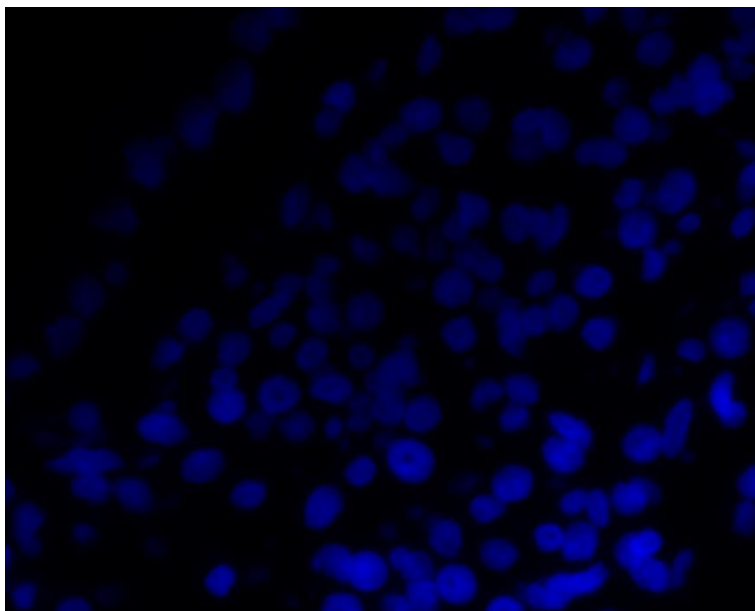
ภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็งจำนวน 2 ราย ได้แก่ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากภาวะภูมิคุ้มกันชนิด IgG4 cholangitis และ CBD stone โดยผู้ป่วยทั้งสองรายได้รับการติดตามครบ 1 ปีโดยไม่แสดงความผิดปกติหรือมีความเปลี่ยนแปลงทางคลินิกและภาพถ่ายรังสี (ตารางที่ 3)

ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 96.3, ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 33.3, ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) ร้อยละ 92.3 ค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) ร้อยละ 50 และความแม่นยำ (accuracy) ร้อยละ 90

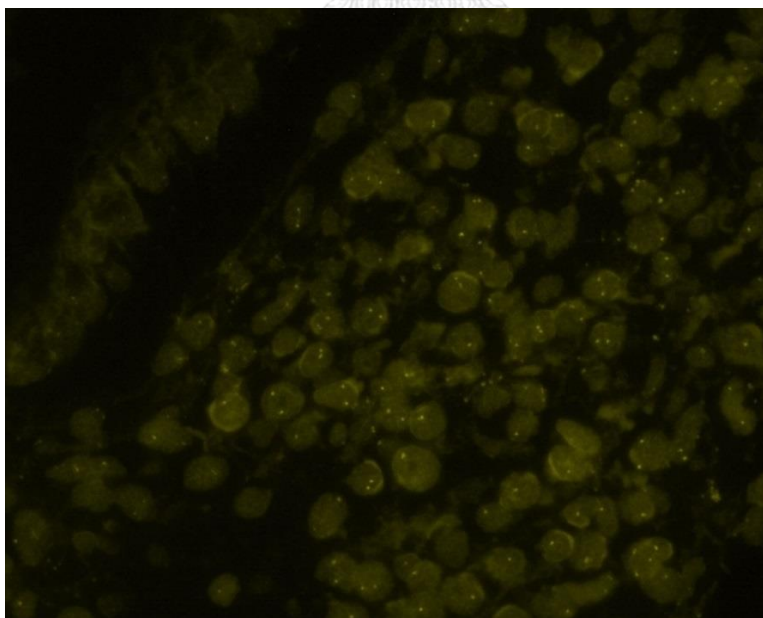


ภาพที่ 15 การตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) ให้ผลบวกด้วย PB probe โดย probe1q21 มีจำนวนโครโมโซม 3 copies (สีเหลือง), Probe 8q24 มีจำนวน 3copies (สีฟ้า) มีจำนวนเพิ่มของโครโมโซมต่อตัวตรวจจับ (Probe) ส่วน Probe7p12 มีจำนวน 2 copies (สีเขียว) และ 9p21 มีจำนวน 2 copies แสดงจำนวนโครโมโซมปกติ (สีแดง)

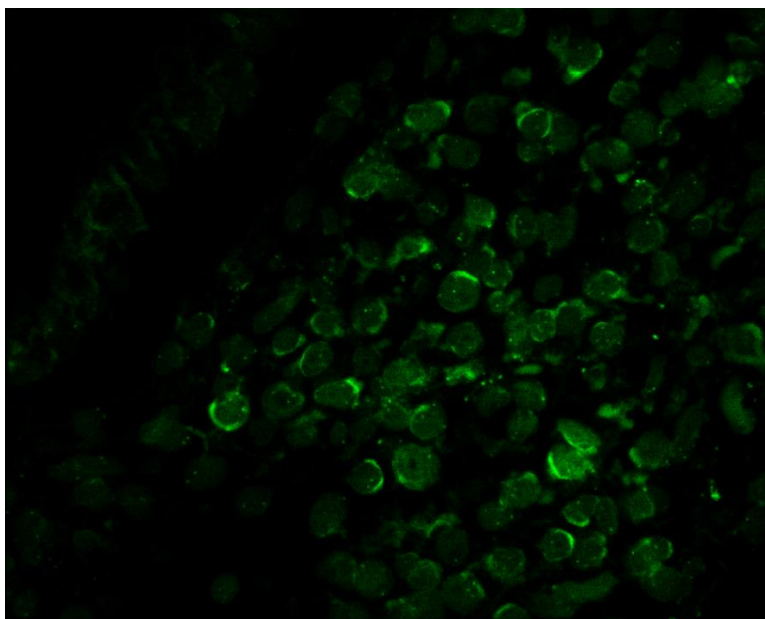
ตัวอย่างที่ 1 การตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) จากผู้ป่วยที่วินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดี (ภาพที่ 16-21)



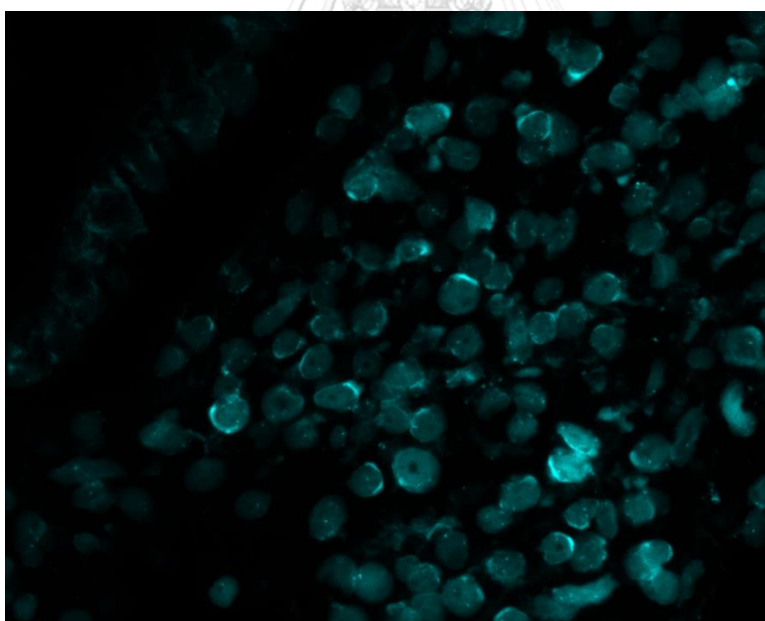
ภาพที่ 16 ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสง DAPI แสดงให้เห็นขอบเขตและลักษณะเซลล์ก่อนทำการอ่านสัญญาณ (signal) แต่ละตัวตรวจจับ (probe)



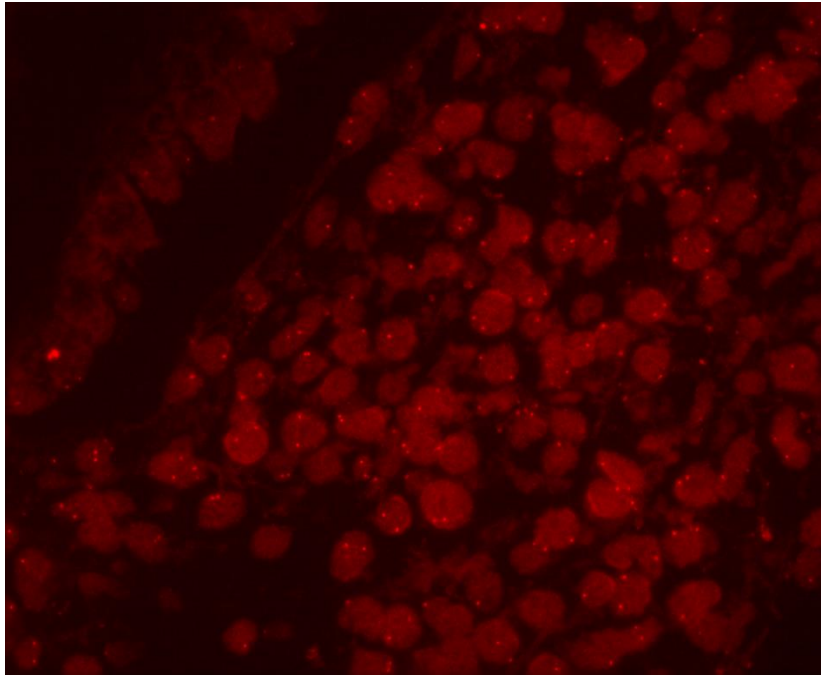
ภาพที่ 17 ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีเหลือง (spectrum gold) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 1q21 (probe, labelled with Spectrum Gold)



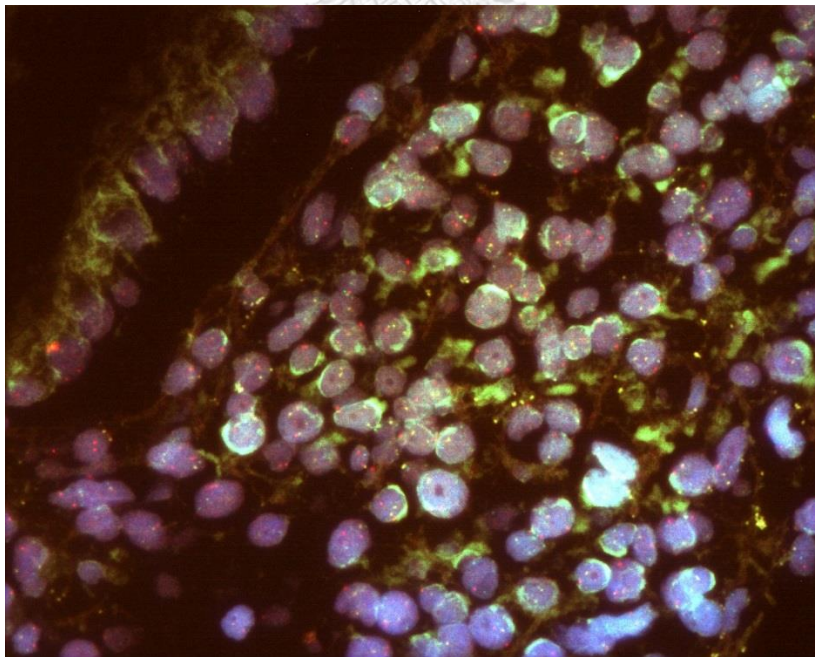
ภาพที่ 18 ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีเขียว (spectrum green) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 7p12 (probe, labelled with Spectrum Green)



ภาพที่ 19 ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีฟ้า (spectrum aqua) probe ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 8q24 (probe, labelled with Spectrum Aqua)

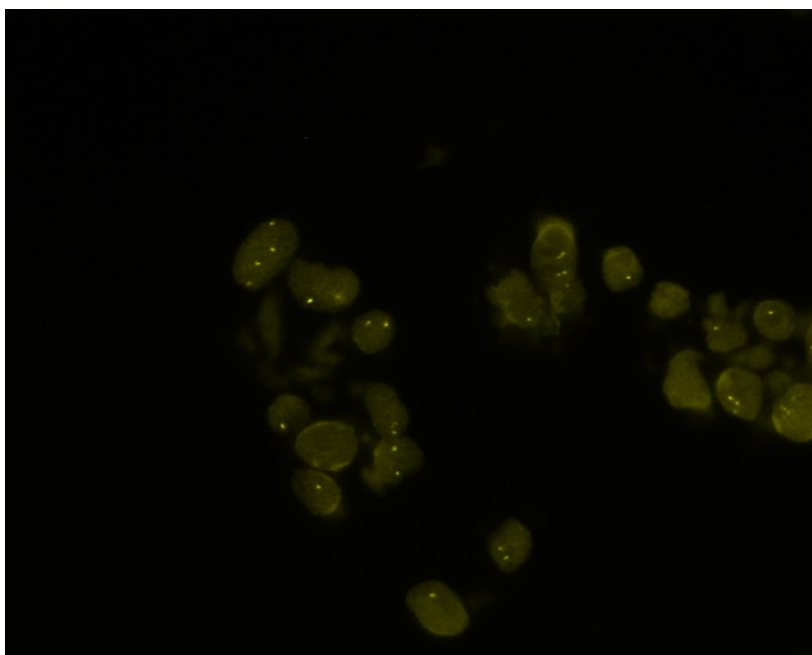


ภาพที่ 20 ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีแดง (spectrum red) probe ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 9p21 locus (LST 9p21, probe, Spectrum Red)

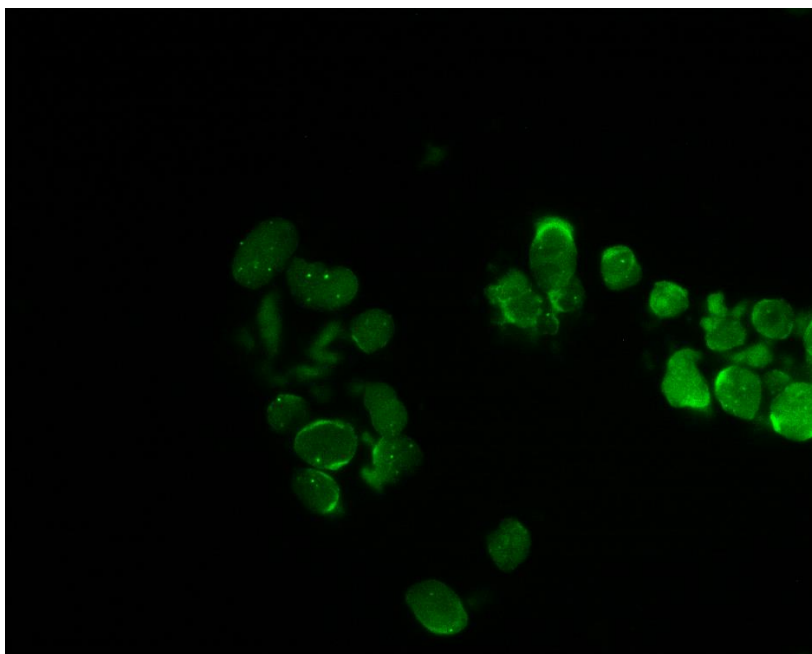


ภาพที่ 21 ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ภายใต้อุปกรณ์ตัวกรองแสง

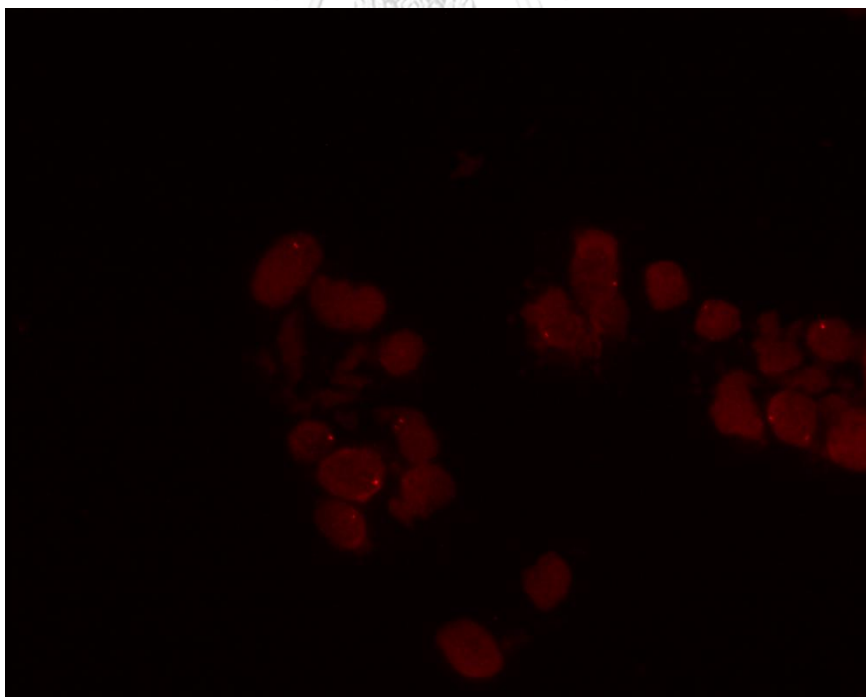
ตัวอย่างที่ 2 การตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) จากผู้ป่วยที่วินิจฉัยมะเร็งรังไข่ชนิดน้ำดี (ภาพที่ 22-26)



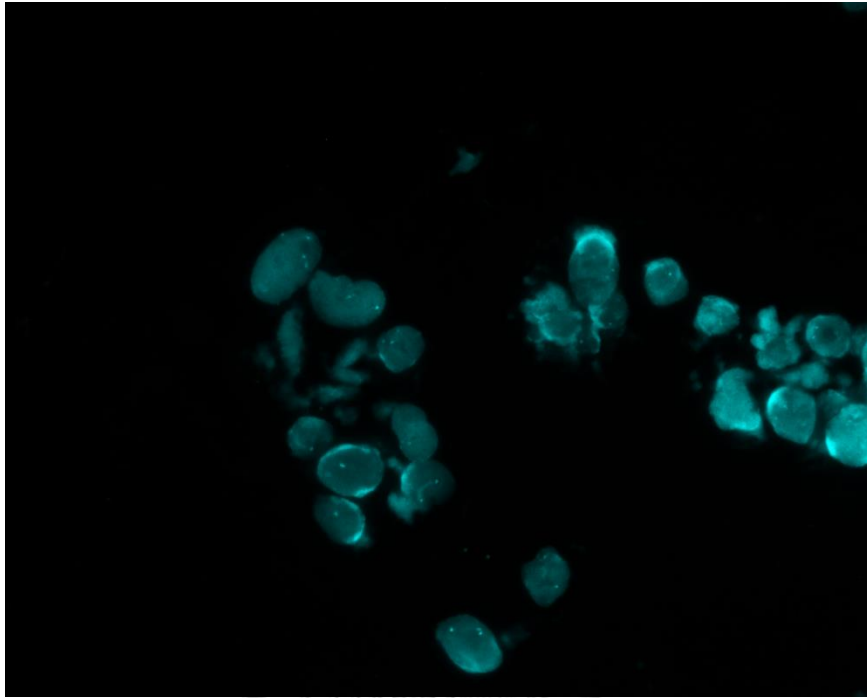
ภาพที่ 22 ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีเหลือง (spectrum gold) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 1q21 (probe, labelled with Spectrum Gold)



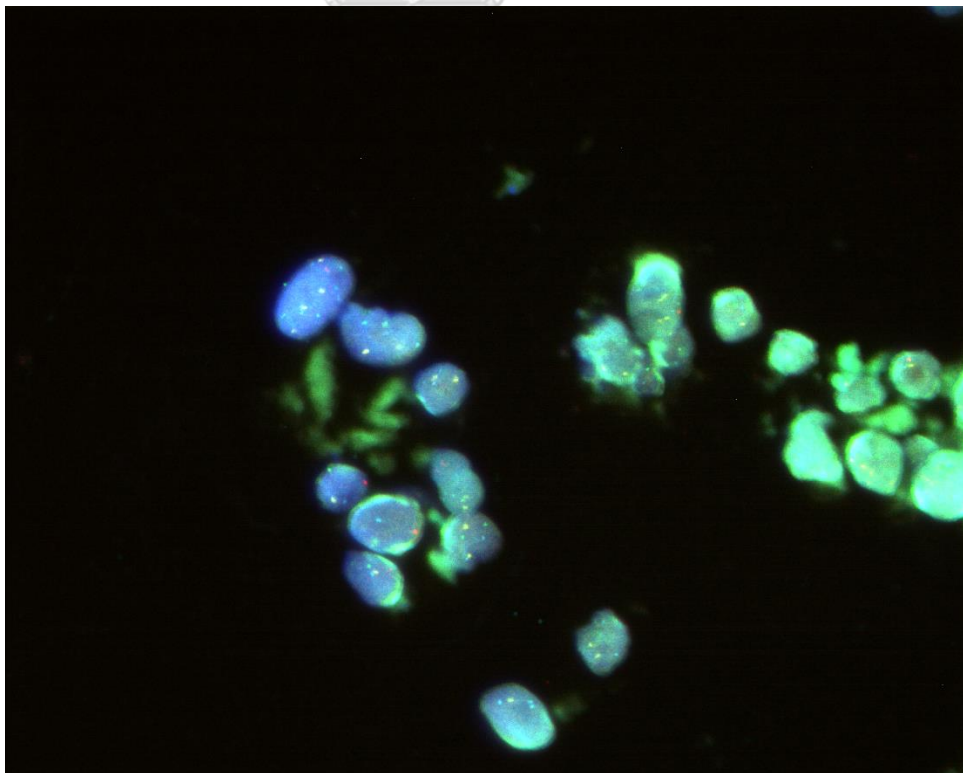
ภาพที่ 23 ภาพขึ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีเขียว (spectrum green) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 7p12 (probe, labelled with Spectrum Green)



ภาพที่ 24 ภาพขึ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีแดง (spectrum red) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 9p21 locus (LST 9p21, probe, Spectrum Red)



ภาพที่ 25 ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ตัวกรองแสงสีฟ้า (spectrum aqua) ตัวตรวจจับ (Probe) จะจับกับโครโมโซม 8q24 (probe, labelled with Spectrum Aqua)



ภาพที่ 26 ภาพชิ้นเนื้อที่ย้อมดูภายใต้กล้อง Fluorescence ภายใต้ทุกตัวกรองแสง

ตารางที่ 3 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคซิปซ (Spybite FISH)

ผล FISH	กลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยมะเร็ง (n=27)	กลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยที่ไม่ใช่ มะเร็ง (n=3)	จำนวนทั้งหมด
Positive	26	2	28
Negative	1	1	2
	27	3	30

4.4.2 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยชิ้นเนื้อการส่องกล้องสลายกลาส (Spybite biopsy)

ผลการตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสทางพยาธิวิทยาในผู้ป่วยทั้งหมด 30 ราย ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาสามารถวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งได้ 17 ราย ได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) 9 ราย, มะเร็งท่อน้ำดีชนิดแปปิลารี (Intraductal papillary neoplasm of bile duct) 3 ราย, มะเร็งท่อน้ำดีและตับ (Hepatobiliary carcinoma) 1 ราย, มะเร็งแอมพูลลา (Ampullary cancer) 1 ราย, มะเร็งจีสต์ (gastrointestinal stromal tumor (GIST)) 1 ราย, มะเร็งเมลาโนมา (Malignant melanoma) 1 ราย และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Diffuse large b cell lymphoma) 1 ราย ดังแสดงตารางที่ 4

ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 62.9, ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) ร้อยละ 100 ค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) ร้อยละ 21.3 และความแม่นยำ (accuracy) ร้อยละ 66.7

ตารางที่ 4 ตารางแสดงความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยการตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสด้วยพยาธิวิทยา (Spybite biopsy)

ผลพยาธิวิทยา	กลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยมะเร็ง (n=27)	กลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยที่ไม่ใช่มะเร็ง (n=3)	จำนวนทั้งหมด
มะเร็ง	17	0	17
ไม่ใช่มะเร็ง	10	3	13
	27	3	30

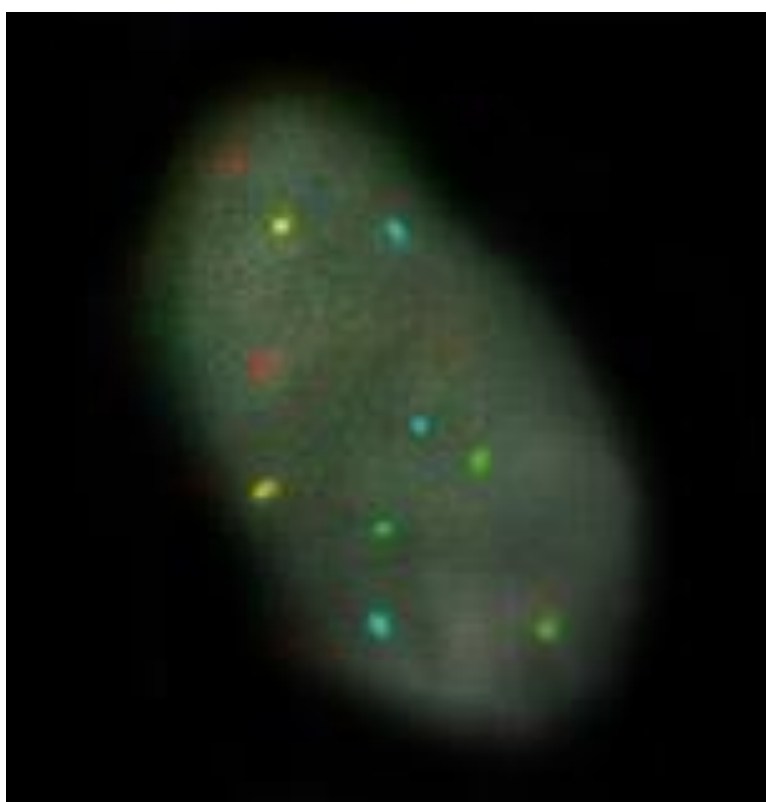
4.4.3 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยเซลล์วิทยา ร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (FISH brushing)

ผลการย้อมเซลล์เพื่อหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชพบผลเป็นบวก (polysomy) ในผู้ป่วยทั้งหมด 9 ราย (ภาพที่ 27-28) ได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) 3 ราย (มะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer) 2 ราย, มะเร็งท่อน้ำดีชนิดแปปิลลารี (Intraductal papillary neoplasm of bile duct) 1 ราย, มะเร็งลำไส้ (Colon cancer) 2 ราย และมะเร็งถุงน้ำดี (Gallbladder cancer) 1 ราย โดยไม่พบผลเป็นบวกในภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็ง ดังแสดงตารางที่ 5

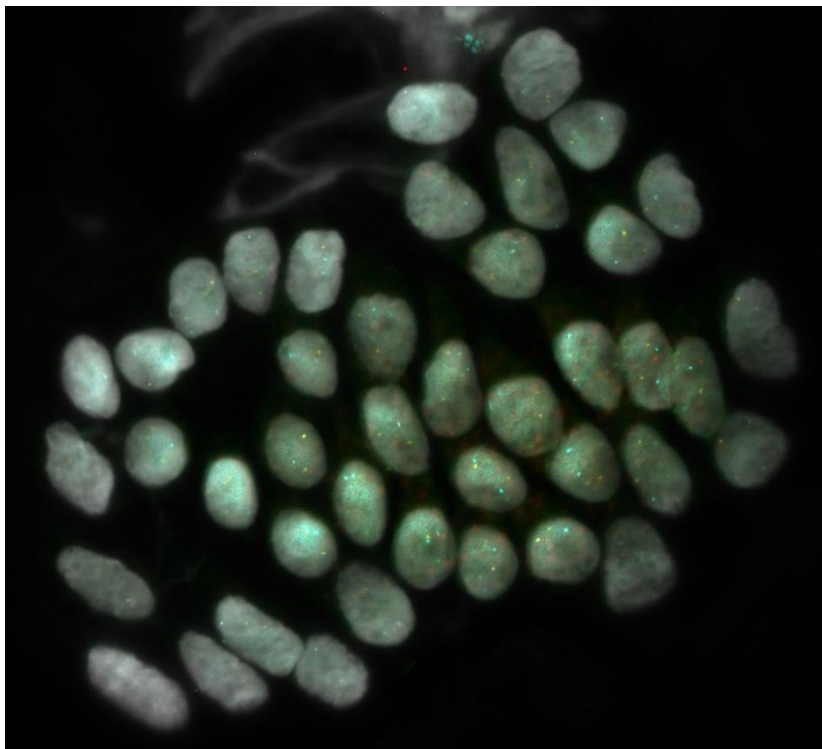
ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 75, ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) ร้อยละ 100 ค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) ร้อยละ 25 และความแม่นยำ (accuracy) ร้อยละ 76.9

ตารางที่ 5 ตารางแสดงความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยเซลล์วิทยา ร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (FISH brushing)

ผล FISH	กลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยมะเร็ง (n=12)	กลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยที่ไม่ใช่ มะเร็ง (n=1)	จำนวนทั้งหมด
Positive	9	0	9
Negative	3	1	4
	12	1	13



ภาพที่ 27 การตรวจเซลล์วิทยา ร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) ให้ผลบวกด้วย PB probe โดย Probe7p12 (สีเขียว) มีจำนวน 3 copies, Probe 8q24 มีจำนวน 3 copies (สีฟ้า) มีจำนวนเพิ่มของโครโมโซมต่อตัวตรวจจับ (Probe) ส่วน probe1q21 มีจำนวนโครโมโซม 2 copies (สีเหลือง) และ 9p21 มีจำนวน 2 copies แสดงจำนวนโครโมโซมปกติ (สีแดง)



ภาพที่ 28 ภาพตัวอย่างกลุ่มเซลล์จากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ตรวจเซลล์วิทยา ร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคพีซีซีมีผลการย้อมเป็นบวก

4.4.4 ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งด้วยเซลล์วิทยา (Brush cytology)

ผลการตรวจเซลล์ทางพยาธิวิทยาในผู้ป่วยทั้งหมด 13 ราย ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาสามารถวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งได้ 4 ราย ได้แก่ มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) 1 ราย, มะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer) 2 ราย, และมะเร็งถุงน้ำดี (Gallbladder cancer) 1 ราย ดังแสดงตารางที่ 6

ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งมีความไว (sensitivity) ร้อยละ 33.3, ความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) ร้อยละ 100 ค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) ร้อยละ 11.1 และความแม่นยำ (accuracy) ร้อยละ 38.5

ตารางที่ 6 ความสามารถของเซลล์วิทยา (Brush cytology) ในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง

ผลพยาธิวิทยา	กลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยมะเร็ง (n=12)	กลุ่มผู้ป่วยที่วินิจฉัยที่ไม่ใช่ มะเร็ง (n=1)	จำนวนทั้งหมด
มะเร็ง	4	0	4
ไม่ใช่มะเร็ง	8	1	9
	12	1	13

ตารางที่ 7 ตารางสรุปความสามารถของสิ่งส่งตรวจในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง

ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	ความไว (%)	ความจำเพาะ (%)	ค่าพยากรณ์บวก (%)	ค่าพยากรณ์ลบ (%)	ความแม่นยำ (%)
Spybite FISH	96.3	33.3	92.3	50	90
Spybite biopsy	62.3	100	100	23.1	66.7
FISH brushing	75	100	100	25	76.9
Brush cytology	33.3	100	100	11.1	38.5

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกในการนำกล้องสลายกลาสเพื่อทำการตัดชิ้นเนื้อภายใต้การมองเห็นที่ชัดเจนร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) ในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีตันที่สงสัยมะเร็ง จะเห็นได้ว่าความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีตันเท่ากับร้อยละ 96.3 ซึ่งพบว่ามีค่าความไวสูงมากในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีตันที่เกิดจากมะเร็ง นอกจากนี้การศึกษานี้ยังศึกษาความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีตันที่สงสัยมะเร็งด้วยสิ่งส่งตรวจอื่นๆ ได้แก่ ตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากกล้องสลายกลาสด้วยพยาธิวิทยา (Spybite), การตรวจเซลล์วิทยา ร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (FISH brushing) และการตรวจเซลล์ โดยพยาธิวิทยา (cytology) พบว่าความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีตันเท่ากับ ร้อยละ 62.9 ร้อยละ 75 และร้อยละ 33.3 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าการตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) มีความไวสูงมากในการช่วยวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีตันที่เกิดจากมะเร็งเมื่อเทียบกับสิ่งส่งตรวจอื่น ซึ่งการนำ Spybite FISH มาใช้ทางคลินิกร่วมกับการตรวจทางพยาธิวิทยาจากชิ้นเนื้อ (Spybite) สามารถเพิ่มความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีตันที่เกิดจากมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผู้ป่วยจะได้รับการวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็วมากขึ้นส่งผลให้ได้รับการรักษาได้ถูกต้องและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการนำ UroVysion FISH probe ตรวจความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ (cytology) มาใช้ทางคลินิกเพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีตันที่เกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนแทนการใช้เซลล์วิทยาในการวินิจฉัยเพียงอย่างเดียว ซึ่งจากหลายการศึกษาพบว่า การนำ UroVysion FISH probe มีประโยชน์มากในการเพิ่มความสามารถในการวินิจฉัยโรค (23, 27, 38, 39) ดังนั้นการศึกษาต่อมาจึงพัฒนา probe ที่มีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนมากขึ้น นั่นคือ Pancreaticobiliary FISH probe (PB FISH probe) โดยความสามารถของ PB FISH probe มีความไวร้อยละ 64.7 ในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำตีตันที่เกิดจากมะเร็งมากกว่าเมื่อเทียบกับ UroVysion FISH probe ที่มีความไวร้อยละ 45.9 (64.7% VS 45.9%, $P < 0.001$) (15)

ตารางที่ 8 ตารางสรุปผลความไวและความจำเพาะของสิ่งส่งตรวจในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง

ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)
Spybite FISH	26/27 (96.3%) (86.28%-100%)	1/3 (33.33%) (0.84%-90.57%)
Spybite biopsy	17/27 (62.9%) (38.67%-78.87%)	3/3 (100%) (29.24%-100%)
FISH brushing	9/12 (75%) (42.81%-94.51%)	1/1 (100%) (2.5%-100%)
Cytology	4/12 (33.33%) (9.09%-61.43%)	1/1 (100%) (2.5%-100%)

จากการศึกษานี้พบว่า การตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคพีช (Spybite FISH) มีความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งถึงร้อยละ 96.3 เนื่องมาจาก probe มีความจำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนมาก อีกทั้งการใช้กล้องสลายกลาสสามารถตัดชิ้นเนื้อบริเวณที่สงสัยว่ามีความผิดปกติที่เกิดจากมะเร็ง เมื่อประกอบกับการตรวจชิ้นเนื้อที่สงสัยความผิดปกติร่วมกับการใช้ probe ที่มีความจำเพาะมาก ทำให้ความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันได้สูงมาก

จากการศึกษานี้พบว่า การตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากกล้องสลายกลาสด้วยพยาธิวิทยา (Spybite) มีความสามารถในการวินิจฉัยท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งได้ร้อยละ 62.8 ความจำเพาะ 100% เมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การศึกษาประสิทธิภาพของกล้องสลายกลาสในการตัดชิ้นเนื้อภายใต้การมองเห็นที่ชัดเจนในตำแหน่งที่สงสัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็ง (37) โดย systematic review and meta-analysis 10 การศึกษาที่ทำในผู้ป่วย 456 คน พบ pooled sensitivity 60.1% และความจำเพาะ 98% พบว่าความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งไม่มีความแตกต่างกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ส่วนการตรวจเซลล์พยาธิวิทยา (cytology) ในการศึกษาที่มีความสามารถในการวินิจฉัยท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งได้ร้อยละ 33.3 ความจำเพาะ 100% เมื่อเทียบการศึกษาแบบ systematic review and meta-analysis ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการส่องกล้องท่อน้ำดีเพื่อเก็บเซลล์วิทยา (brush cytology) ในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งจากทั้งหมด 9 การศึกษาจำนวนคนไข้ 730 คน(5) พบว่าความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันรวมด้วยเซลล์วิทยา (pooled sensitivity of brush cytology) เท่ากับ 45% (26-66%)

ข้อมูลจากการวิจัยนี้ยังคงแสดงให้เห็นว่าการตรวจเซลล์พยาธิวิทยาเพียงอย่างเดียวมีความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งได้ต่ำมาก

ในแง่ความเหมาะสมของสิ่งส่งตรวจพบว่า การตรวจชิ้นเนื้อจากการส่องกล้องสลายกลาส ร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) มีความไวร้อยละ 96.3 และจากการตรวจเซลล์วิทยาร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (FISH brushing) ร้อยละ 75 อาจสรุปได้ว่าการตรวจชิ้นเนื้อเมื่อเทียบกับเซลล์มีความเหมาะสมในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนมากกว่าถ้าพิจารณาจากความไวเพียงอย่างเดียว แต่ข้อจำกัดคือจะต้องได้ชิ้นเนื้อที่เหมาะสมที่ทำการย้อมความผิดปกติของโครโมโซมได้ ไม่เล็ก และไม่มีความเสียหายจากการตัดชิ้นเนื้อ อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยจำนวน 2 คนได้แก่ ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากภาวะภูมิคุ้มกันชนิด IgG4 cholangitis และ CBD stone โดยมีการติดตามผู้ป่วยทั้งสองคนครบ 1 ปี มีผลการตรวจชิ้นเนื้อด้วยกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติด้วยเทคนิคฟิช (Spybite FISH) เป็นผลบวก ซึ่งส่งผลให้ความจำเพาะของการตรวจ Spybite FISH ลดลงเป็นอย่างมาก แต่เนื่องจาก Spybite FISH เป็นเครื่องมือที่มีความไวมากในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง อาจเกิดจากความสามารถในการตรวจเจอความผิดปกติของโครโมโซมได้อย่างรวดเร็วแม้จะไม่มี ความผิดปกติของเซลล์ก็สามารถตรวจจับความผิดปกติในระดับนิวเคลียสได้ ดังนั้นการติดตามผู้ป่วยทั้งสองรายอย่างใกล้ชิดเป็นสิ่งจำเป็น

ความสามารถของการตรวจเซลล์วิทยาร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (FISH brushing) ในการศึกษาที่มีความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งสูงถึงร้อยละ 75 ความจำเพาะร้อยละ 100 ซึ่งมีความไวมากกว่าเมื่อเทียบกับการศึกษาแบบทบทวน (review) การตรวจความผิดปกติของโครโมโซมในการวินิจฉัยมะเร็งในกลุ่มท่อน้ำดีและตับอ่อนด้วยเซลล์ ซึ่งพบความไวของ FISH ในการวินิจฉัยเท่ากับ 38-47% ความจำเพาะ 89-100%(8, 24-27) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Roongruedee Chaiteerakij และคณะที่ศึกษาถึงความสามารถในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนในประเทศไทย พบว่ามีความไวของการตรวจเซลล์ร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วย UroVysion FISH probe มีความไวในการวินิจฉัยแค่ร้อยละ 55 (28) ซึ่งการศึกษานี้มีความไวสูงมากกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงร้อยละ 20 เหตุผลอธิบายได้จากการศึกษาที่ใช้ PB probe ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมในกลุ่มมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อน ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Roongruedee Chaiteerakij และคณะที่ใช้ UroVysion probe ที่เริ่มจากการใช้ในการตรวจหาความผิดปกติของเซลล์ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่ง probe มีความจำเพาะในการวินิจฉัยน้อยกว่า นอกจากนี้กลุ่มคนไข้ในวิจัยนี้มีภาวะท่อน้ำดีตีบตันจากมะเร็งทุกรายเป็นระยะลุกลาม

ซึ่งอาจส่งผลให้ตรวจพบความผิดปกติระดับโครโมโซมได้สูงกว่าผู้ป่วยที่มีระยะมะเร็งไม่ลุกลาม ทำให้ผลการตรวจพบความผิดปกติในอัตราที่สูงกว่าการศึกษาที่ผ่านมา

5.2 สรุปผลการวิจัย

โดยสรุปการตรวจชิ้นเนื้อด้วยกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซม (Spybite FISH) สามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งได้ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยได้มากกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจชิ้นเนื้อที่ได้จากกล้องสลายกลาสด้วยพยาธิวิทยา (Spybite), การตรวจเซลล์วิทยาร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิช (FISH brushing) และการตรวจเซลล์พยาธิวิทยา (cytology) ดังนั้นการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชสามารถนำมาใช้ในการช่วยวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งในระยะแรกได้เมื่อใช้ร่วมกับการตรวจชิ้นเนื้อจากกล้องสลายกลาสด้วยพยาธิวิทยา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทางคลินิกแก่ผู้ป่วยที่มาด้วยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งในการวางแผนและการรักษาผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

5.3 ข้อดีของการศึกษานี้

1. การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ตรวจชิ้นเนื้อจากกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมโดยเทคนิคฟิช ซึ่งการศึกษานี้สามารถยืนยันว่าการตรวจหาความผิดปกติด้วยเทคนิคฟิชสามารถตรวจได้ในชิ้นเนื้อที่มีขนาดเล็กขนาด 2 มิลลิเมตรได้
2. การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกในระดับนานาชาติที่ทำการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชจากชิ้นเนื้อที่ได้มาจากการส่องกล้องทางเดินน้ำดีและกล้องสลายกลาสในผู้ป่วยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยจากมะเร็ง ซึ่งให้ผลการศึกษาเป็นบวก ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาที่มีคุณค่าและสามารถที่จะพัฒนาห้องปฏิบัติการและการส่งตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคฟิชให้เป็นการตรวจทางคลินิกที่แพร่หลายในอนาคตต่อไป
3. การศึกษานี้สรุปได้ว่าตรวจชิ้นเนื้อด้วยกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซม (Spybite FISH) สามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็งได้มากกว่า ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถนำ Spybite FISH พัฒนาเป็นเครื่องมือในการช่วยวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งในอนาคตได้เนื่องจากความไวที่สูงมากในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็ง ซึ่งอาจส่งผลต่อการวางแผนในการรักษาผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

4. การตรวจชิ้นเนื้อด้วยกล้องสลายกลาสร่วมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซม (Spybite FISH) มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งในประชากรไทย เนื่องจากกลุ่มประชากรที่อยู่ในการวิจัยนี้ทั้งหมดเป็นคนไทย และการศึกษาก่อนหน้านี้ส่วนมากเป็นการศึกษาทางฝั่งประเทศตะวันตก โดยปัจจัยความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนมีความแตกต่างกัน ประชากรทางฝั่งตะวันตกมีอุบัติการณ์ภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจาก primary sclerosing cholangitis มากกว่าประชากรไทยอย่างมาก ในประเทศไทยอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนเกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis Viverrini* ซึ่งจะเห็นได้ว่ากลไกและปัจจัยในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีและตับอ่อนแตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติของโครโมโซมที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตาม PB probe ที่พัฒนาในประชากรฝั่งตะวันตกยังสามารถเพิ่มความไวและช่วยวินิจฉัยผู้ป่วยในฝั่งเอเชียได้

5.4 ข้อด้อยของการศึกษานี้

1. จำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาน้อย โดยผู้ป่วยส่วนมากเป็นมะเร็ง 90 % กลุ่มคนไข้ที่ไม่ใช่มะเร็งมีแค่ประมาณ 10 % ซึ่งส่งผลต่อความจำเพาะ อย่างไรก็ตามน่าจะเป็นจากอคติที่เกิดจากการเลือกกลุ่มประชากร (selection bias) จากการที่เรามีเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าสู่การวิจัย (inclusion criteria) คือผู้ป่วยที่มาด้วยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยมะเร็ง
2. ระยะเวลาในการติดตามผู้ป่วยอยู่ที่ 1 ปีซึ่งถือว่าค่อนข้างสั้น จะเห็นได้ว่าการศึกษานี้มีผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่าเป็นท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ได้เกิดจากมะเร็งสองรายที่มีผล Spybite FISH เป็นบวก ซึ่ง Spybite FISH อาจเป็นเครื่องมือที่สามารถตรวจพบความผิดปกติระดับโครโมโซมได้ก่อนความผิดปกติของเซลล์เนื่องจากมีความไวมาก ดังนั้นการติดตามผู้ป่วยในข้างหน้าอาจจะแสดงให้เห็นได้ว่าถ้าผู้ป่วยวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็ง เครื่องมือนี้อาจจะเป็นเครื่องมือที่มีความไวและความจำเพาะที่สูงในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มาด้วยท่อน้ำดีตีบตันที่สงสัยจากมะเร็งได้เป็นอย่างดี จากการศึกษาด้วยระยะเวลาที่จำกัดจึงสรุปได้ว่า Spybite FISH มีความไวในการวินิจฉัยภาวะท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากมะเร็งสูง แต่มีค่าจำเพาะต่ำถ้าใช้เพียงอย่างเดียว

5.5 ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมวิจัยมีจำนวนน้อย อาจจะสามารถเพิ่มจำนวนผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัยโดยการทำร่วมกับโรงพยาบาลอื่นๆ
2. การวิจัยนี้สามารถทำการศึกษาต่อยอดได้ในแง่การเปรียบเทียบความเหมาะสมของสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมกับการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิคพีชแบบศึกษาไปข้างหน้า
3. เนื่องจากการศึกษาที่ใช้ probe ที่ได้มาจากประชากรทางฝั่งตะวันตก ดังนั้นอาจพิจารณาทำการศึกษาและสามารถพัฒนาตัวทดสอบ (probe) ที่เหมาะสมกับประชากรไทยในอนาคตได้



รายการอ้างอิง

1. Cholangiocarcinoma – 2015 2015 [Available from: <http://www.startoncology.net/professional-area/cholangiocarcinoma/?lang=en>.
2. Abraham SC, Wilentz RE, Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Boitnott JK, et al. Pancreaticoduodenectomy (Whipple resections) in patients without malignancy: are they all chronic pancreatitis? The American journal of surgical pathology. 2003;27(1):110-20.
3. Gerritsen A, Molenaar IQ, Bollen TL, Nio CY, Dijkgraaf MG, van Santvoort HC, et al. Preoperative characteristics of patients with presumed pancreatic cancer but ultimately benign disease: a multicenter series of 344 pancreatoduodenectomies. Annals of surgical oncology. 2014;21(12):3999-4006.
4. Friman S. Cholangiocarcinoma—current treatment options. Scandinavian Journal of Surgery. 2011;100(1):30-4.
5. Navaneethan U, Njei B, Lourdasamy V, Konjeti R, Vargo JJ, Parsi MA. Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis. Gastrointestinal endoscopy. 2015;81(1):168-76.
6. Burnett AS, Calvert TJ, Chokshi RJ. Sensitivity of endoscopic retrograde cholangiopancreatography standard cytology: 10-y review of the literature. Journal of surgical research. 2013;184(1):304-11.
7. Trikudanathan G, Navaneethan U, Njei B, Vargo JJ, Parsi MA. Diagnostic yield of bile duct brushings for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. Gastrointestinal endoscopy. 2014;79(5):783-9.
8. Barr Fritcher E, Kipp B, Halling KC, Clayton A. FISHing for pancreatobiliary tract malignancy in endoscopic brushings enhances the sensitivity of routine cytology. Cytopathology. 2014;25(5):288-301.
9. Navaneethan U, Njei B, Venkatesh PG, Vargo JJ, Parsi MA. Fluorescence in situ hybridization for diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: a

systematic review and meta-analysis. *Gastrointestinal endoscopy*. 2014;79(6):943-50. e3.

10. Singhi AD, Slivka A. Evaluation of indeterminate biliary strictures: Is it time to FISH or cut bait? *Gastrointestinal endoscopy*. 2016;83(6):1236-8.

11. Fukuda Y, Tsuyuguchi T, Sakai Y, Tsuchiya S, Saisyo H. Diagnostic utility of peroral cholangioscopy for various bile-duct lesions. *Gastrointestinal endoscopy*. 2005;62(3):374-82.

12. Tieu AH, Kumbhari V, Jakhete N, Onyimba F, Patel Y, Shin EJ, et al. Diagnostic and therapeutic utility of SpyGlass® peroral cholangioscopy in intraductal biliary disease: Single-center, retrospective, cohort study. *Digestive Endoscopy*. 2015;27(4):479-85.

13. Rey JW, Hansen T, Dümcke S, Tresch A, Kramer K, Galle PR, et al. Efficacy of SpyGlass (TM)-directed biopsy compared to brush cytology in obtaining adequate tissue for diagnosis in patients with biliary strictures. *World J Gastrointest Endosc*. 2014;6(4):137-43.

14. Ramchandani M, Reddy DN, Gupta R, Lakhtakia S, Tandan M, Darisetty S, et al. Role of single-operator peroral cholangioscopy in the diagnosis of indeterminate biliary lesions: a single-center, prospective study. *Gastrointestinal endoscopy*. 2011;74(3):511-9.

15. Fritcher EGB, Voss JS, Brankley SM, Campion MB, Jenkins SM, Keeney ME, et al. An optimized set of fluorescence in situ hybridization probes for detection of pancreatobiliary tract cancer in cytology brush samples. *Gastroenterology*. 2015;149(7):1813-24. e1.

16. Tshering G, Dorji PW, Chaijaroenkul W, Na-Bangchang K. Biomarkers for the Diagnosis of Cholangiocarcinoma: A Systematic Review. *Am J Trop Med Hyg*. 2018.

17. Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, Kelley RK, Gores GJ. Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(2):95-111.

18. Krasinskas AM. Cholangiocarcinoma. *Surg Pathol Clin*. 2018;11(2):403-29.

19. Brandi G, Venturi M, Pantaleo MA, Ercolani G, Gico. Cholangiocarcinoma: Current opinion on clinical practice diagnostic and therapeutic algorithms: A review of

the literature and a long-standing experience of a referral center. *Dig Liver Dis.* 2016;48(3):231-41.

20. Bergquist A, Tribukait B, Glaumann H, Broomé U. Can DNA cytometry be used for evaluation of malignancy and premalignancy in bile duct strictures in primary sclerosing cholangitis? *Journal of hepatology.* 2000;33(6):873-7.

21. Sokolova IA, Halling KC, Jenkins RB, Burkhardt HM, Meyer RG, Seelig SA, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2000;2(3):116-23.

22. Boldorini R, Paganotti A, Sartori M, Allegrini S, Miglio U, Orsello M, et al. Fluorescence in situ hybridisation in the cytological diagnosis of pancreatobiliary tumours. *Pathology.* 2011;43(4):335-9.

23. Fritcher EGB, Kipp BR, Halling KC, Oberg TN, Bryant SC, Tarrell RF, et al. A multivariable model using advanced cytologic methods for the evaluation of indeterminate pancreatobiliary strictures. *Gastroenterology.* 2009;136(7):2180-6.

24. Luna LEM, Kipp B, Halling KC, Sebo TJ, Kremers WK, Roberts LR, et al. Advanced cytologic techniques for the detection of malignant pancreatobiliary strictures. *Gastroenterology.* 2006;131(4):1064-72.

25. Charatchoenwittaya P, Enders FB, Halling KC, Lindor KD. Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology.* 2008;48(4):1106-17.

26. Levy MJ, Baron TH, Clayton AC, Enders FB, Gostout CJ, Halling KC, et al. Prospective evaluation of advanced molecular markers and imaging techniques in patients with indeterminate bile duct strictures. *The American journal of gastroenterology.* 2008;103(5):1263-73.

27. Gonda TA, Glick MP, Sethi A, Poneris JM, Palmas W, Iqbal S, et al. Polysomy and p16 deletion by fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of indeterminate biliary strictures. *Gastrointestinal endoscopy.* 2012;75(1):74-9.

28. Chaiteerakij R, Barr Fritcher EG, Angsuwatcharakon P, Ridtitid W, Chaithongrat S, Leerapun A, et al. Fluorescence in situ hybridization compared with conventional

- cytology for the diagnosis of malignant biliary tract strictures in Asian patients. *Gastrointest Endosc.* 2016;83(6):1228-35.
29. Miller G, Socci ND, Dhall D, D'Angelica M, DeMatteo RP, Allen PJ, et al. Genome wide analysis and clinical correlation of chromosomal and transcriptional mutations in cancers of the biliary tract. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2009;28(1):62.
30. Shiraishi K, Kusano N, Okita S, Oga A, Okita K, Sasaki K. Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in biliary tract cancers. *Oncology.* 1999;57(1):42-9.
31. McKay SC, Unger K, Pericleous S, Stamp G, Thomas G, Hutchins RR, et al. Array comparative genomic hybridization identifies novel potential therapeutic targets in cholangiocarcinoma. *HPB.* 2011;13(5):309-19.
32. Rijken AM, Hu J, Perlman EJ, Morsberger LA, Long P, Kern SE, et al. Genomic alterations in distal bile duct carcinoma by comparative genomic hybridization and karyotype analysis. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 1999;26(3):185-91.
33. Shiraishi K, Okita K, Kusano N, Harada T, Kondoh S, Okita S, et al. A comparison of DNA copy number changes detected by comparative genomic hybridization in malignancies of the liver, biliary tract and pancreas. *Oncology.* 2001;60(2):151-61.
34. Caldas C, Hahn SA, Da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature genetics.* 1994;8(1):27-32.
35. Iacobuzio-Donahue CA, van der Heijden MS, Baumgartner MR, Troup WJ, Romm JM, Doheny K, et al. Large-scale allelotype of pancreaticobiliary carcinoma provides quantitative estimates of genome-wide allelic loss. *Cancer research.* 2004;64(3):871-5.
36. Woo YS, Lee JK, Oh SH, Kim MJ, Jung JG, Lee KH, et al. Role of SpyGlass peroral cholangioscopy in the evaluation of indeterminate biliary lesions. *Digestive diseases and sciences.* 2014;59(10):2565-70.
37. Navaneethan U, Hasan MK, Lourdasamy V, Njei B, Varadarajulu S, Hawes RH. Single-operator cholangioscopy and targeted biopsies in the diagnosis of

indeterminate biliary strictures: a systematic review. *Gastrointestinal endoscopy*. 2015;82(4):608-14. e2.

38. Salomao M, Gonda TA, Margolskee E, Eguia V, Remotti H, Poneros JM, et al. Strategies for improving diagnostic accuracy of biliary strictures. *Cancer Cytopathol*. 2015;123(4):244-52.

39. Smoczynski M, Jablonska A, Matyskiel A, Lakomy J, Dubowik M, Marek I, et al. Routine brush cytology and fluorescence in situ hybridization for assessment of pancreatobiliary strictures. *Gastrointest Endosc*. 2012;75(1):65-73.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ แพทย์หญิงจิรวรรค์ เมธาภา

วันเดือนปีเกิด 28 มีนาคม พ.ศ.2528

ภูมิลำเนา จังหวัดกรุงเทพมหานคร

สถานภาพ โสด

ตำแหน่งทางการศึกษา แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาอายุรศาสตร์ทางเดินอาหาร
คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

พ.ศ.2547 - 2553 นักศึกษาแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

พ.ศ.2553 - 2554 แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลศิริราช จ.ภูเก็ต

พ.ศ.2554 - 2555 แพทย์ปฏิบัติการ 6 โรงพยาบาลทหารผ่านศึก จ.
กรุงเทพมหานคร

พ.ศ.2555 - 2558 แพทย์ประจำบ้านสาขาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
สภากาชาดไทย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ.2558 - 2559 แพทย์ปฏิบัติการ 6 โรงพยาบาลทหารผ่านศึก จ.
กรุงเทพมหานคร

พ.ศ.2559 - ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาโรคทางเดินอาหาร
ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาและประกาศนียบัตร

พ.ศ.2553 แพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

พ.ศ.2558 วุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญประกอบวิชาชีพเวชกรรม
สาขาอายุรศาสตร์