

ความผิดปกติทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังในประเทศไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC ALTERATIONS OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA IN THAILAND



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Sciences

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความผิดปกติทางพันธุกรรมของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิ้ม โพไซต์ชนิดเรื้อรังในประเทศไทย
โดย	น.ส.ศิโรรัตน์ ขอบบัวคลี่
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจันทนา ผลประเสริฐ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์พลภัทร โรจน์นครินทร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะแพทยศาสตร์ (รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ (ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก (รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจันทนา ผลประเสริฐ)
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์พลภัทร โรจน์นครินทร์)
.....	กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)
.....	กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลิสลา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย (รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงพิมพ์ใจ นิภารักษ์)

6270020830 : MAJOR MEDICAL SCIENCES

KEYWORD: Chronic lymphocytic leukemia, next generation sequencing, IGHV mutation status, FISH, flow cytometry, gene mutation, Thailand, prognostic

Sirorat Kobbuaklee : GENETIC ALTERATIONS OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA IN THAILAND. Advisor: Assoc. Prof. CHANTANA POLPRASERT, M.D. Co-advisor: Prof. PONLAPAT ROJNUCKARIN, M.D., Ph.D.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a cancer that occurs from abnormal proliferation of lymphocytes. Genetic alterations underlie pathogenesis and progression of the disease. Cytogenetic and molecular abnormalities have been studied in Western population but less information in Thai patients with CLL. Furthermore, CLL is prevalent in older-age group, however the disease also occurs in younger-age group. Clinical and genetic differences between age groups remain to be explored. The objective of this study is to investigate the genetic alterations in Thai patients with CLL and explore differences between age groups. The study will include eighty patients diagnosed with CLL from May 2018 to November 2021. FISH and immunophenotyping results were collected at first diagnosis. *IGHV* mutation status and genetic mutations were analyzed using next-generation sequencing (NGS). The research findings indicate that the overall mean age was 66 years, 54 (67.5%) patients were male, with a male to female ratio of 2.08:1. Overall, 17.3% of patients had 17p deletion, while 6.3% had 11q deletion. Most frequently mutated genes were *ARID1A* (76.3%), *KMT2D* (70.0%), *MYD88* (16.3%), *TP53* (11.3%), *SF3B1* (10.0%), and *ATM* (8.8%), respectively. Furthermore, *MYD88* mutations were more common in asymptomatic patients (36.0%) than in symptomatic patients (9.3%) ($p=0.011$). No significant differences were seen in hematological parameters, immunophenotyping, or *IGHV* unmutated status between younger CLL (age<65 years old; 42.5%) compared to older CLL (age≥65 years old; 57.5%).

Thai CLL patients are younger than those with Western descent, and male patients are more common than female patients. Hematological parameters, immunophenotype and *IGHV* mutational status are not different between age groups. Mutated *IGHV* and *MYD88* mutation were associated with asymptomatic state of disease. Genetic studies provide better understanding biology of the disease and guide proper management for CLL patients.

Field of Study: Medical Sciences

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจันทนา ผลประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์พลภัทร โรจน์นครินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม เป็นอย่างสูงที่ให้ความกรุณาชี้แนะข้อมูลที่ประโยชน์ต่อการศึกษา ค้นคว้า และให้คำปรึกษาซึ่งทำให้ข้อมูลงานวิจัยฉบับนี้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น และติดตามการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้อย่างใกล้ชิดตลอดมา นับตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสำเร็จเรียบร้อยสมบูรณ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในกรุณาของท่านเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์กฤษฎา วุฒิการณ ผู้เป็นผู้วิจัยหลักของโครงการวิจัยเรื่อง การลงทะเบียนผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง ในประเทศไทย: การศึกษาโดยสหสถาบัน ที่ได้กรุณาอนุญาตให้ใช้ตัวอย่างทางชีวภาพ และให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณหน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัย

นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ครอบครัว เพื่อนนักศึกษา และผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ทุกท่านที่ได้กรุณาให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอด



ศิริโรจน์ ขอบบัวคลี

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	23
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	34
บรรณานุกรม.....	38
ประวัติผู้เขียน.....	44

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ความแตกต่างของอุบัติการณ์การเกิดโรค CLL ในชาวเอเชียและชาวยุโรป.....	6
ตารางที่ 2 ระบบการจัดระยะของโรค CLL	7
ตารางที่ 3 การวินิจฉัยแยกโรค Lymphoma [26, 27]	8
ตารางที่ 4 ความแตกต่างของพันธุกรรมที่พบในผู้ป่วยโรค CLL ชาวเอเชียและยุโรป.....	17
ตารางที่ 5 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค CLL 80 รายในประเทศไทย.....	24
ตารางที่ 6 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทย	26
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกระหว่างผู้ป่วยโรค CLL กลุ่มอายุน้อย (<65 ปี) และสูงอายุ (>65 ปี).....	28
ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการระหว่างผู้ป่วยโรค CLL กลุ่มอายุน้อย (<65 ปี) และสูงอายุ (>65 ปี)	29
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกระหว่างผู้ป่วยโรค CLL กลุ่มที่มีอาการ และไม่มีอาการ ..	31
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการระหว่างผู้ป่วยโรค CLL กลุ่มที่มีอาการ และไม่มีอาการ	32
ตารางที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรม	33
ตารางที่ 12 การกลายพันธุ์ของยีน ARID1A ที่พบในผู้ป่วยโรค CLL ชาวไทย	35

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังที่มีอาการต่อมน้ำเหลืองโต.....	4
รูปที่ 2 ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดที่สเมียร์ได้จากเลือดของผู้ป่วยโรค CLL [18].....	8
รูปที่ 3 ลักษณะการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์ CLL.....	10
รูปที่ 4 โครงสร้างของ B-cell receptor (BCR) [34].....	11
รูปที่ 5 แสดง pathway ที่เกี่ยวข้องกันที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค CLL [44].....	16
รูปที่ 6 Fluorescent in situ hybridization (FISH) [48].....	20
รูปที่ 7 ขั้นตอนการสกัด DNA [41].....	21
รูปที่ 8 การกลายพันธุ์ของยีน ARID1A บนโครโมโซม 1 p36.11.....	35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง หรือ Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) เป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดที่เกิดจากเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิด B-cell มีการแบ่งตัวที่มากผิดปกติในเลือด และเกิดการสะสมอยู่ในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ต่อม้ำเหลือง ตับ และม้าม ส่งผลให้อวัยวะเหล่านั้นมีอาการบวมโต [1] สามารถพบได้บ่อยในประชากรผู้ใหญ่ที่มีเชื้อสายตะวันตก ซึ่งพบว่ามีอุบัติการณ์ประมาณ 4.6 คน ต่อประชากร 100,000 คนต่อปี อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยประมาณ 70 ปี โดยมีเพียง 10% ของผู้ป่วยโรค CLL มีอายุน้อยกว่า 55 ปี [2, 3] ในขณะที่โรค CLL พบได้น้อยในประชากรผู้ใหญ่ที่มีเชื้อสายเอเชีย โดยพบการเกิดโรค CLL ในชาวเอเชียประมาณ 0.5 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี [4] และผู้ป่วยชาวเอเชียมีอายุเฉลี่ยประมาณ 60 ปี [5]

จากการศึกษาความแตกต่างกันของลักษณะทางคลินิกผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศตุรกี พบว่ามีผู้ป่วย 46% อายุน้อยกว่า 65 ปี โดยมี 28.6% ของผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 65 ปี จำเป็นต้องได้รับการรักษา และยังพบว่าอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยกลุ่มที่อายุน้อยกว่า 65 ปีสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยอายุ 65 ปีขึ้นไป [6] โรค CLL เป็นโรคที่มีลักษณะทางคลินิกที่หลากหลายสะท้อนถึงลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคของผู้ป่วย [7] ดังนั้นปัจจัยทางพันธุกรรมน่าจะมีผลต่อการพัฒนาของโรค CLL มากกว่าปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม และลักษณะทางพันธุกรรมสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคได้ [8] โดยลักษณะของโรค CLL ที่บ่งชี้ว่ามีความเสี่ยงสูง คือ โรคอยู่ในระยะที่มีความเสี่ยงสูง (Rai III, IV และ Binet C), มี del17p และ del11q, พบ TP53 mutation และมีสถานะการกลายพันธุ์ของ IGHV เป็นแบบ Unmutated IGHV [9-12] โดยกลุ่มผู้ป่วยโรค CLL ที่มีอายุน้อยมักได้รับการวินิจฉัยว่ามีแนวโน้มที่โรคจะอยู่ในระดับความเสี่ยงปานกลาง (Rai I, II) มากกว่าผู้ป่วยสูงอายุ มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า แต่มีสถานะการกลายพันธุ์ IGHV แบบ Unmutated IGHV มากกว่าผู้ป่วยสูงอายุด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีพบได้ในผู้ป่วยอายุน้อยมากกว่า ถึงแม้ว่าอัตราการรอดชีวิตในผู้ป่วยอายุน้อยจะมากกว่าผู้ป่วยสูงอายุก็ตาม [13] นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรค CLL รายใหม่ในประเทศไทยที่ได้รับการวินิจฉัยระหว่างปี พ.ศ.2506-2541 (ค.ศ.1963-1988) จากการรวบรวมข้อมูลจากศูนย์เดียวมีปริมาณน้อยมาก และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางคลินิก และระยะการดำเนินโรคของผู้ป่วยกับรายงานจากประเทศตะวันตกในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่าผู้ป่วยชาวไทยมีอาการที่รุนแรงกว่า ส่วนใหญ่มีอาการโลหิตจาง ตับและม้ามบวมโต มีอายุเฉลี่ยน้อยกว่าอยู่ที่ 63 ปี และ 12% ของผู้ป่วยโรค CLL มีอายุน้อยกว่า 50 ปี จากการศึกษาความแตกต่างของอุบัติการณ์ ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยชาวเอเชียและตะวันตกที่ผ่านมายังไม่พบสาเหตุที่แน่ชัดที่ทำให้

ให้อุบัติการณ์ของการเกิดโรค CLL มีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ [14] อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบว่ามีรายงานลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรมของผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทย

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมและลักษณะทางคลินิกที่พบในผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทยระหว่างผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 65 ปี และผู้ป่วยที่มีอายุ 65 ปีขึ้นไปตามการแบ่งเกณฑ์ผู้สูงอายุตามคำจำกัดความขององค์การอนามัยโลก (WHO) [15] โดยเก็บรวบรวมข้อมูลและศึกษาแบบหลายศูนย์ (multicenter study) และนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ และช่วยในการพยากรณ์ความรุนแรงของผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทยแต่ละกลุ่มอายุ เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรค CLL ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรม และลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทยระหว่างกลุ่มผู้ป่วยอายุน้อย และกลุ่มผู้ป่วยอายุมาก
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรม และลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทย

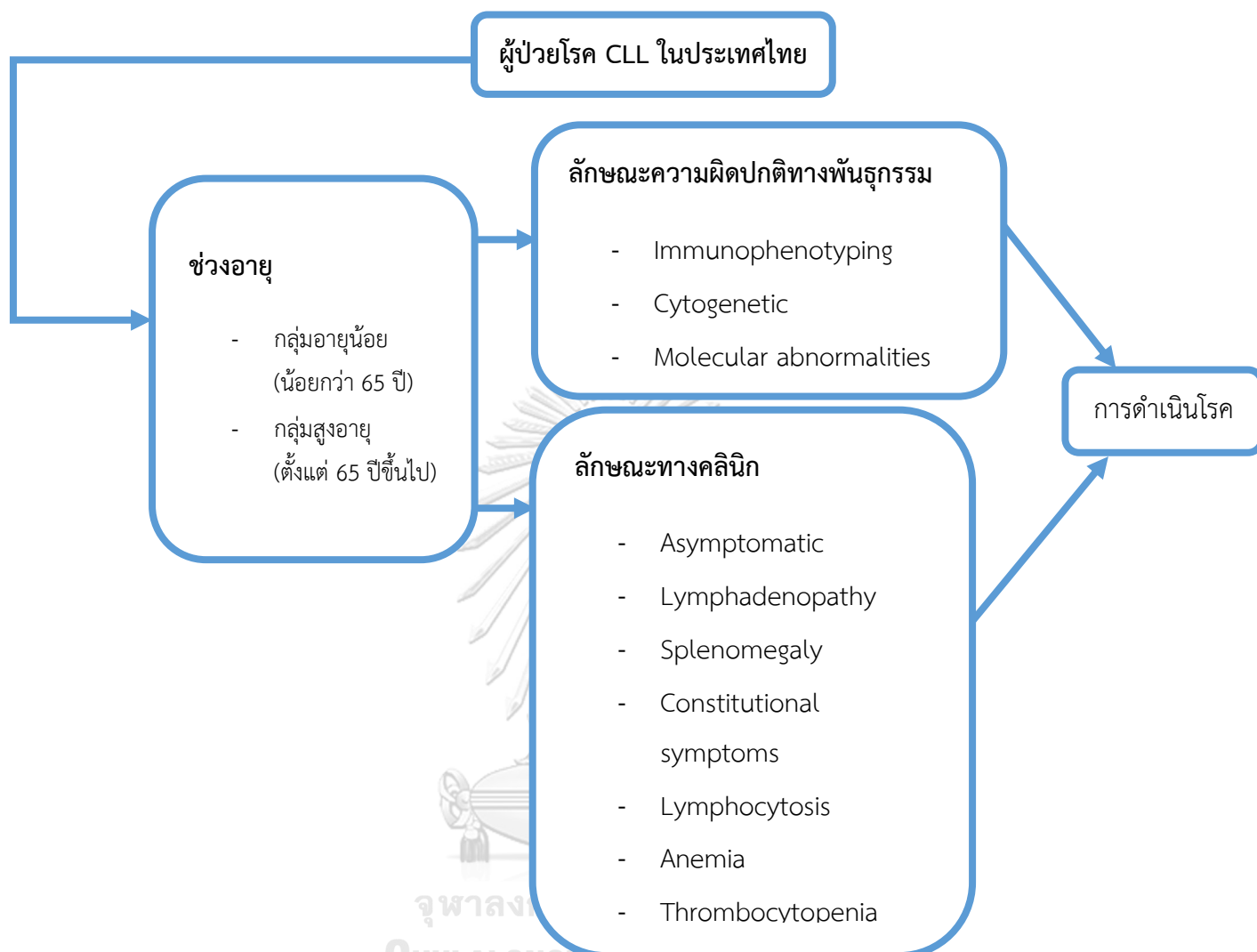
1.3 คำถามการวิจัย

ลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรม และลักษณะทางคลินิกที่พบในผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามกลุ่มอายุหรือไม่

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการเก็บรวบรวมข้อมูล ได้แก่ เพศ, อายุ, ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count; CBC), ลักษณะทางคลินิก และลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรม จากตัวอย่างทางชีวภาพที่เหลือของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยโรค CLL ของโครงการวิจัย การลงทะเบียนผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังในประเทศไทย: การศึกษาโดยสหสถาบัน จำนวน 80 ตัวอย่าง

1.5 กรอบแนวคิดในการวิจัย



1.6 สมมติฐานของการวิจัย

ลักษณะทางคลินิก และลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรมที่พบในผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทย มีความแตกต่างกันตามกลุ่มอายุของผู้ป่วย ส่งผลให้ผู้ป่วยมีการดำเนินโรคที่แตกต่างกัน

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ช่วยทำให้เข้าใจความสัมพันธ์ของลักษณะทางคลินิก และลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรมของผู้ป่วยโรค CLL ที่พบในประเทศไทยที่มีอายุน้อย และอายุมาก ซึ่งจะสามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลที่จะช่วยให้แพทย์ และนักวิจัยนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในการศึกษาวิจัยต่อเพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเป็นแนวทางในการรักษา และพยากรณ์ความรุนแรงของโรค CLL ในผู้ป่วยแต่ละกลุ่มให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นได้

บทที่ 2

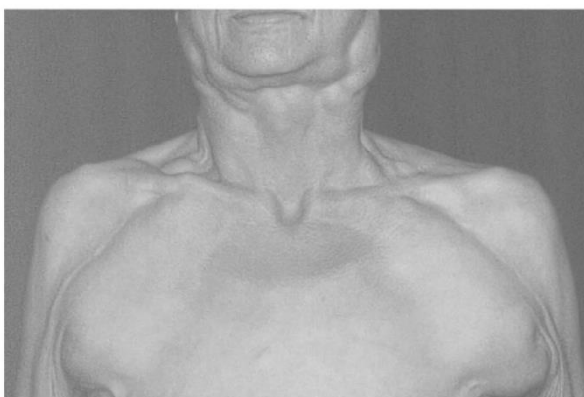
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง (Chronic Lymphocytic Leukemia; CLL)

โรค CLL เป็นโรคที่ถูกรับและบันทึกไว้ตั้งแต่ปี ค.ศ.1749 โดย Joseph Lieutaud เป็นแพทย์ชาวฝรั่งเศส และเมื่อเวลาผ่านไปมีการศึกษาหลายอย่างทำให้ในปัจจุบันมีความเข้าใจในตัวโรค การรักษาโรค CLL มากขึ้น และทำให้สามารถแยกโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังออกจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดอื่น ๆ ได้ ซึ่งเกิดจากการศึกษาและทำความเข้าใจเกี่ยวกับโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง 4 ด้าน ได้แก่ immunological classification, molecular cytogenetics, การพยากรณ์โรคอย่างเป็นระบบ (prognostic system) และการพัฒนายารักษาโรค [1] โดยจะถูกนำมาใช้ในการช่วยวินิจฉัยโรค และหาแนวทางการรักษาได้ดียิ่งขึ้น

2.2 อาการที่พบในผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง

ในระยะเริ่มต้นของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง มักจะยังไม่มีอาการ แต่พบว่ามีภาวะ lymphocytosis เป็นระยะเวลานานพบได้จากการตรวจนับเม็ดเลือด ในระยะที่โรคเริ่มมีการลุกลามมากขึ้นจะพบว่ามีอาการตับหรือม้ามโต, ต่อม้ำเหลืองโต, ติดเชื้อง่าย, อ่อนเพลีย, ซีด, เลือดออกง่าย (รูปที่ 1) และมีอาการทั่วไปที่สังเกตได้ เช่น มีไข้, น้ำหนักลด และเหงื่อออกตอนกลางคืน และเนื่องจากในปัจจุบันมีการตรวจนับเม็ดเลือดเป็นประจำ ทำให้สามารถวินิจฉัยผู้ป่วยได้ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นที่ยังไม่มีอาการ [16]



รูปที่ 1 ลักษณะผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังที่มีอาการต่อม้ำเหลืองโต

2.3 การระบาดวิทยา

อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังมีความแตกต่างกันตามภูมิภาค และเชื้อชาติของผู้ป่วย มักจะพบได้บ่อยในผู้ใหญ่ชาวตะวันตกมากกว่าชาวเอเชีย โดยในยุโรปจะพบ การเกิดโรคประมาณ 4.60-4.75 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี [2, 3, 17] ในขณะที่เอเชียพบ การเกิดโรคประมาณ 0.5 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี [4] ในยุโรปพบโรคในผู้ชายประมาณ 6.8 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี พบในผู้หญิงประมาณ 3.5 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี ในขณะที่เอเชียพบโรคในผู้ชายประมาณ 1.7 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี และพบในผู้หญิง ประมาณ 0.3 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี ซึ่งอัตราส่วนการเกิดโรคในผู้ชายต่อผู้หญิงของทั้งสองภูมิภาคอยู่ที่ประมาณ 2:1 [18] ดังนั้นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังเป็นโรคที่มักพบ ในผู้ใหญ่ ไม่ค่อยพบในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 30 ปี และมีเพียง 10% ของผู้ป่วยมีอายุน้อยกว่า 55 ปี [1, 2] มีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นตามอายุ (Age-adjusted annual incidence rate; AAIR) โดยในประเทศ ตะวันตกพบผู้ป่วยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 70 ปี [8] ในขณะที่เอเชียพบในผู้ป่วยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 60 ปี [5] ดังแสดงในตารางที่ 1 และมีการศึกษาที่พบว่าชาวเอเชียที่อาศัยอยู่ในประเทศตะวันตก ทั้งที่เกิด ในเอเชีย และเกิดในตะวันตก มีอุบัติการณ์ของการเกิดโรค CLL เท่ากับประชากรที่อาศัยอยู่ในบ้าน เกิดในเอเชีย และชาวตะวันตกที่มีเชื้อสายเอเชียก็พบว่า มีอุบัติการณ์ของการเกิดโรค CLL น้อยกว่า ชาวตะวันตก [19] ซึ่งการเกิดโรค CLL ในชาวญี่ปุ่นที่อาศัยอยู่ในฮาวาย พบว่าไม่มีรายงานการเกิด อุบัติการณ์ที่สูงกว่าคนที่อาศัยอยู่ในญี่ปุ่น แต่อุบัติการณ์ของโรค CLL สูงกว่าที่คาดว่าจะพบใน ครอบครัวของผู้ป่วย [20] และเช่นเดียวกับการศึกษาอัตราอุบัติการณ์ของ CLL ในชาวเอเชียที่อพยพ ไปสหรัฐอเมริกา พบว่าโรค CLL มีอุบัติการณ์ที่ต่ำในชาวเอเชีย ทั้งกลุ่มที่เกิดในเอเชียและเกิดใน สหรัฐอเมริกา โดยพบอุบัติการณ์ในชาวญี่ปุ่นที่เกิดในสหรัฐอเมริกา 0.2 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี และที่เกิดในประเทศญี่ปุ่น 1.1 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี และอุบัติการณ์ในชาวจีน ที่เกิดในสหรัฐอเมริกา 1.0 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี และที่เกิดในประเทศจีน 0.4 คนต่อ ประชากร 100,000 คนต่อปี ในขณะที่พบอุบัติการณ์ในชาวสหรัฐอเมริกกัน 3.7 คนต่อประชากร 100,000 คนต่อปี [19] ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของโรคที่แน่ชัด แต่จากการศึกษาก่อนนี้พบว่าความ แตกต่างทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคได้มากกว่าสิ่งแวดล้อม [8] โดยพบว่าชาวยุโรปมีความ เสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังเพิ่มขึ้นในบุคคลที่มีสมาชิกครอบครัวเป็น โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังหรือเป็นโรคมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับต่อมน้ำเหลือง [8, 20]

ตารางที่ 1 ความแตกต่างของอุบัติการณ์การเกิดโรค CLL ในชาวเอเชียและชาวยุโรป

Asian	European
Age at Dx about 60 years	Age at Dx about 70 years
Rare	Common
Male 1.7 per 100,000/year	Male 6.8 per 100,000/year
Female 0.3 per 100,000/year	Female 3.5 per 100,000/year

2.4 การพยากรณ์โรค

เนื่องจากโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง เกิดจากการที่มีเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ที่โตเต็มที่ แต่ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ อยู่ในไขกระดูก เลือด แล้วเข้าไปสะสมอยู่ตามต่อมน้ำเหลือง และอวัยวะอื่น ๆ ในระหว่างที่มีการดำเนินของโรค ร่างกายจะมีการยับยั้งการสร้างเม็ดเลือดปกติและลดการทำงานของอวัยวะ ส่งผลให้ร่างกายมีความไวต่อการติดเชื้อมากขึ้น การรักษาจึงเป็นแบบประคับประคอง [1] การพยากรณ์โรคมียุทธศาสตร์พื้นฐานมาจากการประเมินลักษณะทางคลินิกและผลเลือด ทำให้สามารถประเมินขอบเขตและระยะการดำเนินของโรค ดังนั้นการพยากรณ์โรคอย่างเป็นระบบของ Rai และ Binet (ตารางที่ 3) จึงมีความสำคัญ จะใช้วิธีประเมินขนาดของมะเร็งโดยไม่มีการวัดปริมาณที่แม่นยำ และประเมินร่วมกับภาวะไขกระดูกล้มเหลว [21] สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะความเสี่ยงต่ำ (Rai 0 หรือ Binet A) ไม่ต้องรับการรักษา แต่จะเริ่มให้การรักษาเมื่อพบว่าการลุกลามของโรค, ระยะความเสี่ยงปานกลาง (Rai I-II หรือ Binet B) เริ่มให้การรักษาเมื่อมีการลุกลามของโรค และระยะความเสี่ยงสูง (Rai III-IV หรือ Binet C) จะเริ่มให้การรักษา ซึ่งแต่ละระยะจะมีระยะเวลาในการอยู่รอดต่างกัน [1, 22] ด้วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังเป็นโรคที่มีความหลากหลายของลักษณะทางคลินิก ผู้ป่วยจึงมีลักษณะทางคลินิก และการดำเนินโรคที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ไม่แสดงอาการ และอาจแย่งลงจนถึงโรคลุกลามจนทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ ดังนั้นการพยากรณ์โรคจึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการรักษาผู้ป่วยโรค CLL [16, 23]

ตารางที่ 2 ระบบการจัดระยะของโรค CLL

Rai system [24]		ความ เสี่ยง	Binet system [25]	
ระยะ	ลักษณะ		ระยะ	ลักษณะ
0	Lymphocytosis (ในเลือดและไขกระดูก)	ต่ำ	A	Lymphocytosis และมีต่อมน้ำเหลืองโต <3 กลุ่ม
I	ระยะ 0 และต่อมน้ำเหลืองโต	ปาน กลาง	B	Lymphocytosis และมีต่อมน้ำเหลืองโต ≥ 3 กลุ่ม
II	ระยะ 0-I และมีอาการตับ หรือม้ามโต			
III	ระยะ 0-II และมีอาการโลหิตจาง (Hb < 11g/dL)	สูง	C	Lymphocytosis และมีต่อมน้ำเหลืองโต ≥ 3 กลุ่ม และมีอาการโลหิตจาง และ/หรือ เกล็ดเลือดต่ำ
IV	ระยะ 0-IV และมีอาการเกล็ดเลือดต่ำ (platelets < 100,000/ μ L)			

2.5 การวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง

การวินิจฉัยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรังจำเป็นต้องตรวจนับเม็ดเลือดแบบสมบูรณ์ ลักษณะสัณฐานวิทยา และลักษณะการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์ เพื่อจำแนกโรค CLL ออกจากโรคอื่น สำหรับการประเมินระยะของโรคจะใช้ระบบการจัดระยะของ Rai และ Binet [21]

2.5.1 การตรวจนับเม็ดเลือดแบบสมบูรณ์ (complete blood count with differential count; CBC)

ตามเกณฑ์การวินิจฉัยโรคของ International Workshop for CLL (iwCLL) ค.ศ. 2008 [26] และองค์การอนามัยโรค (WHO) ค.ศ. 2016 [27] การวินิจฉัยโรค CLL ได้กำหนดว่าจะต้องพบ monoclonal B-cell ในเลือดอย่างน้อย 5,000 cells/ μ L และอาจมีอาการต่อมน้ำเหลืองหรือม้ามโตร่วมด้วย ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับโรค Small Lymphocytic Lymphoma (SLL) ที่พบ monoclonal B-cell ในเลือดน้อยกว่า 5,000 cells/ μ L และต้องมีอาการต่อมน้ำเหลืองหรือม้ามโตร่วมด้วย โดยเอกลักษณ์ที่เหมือนกันของทั้ง 2 โรคนี้ คือสัมพันธ์กับภาวะ Monoclonal B-Lymphocytosis หรือ MBL ที่มี B-lymphocyte ในเลือดน้อยกว่า 5,000 cells/ μ L แต่อาจไม่มี

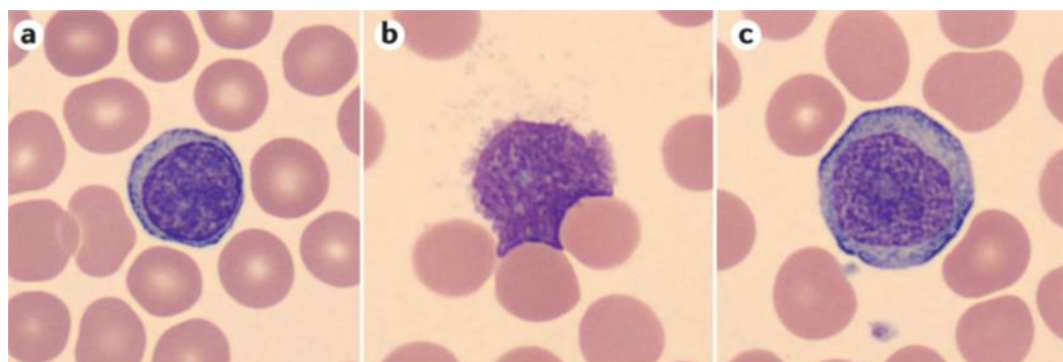
หรือมีอาการต่อมน้ำเหลืองโตน้อยกว่า 1.5 เซนติเมตร [27] ดังตารางที่ 2 โดย MBL เป็นภาวะที่มีการเพิ่มขึ้นของ monoclonal B-cell ซึ่งอาจพัฒนากลายเป็นโรค CLL ได้ 1-2% ต่อปี [28]

ตารางที่ 3 การวินิจฉัยแยกโรค Lymphoma [26, 27]

โรค	จำนวน B-lymphocyte ในเลือด	ต่อมน้ำเหลืองหรือม้ามโต
CLL	$\geq 5 \times 10^9/L$	อาจจะไม่มี
SLL	$< 5 \times 10^9/L$	ต้องมี
MBL	$< 5 \times 10^9/L$	ไม่มีหรือต่อมน้ำเหลือง < 1.5 ซม.

2.5.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

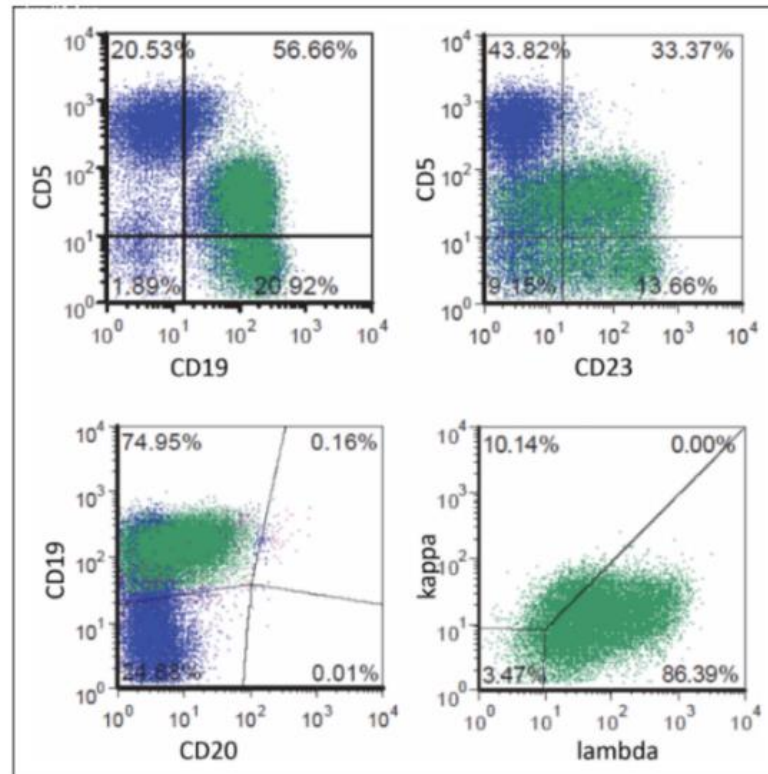
ในขั้นตอนการวินิจฉัยโรค CLL จะใช้การสเมียร์เลือด และย้อมสีแบบ Wright-Giemsa-stained เพื่อดูสัณฐานวิทยา โดยจะพบว่ามี B-lymphocyte ที่โตเต็มวัย ขนาดเล็กจำนวนมาก ลักษณะเซลล์มี cytoplasm น้อย chromatin ขดแน่นเป็นก้อน (รูปที่ 2a) และมีบางเซลล์ที่มีลักษณะเป็น basket หรือ smudge (รูปที่ 2b) นอกจากนี้อาจพบ prolymphocytes ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวในโรค CLL ตามปกติ มี cytoplasm มากกว่า และมี nucleolus (รูปที่ 2c) หากมีจำนวน prolymphocytes เกิน 55% จะวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวโปรลิมโฟไซติก (Prolymphocytic leukemia; PLL) [18, 20]



รูปที่ 2 ลักษณะเซลล์เม็ดเลือดที่สเมียร์ได้จากเลือดของผู้ป่วยโรค CLL [18]

2.5.3 ลักษณะการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์ (Immunophenotyping)

ลักษณะการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์เป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการวินิจฉัยโรค CLL ช่วยในการแยก B-cell ออกจากโรคที่เกี่ยวข้องกับ T-cell โดยเซลล์ CLL มีลักษณะการแสดงออกของแอนติเจนที่แตกต่างจาก B-cell ตัวแก่ปกติ และ B-cell ตัวอ่อน โดยมีระดับการแสดงออกของ surface immunoglobulin, CD20, CD22, CD79b, CD81 และ FMC7 ที่ต่ำหรือไม่มีเลยเมื่อเทียบกับ B-cell ปกติ [20, 26] มีการแสดงออกของ CD5 ซึ่งเป็นแอนติเจนของ T-cell ร่วมกับ CD19, CD20 และ CD23 เนื่องจากลักษณะของเซลล์ CLL เป็น monoclonal B-cell จึงมีการแสดงออกของ monoclonal surface immunoglobulin คือ kappa หรือ lambda surface light chain อย่างใดอย่างหนึ่ง [26] ดังรูปที่ 3 และไม่มีการแสดงออกของ CD10, CD103 และ CD123 ซึ่งเป็นแอนติเจนของ T-cell และ myeloid [29] จากข้อมูลของ European Research Initiative on CLL (ERIC) และ European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) ได้กำหนดให้ CD19, CD5, CD20, kappa และ lambda เป็น marker ที่จำเป็นต่อการวินิจฉัยโรค CLL และกำหนดให้ CD43, CD81, CD200, CD10 และ ROR1 เป็น marker ที่แนะนำต่อการวินิจฉัยโรค CLL [30] ในทางกลับกัน B-cell ของโรค PLL ไม่มีการแสดงออกของ CD5 และการแสดงออกของ CD20 ที่สูง ส่วนโรค mantle cell lymphoma (MCL) มีการแสดงออกของ B-cell surface antigen และ CD5 แต่ไม่มีการแสดงออกของ CD23 [26] และโรค MBL จะมีการแสดงออกของ CD200 และ CD23 ร่วมกับ dim CD20, CD22, CD45, CD79b และ CD81 และ bright CD43 [29] สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจลักษณะการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์ในผู้ป่วยโรค CLL สามารถตรวจจากเลือด โดยไม่จำเป็นต้องตรวจจากไขกระดูก หรือต่อมน้ำเหลือง [16, 21]



รูปที่ 3 ลักษณะการแสดงออกของแอนติเจนบนผิวเซลล์ CLL

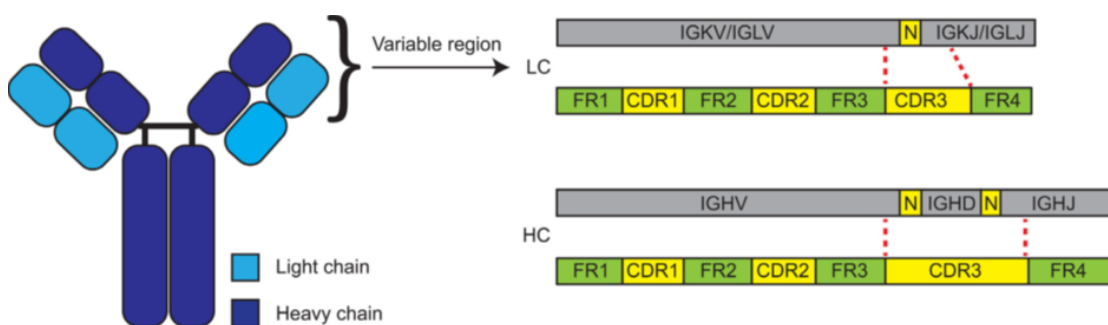
[31]

2.5.4 ลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรม

ด้วยการพยากรณ์โรคในระยะความเสี่ยงต่ำ และระยะความเสี่ยงปานกลาง มีระยะเวลาการลุกลามของโรคที่ต่างกันมาก จึงมีการนำลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรมเข้ามาช่วยในการพยากรณ์โรค และช่วยวินิจฉัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับลักษณะเฉพาะของมะเร็งได้ ได้แก่ สถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* (*IGHV* mutation status) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับเซลล์ต้นกำเนิดในการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง ความผิดปกติของยีนที่เกิดการกลายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับการเริ่มต้นและการลุกลามของโรค และความผิดปกติทางโครโมโซม ที่จะช่วยในการพยากรณ์การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา และเคมีบำบัด [21]

สถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* (*IGHV* mutation status)

บนผิวของ B-cell จะมีส่วนของ B-cell receptor (BCR) ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันส่วนที่สามารถปรับตัวต่อเชื้อโรคได้ ซึ่งมีกลไกที่ทำให้ B-cell สามารถสังเคราะห์ BCR ที่รับรู้ต่อแอนติเจนได้แบบไร้ขีดจำกัด โดยกระบวนการนี้เรียกว่า V(D)J recombination เป็นการเชื่อมต่อยีน VDJ เข้าด้วยกัน โดย B-cell ในระยะเริ่มต้นจะสร้างอิมมูโนโกลบูลินสาย heavy chain (IGH) ที่อยู่บนโครโมโซม 14 และจะเชื่อมต่อกันแบบสุ่ม โดยจัดเรียงยีน IGH เข้ากับ 1 ใน 27 ของ Diversity genes (IGHD) และจัดเรียงยีน IGH เข้ากับ 1 ใน 6 ของ Joining genes (IGHJ) ต่อจากนั้นส่วนของ DJ จะถูกรวมเข้ากับ 1 ใน 50 ของ variable genes (*IGHV*) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 7 กลุ่มย่อย (*IGHV1-IGHV7*) เช่นเดียวกันในส่วนของ light chain จะเชื่อมต่อเข้ากับ kappa (IGK) หรือ lambda [32] ดังรูปที่ 4 นอกจากนี้การจัดเรียงตัวของอิมมูโนโกลบูลินถูกสร้างขึ้นจากการแทรกแบบสุ่ม และการลบแบบสุ่มของ nucleotide ที่เป็น non templated (N-nucleotides) ที่เชื่อมระหว่าง IGHD-IGHJ, *IGHV*-IGHD และ IGKV/IGLV-IGKJ/IGLJ โดยสาย heavy chain และ light chain จะถูกเรียกว่า complementarity determining regions (CDRs) จะเชื่อมต่อเข้ากับส่วนที่เรียกว่า framework regions (FRs) โดยในส่วนของ CDR3 จะส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุด เนื่องจากเป็นส่วนที่มี *IGHV*-IGHD และ IGHD-IGHJ รวมถึง N-nucleotides ด้วยสำหรับสาย heavy chain ส่วนสาย light chain มี IGKV/IGLV-IGKJ/IGLJ เมื่อ B-cell ที่ผ่านกระบวนการ V(D)J recombination แล้วถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน BCR มีความหลากหลายเพิ่มโดยกลไก somatic hypermutation (SHM) ซึ่งมีเอนไซม์ activation induced cytidine deaminase [33] ที่ทำการเปลี่ยน single nucleotide บนอิมมูโนโกลบูลิน โดย BCRs มีการกลายพันธุ์ใน germinal center และจากกลไกเหล่านี้ทำให้มีรูปแบบของ BCR ที่ไม่ซ้ำกันมากถึง 10^{16} - 10^{18} แบบ [34] โดยที่จำนวน B-cell ในเลือดมนุษย์ถูกจำกัดให้มีประมาณ 5×10^9 ดังนั้น B-cell ที่หมุนเวียนอยู่ในเลือดเป็นเพียงส่วนหนึ่งของความหลากหลาย [35]



รูปที่ 4 โครงสร้างของ B-cell receptor (BCR) [34]

ผู้ป่วยโรค CLL สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีและกลุ่มที่ไม่มี การกลายพันธุ์ในส่วน variable region (V) ของ BCR สาย heavy chain เซลล์ CLL ที่ไม่มี การกลายพันธุ์ของ *IGHV* จะเรียกว่า โดยจะเรียกว่า *IGHV-UM* เกิดจาก B-cell ไม่ได้รับการเปลี่ยนแปลงสภาพเซลล์ (differentiation) ที่ germinal center ใน lymphoid tissue โดยมี SHM น้อยถึงไม่มีเลย และ *IGHV* มีความคล้ายคลึงกับ germline 98-100% ในขณะที่เซลล์ CLL ที่มีการกลายพันธุ์ของ *IGHV* เรียกว่า *IGHV-M* เกิดจากเซลล์ต้นกำเนิดได้ผ่านการเปลี่ยนแปลงสภาพเซลล์ที่ germinal center มี SHM และมีความคล้ายคลึงกับ germline น้อยกว่า 98% [20, 34] ซึ่งการกลายพันธุ์ของ *IGHV* ใน B-cell เกิดขึ้นระหว่างการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนไม่ก่อพยาธิสภาพ

ผู้ป่วยที่ไม่มี การกลายพันธุ์ของ *IGHV* พบว่ามีความรุนแรงของโรคมักกว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของ *IGHV* ในแง่ของระยะเวลาในการรักษาครั้งแรก, อัตราการรอดชีวิตโดยรวม (overall survival; OS) และอัตราการรอดชีวิตโดยโรคสงบ (progression free survival; PFS) หลังการรักษา [20] มีรายงานว่าค่า PFS และ OS ของผู้ป่วยที่ *IGHV-UM* สั้นกว่าผู้ป่วยที่ *IGHV-M* อย่างมีนัยสำคัญ โดยผู้ป่วยที่ *IGHV-UM* มีค่า PFS อยู่ในช่วง 1-5 ปี ในขณะที่ผู้ป่วย *IGHV-M* มี PFS อยู่ในช่วง 9.2-18.9 ปี เช่นเดียวกับค่า OS ผู้ป่วยที่ *IGHV-UM* มี OS อยู่ในช่วง 3-10 ปี ในขณะที่ผู้ป่วย *IGHV-M* มี OS อยู่ในช่วง 17.9-25.8 ปี [36]

การศึกษาสถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* ผู้ป่วยโรค CLL ที่มีเชื้อสายยุโรป มีรายงานว่าพบผู้ป่วยที่มี *IGHV-UM* และ *IGHV-M* ในสัดส่วนที่เท่ากัน ในขณะที่ผู้ป่วยเชื้อสายเอเชีย เช่น จีน และ ญี่ปุ่น พบ *IGHV-M* มากกว่า 70-90% [5] จากการศึกษาในผู้ป่วยชาวอิตาลี 51% มี *IGHV-UM* และ 49% มี *IGHV-M* [37] ส่วนการศึกษาในผู้ป่วยชาวไต้หวัน พบว่า 71.2% มี *IGHV-M* และ 28.8% มี *IGHV-UM* [38] นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยชาวเอเชียและชาวยุโรปมีการจัดเรียงของยีน *IGHV* ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาเปรียบเทียบในผู้ป่วยโรค CLL ชาวอิตาลีและชาวจีน พบการกลายพันธุ์ของกลุ่มย่อย *IGHV3* มากที่สุดทั้งสองเชื้อชาติ แต่ในผู้ป่วยชาวจีนพบ *IGHV4* สูงกว่าในผู้ป่วยโรค CLL ชาวอิตาลี ในขณะที่พบ *IGHV1* ในผู้ป่วยชาวจีนน้อยกว่าในผู้ป่วยโรค CLL ชาวอิตาลี [37] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang et al. [5] โดย subtype V1-69 พบได้น้อยกว่าในผู้ป่วยชาวจีน ในขณะที่ V3-7 และ V4-39 พบในผู้ป่วยชาวจีนมากกว่าชาวอิตาลี รองลงมาเป็น V4-59, V1-3 และ V3-74 ตามลำดับ [37] และจากการศึกษาลักษณะทางคลินิกของโรค CLL ในผู้ป่วยชาวจีน พบว่าสถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* สัมพันธ์กับระยะของโรค โดยพบผู้ป่วย *IGHV-UM* มากขึ้นในระยะที่โรคมีการลุกลาม หรือปานกลาง-สูง พบ *IGHV-UM* ในระยะ Binet A 18%, B 53% และ C 29%

ในขณะที่ผู้ป่วย *IGHV-M* พบมากในระยะเวลาที่มีความเสี่ยงน้อยกว่า พบ *IGHV-M* ในระยะ Binet A 71%, B 16% และ C 10% [17] ในขณะที่การศึกษาในชาวยุโรปพบ *IGHV-UM* ในระยะ Binet A มากกว่า ระยะ Binet B และ C โดยพบ *IGHV-UM* ในระยะ Binet A 42%, B 35% และ C 23% และพบ *IGHV-M* ในระยะ Binet A 74%, B 15% และ C 11% [39]

ความผิดปกติของโครโมโซม และการกลายพันธุ์ของยีน

ความผิดปกติของโครโมโซม และการกลายพันธุ์ของยีนในผู้ป่วยโรค CLL พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานหลายอย่างในเซลล์ ได้แก่ cell cycle, apoptosis, NOTCH1 signaling, DNA damage response, RNA processing, Inflammatory pathway, genome/chromatin structure และ BCR signaling ดังรูปที่ 5 ซึ่งความผิดปกติทางพันธุกรรมเหล่านี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการรักษา และเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการแยกผู้ป่วยที่มีผลลัพธ์ทางคลินิกที่แตกต่างกัน [7, 40]

- Cell cycle และ apoptosis เกี่ยวข้องกับ del13q14 โดยพบมากที่สุดในการป่วยประมาณ 50-60% การขาดหายไปนี้ส่งผลต่อ microRNAs คือ miR15-a และ miR16-1 และยีน *DLEU1* และ *DLEU2* ทำให้การแสดงออกของยีนเหล่านี้ลดลง จากการทดลองในหนูพบว่าทำให้เกิดการแบ่งตัวเซลล์ lymphocyte และกระตุ้นการทำงานของยีน *BCL2* ซึ่งเป็นยีนที่ยับยั้งการตายแบบ apoptosis โดยมักพบในผู้ป่วยที่อยู่ในระยะเริ่มต้นที่โรดยังไม่ลุกลาม และพบในผู้ป่วย *IGHV-M* มากกว่าใน *IGHV-UM* ซึ่งสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ดี
- NOTCH1 signaling เกี่ยวข้องกับยีน *NOTCH1* ซึ่งเป็นพบมากที่สุดในการป่วยโรค CLL เมื่อเกิดการกลายพันธุ์จะทำให้หน้าที่เป็น oncogene โดยยีน *NOTCH1* ถอดรหัสเป็นโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์ เมื่อจับกับลิแกนด์จะกลายโปรตีนเป็น ICN1 ทำงานในนิวเคลียส ซึ่งไปกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์, เมตาบอลิซึมของเซลล์, การรอดชีวิตของเซลล์ และกระตุ้นยีน *MYC* ที่เป็น proto-oncogene ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของเซลล์ มี 3% ของผู้ป่วย CLL ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของ *NOTCH1* แต่มีการกลายพันธุ์ของยีน *FBXW7* ทำให้ NOTCH1 signaling ผิดปกติได้เช่นกัน การกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH1* เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยระยะลุกลาม และมี trisomy12 ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของ *NOTCH1* ประมาณ 80% พบ *IGHV-UM* ร่วมด้วย สัมพันธ์กับการพยากรณ์ที่ไม่ดี และพบว่ามีความเสี่ยงที่จะเป็น Richter syndrome มากขึ้น แม้ว่าผู้ป่วยจะมี *IGHV-M* ซึ่ง Richter syndrome เกิดจากโรค CLL ที่เปลี่ยนไปเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดลุกลาม [41]

- Trisomy 12 พบในผู้ป่วยโรค CLL ประมาณ 15-20% โดยยังไม่ทราบความผิดปกติที่เกี่ยวข้อง โดย trisomy 12 สัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลิมโฟไซต์ที่ผิดปกติ และยังหาข้อสรุปไม่ได้ว่า trisomy 12 ทำให้ความเสี่ยงต่อการดำเนินโรคเพิ่มขึ้นหรือไม่ [42] เนื่องจากพบว่าทั้ง del13q14 และ trisomy 12 สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ดี และมีการดำเนินโรคอยู่ในระยะเริ่มต้น แต่ trisomy 12 เกิดร่วมกับการกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH1* สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ซึ่งสอดคล้องกับการพบ trisomy12 ในผู้ป่วยที่มี Richter syndrome
- DNA damage response เกี่ยวข้องกับ del17p13 ส่วนใหญ่มักจะพบการขาดหายไปของแขนข้างสั้นบนโครโมโซมคู่ที่ 17 กับการกลายพันธุ์ของยีน *TP53* ในอีกอัลลีล [43] การพยากรณ์โรคของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *TP53* สัมพันธ์กับการต้านการรักษาที่ใช้สารทำลาย DNA เช่น เคมีบำบัดหรือรังสีบำบัด เนื่องจากยีน *TP53* ทำหน้าที่ส่งเสริมการซ่อมแซม DNA, cell cycle และ apoptosis ดังนั้น การกลายพันธุ์ของยีน *TP53* จึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการตัดสินใจในรักษา ส่วนยีน *ATM* เป็น upstream ของยีน *TP53* บนโครโมโซม 11q22-23 โดยพบประมาณ 10% ของผู้ป่วยที่มี del11q ร่วมด้วย และพบเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่ *IGHV-UM* ทั้ง del11q และยีน *ATM* มักพบในผู้ป่วยเพศชาย อายุน้อย มีอาการต่อมน้ำเหลืองโต และมีการลุกลามของโรค
- RNA processing เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *SF3B1* พบในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่ประมาณ 10% และมีแนวโน้มพบเพิ่มขึ้นสูงกว่า 17% ในผู้ป่วยที่ดื้อต่อการรักษาด้วยยาฟลูดาโรบิน และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง บทบาทการกลายพันธุ์ของยีน *SF3B1* ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพการถอดรหัสของยีนในกลไกอื่น รวมถึง *NOTCH1* signaling และ DNA damage response ด้วย โดยพบว่ายีน *XPO1* และ *MED12* ที่เกี่ยวข้องกับการ RNA processing ด้วย และพบในผู้ป่วยที่มี del11q, del13q14 หรือ trisomy 12
- Inflammatory pathway และ NF- κ B pathway เกี่ยวข้องกับยีน *MYD88* โดยโปรตีน *MYD88* มีส่วนร่วมใน Toll-like receptor (TLR) pathway เมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนแล้วจะไปกระตุ้นโปรตีน NF- κ B ต่อเพื่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *MYD88* ประมาณ 3% ของผู้ป่วย ในทางกลับกันยีน *BIRC3* ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เป็น anti-apoptotic โดยไปยับยั้งการทำงานของ NF- κ B สามารถยับยั้ง

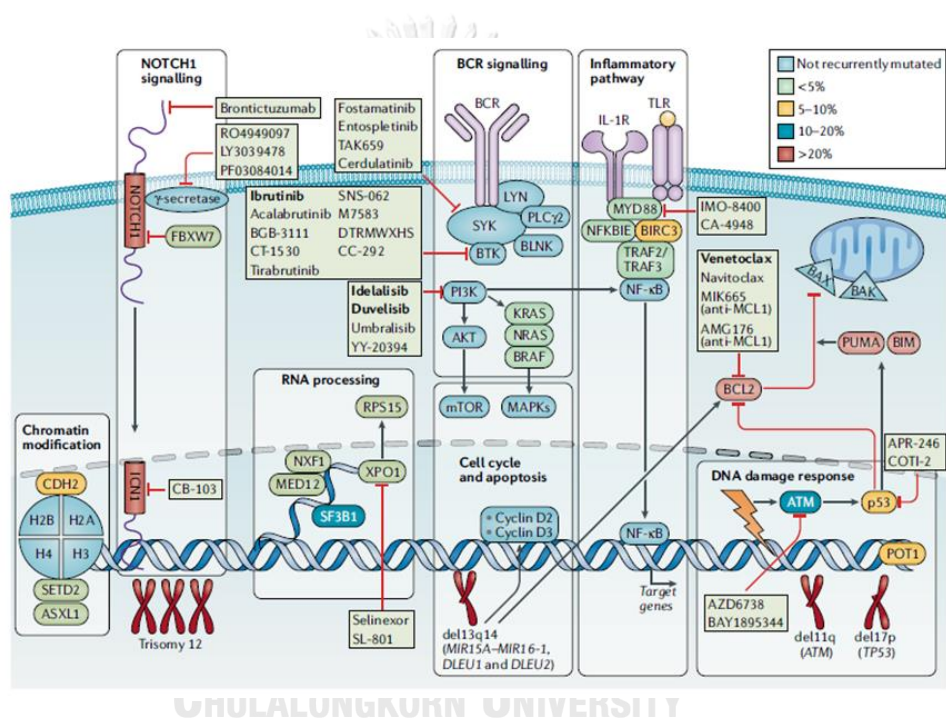
การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ การกลายพันธุ์ของยีน *BIRC3* ทำให้เกิดการ ทำงานของ NF- κ B และทำให้เกิดการตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดน้อยลง พบในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยประมาณ 2.2-4.3% สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี [20, 44]

- นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ของยีนอื่น ๆ ที่เป็นส่วนหนึ่งใน pathway อีกด้วย เช่น *HIST1H1E*, *CREBBP*, *BRAF*, *MTOR*, *CARD11* เป็นต้น [45]

ค่า PFS และ OS ของผู้ป่วยที่มี *del17p13* และ *del11q23* หรือผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูง มี PFS และ OS สั้นกว่าผู้ป่วยที่ปกติ, *del13q* และ trisomy 12 หรือเป็นผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่ำ โดยผู้ป่วยที่มี *del17p13* และ *del11q23* มี PFS อยู่ในช่วง 0.1-5.2 ปี ในขณะที่ผู้ป่วยที่ปกติ, *del13q* และ trisomy 12 มีค่า PFS อยู่ในช่วง 1.5-22 ปี และผู้ป่วยที่มี *del17p13* และ *del11q23* มี OS อยู่ในช่วง 3.3-9.7 ปี ในขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่มีความผิดปกติของโครโมโซม, *del13q* และ trisomy 12 มีค่า OS อยู่ในช่วง 7.5-20.5 ปี [36] ความผิดปกติของโครโมโซมที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยโรค CLL เชื้อสายยุโรป คือ *del13q14* 55%, *del11q* 18%, trisomy 12 16% และ *del17p13* 7% [9] ส่วนความผิดปกติของโครโมโซมที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยโรค CLL ชาวไต้หวัน คือ *del13q14* 43.7%, *del11q* 6.9%, trisomy 12 18.6% และ *del17p13* 10.4% เมื่อเปรียบเทียบกัน พบว่า *del13q*, trisomy 12, *del17p* มีความคล้ายคลึงกัน แต่ *del11q* ของผู้ป่วยชาวเอเชียพบต่ำกว่าในผู้ป่วยเชื้อสายยุโรป [38] นอกจากนี้ยังพบว่าความผิดปกติของโครโมโซมสัมพันธ์กับระยะของโรค โดยในผู้ป่วยชาวยุโรป พบว่าความผิดปกติของโครโมโซมที่มีความเสี่ยงสูง *del11q23/del17p* พบในผู้ป่วยที่โรคอยู่ในระยะ Binet B/C ที่มีความเสี่ยงสูงมากกว่าในระยะ Binet A ตรงกันข้ามกับ *del13q*, trisomy 12 หรือไม่มีความผิดปกติของโครโมโซม พบในผู้ป่วยที่โรคอยู่ในระยะ Binet A ที่มีความเสี่ยงต่ำมากกว่า [9] คล้ายกับในผู้ป่วยชาวจีน แต่ต่างกันที่ความผิดปกติของโครโมโซมที่มีความเสี่ยงสูง *del11q23/del17p* ของชาวจีนพบในผู้ป่วยที่โรคอยู่ในระยะ Binet A มากกว่า ในผู้ป่วยชาวจีน ยังพบว่าความผิดปกติของโครโมโซมสัมพันธ์กับสถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของโครโมโซมที่มีความเสี่ยงสูง *del11q23/del17p* พบ *IGHV-UM* บ่อยกว่าผู้ป่วยที่มี *del13q*, trisomy 12 หรือไม่มีความผิดปกติของโครโมโซม [17]

การกลายพันธุ์ของยีนในผู้ป่วยโรค CLL เชื้อสายยุโรป พบ *TP53* 15%, *SF3B1* 15%, *MYD88* 10%, *NOTCH1* 4.0% และ *FBXW7* 4.0% [46] และในผู้ป่วยชาวจีน พบการกลายพันธุ์ของ *MYD88* 11.5%, *TP53* 8.2%, *SF3B1* 6.6%, *NOTCH1* 4.9% และ *FBXW7* 1.6% เมื่อเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของยีนที่พบในผู้ป่วยเชื้อสายเอเชียและยุโรป พบว่าในผู้ป่วยชาวเอเชียมี

การกลายพันธุ์ของยีน *MYD88* มากกว่าในผู้ป่วยชาวยุโรป ในขณะที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *TP53* และ *SF3B1* น้อยกว่าในผู้ป่วยชาวยุโรป นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีนสัมพันธ์กับความผิดปกติของโครโมโซม และสถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* โดยพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *TP53* สัมพันธ์กับ del17p, การกลายพันธุ์ของยีน *SF3B1* สัมพันธ์กับ del11q, การกลายพันธุ์ของยีน *NOTCH1* สัมพันธ์กับ Trisomy12 นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีน *TP53* และ *SF3B1* ยังสัมพันธ์กับ *IGHV-UM* สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ในขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน *MYD88* สัมพันธ์กับ *IGHV-M* [17, 45] โดยสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 4



รูปที่ 5 แสดง pathway ที่เกี่ยวข้องกับที่เกี่ยวกับการเกิดโรค CLL [44]

ตารางที่ 4 ความแตกต่างของพันธุกรรมที่พบในผู้ป่วยโรค CLL ชาวเอเชียและยุโรป

Genetic alterations	Asian	European	Correlation	Prognostic
<i>IGHV</i> mutation status [5]	<i>IGHV</i> -M > <i>IGHV</i> -UM	<i>IGHV</i> -M = <i>IGHV</i> -UM	-	-
Subgroup [37]	<i>IGHV</i> 3, <i>IGHV</i> 4	<i>IGHV</i> 3, <i>IGHV</i> 1	-	-
Subtype [37]	V3-7, V4-3	V1-69	-	-
Cytogenetic abnormalities [9, 38]	del13q		<i>IGHV</i> -M	Favorable [44]
	Trisomy12		<i>NOTCH1</i>	Poor [44]
	del17p		<i>TP53</i>	Poor [44]
	del11q: Asian < European		<i>ATM</i>	Poor [44]
Genetic mutations [17, 46]	<i>MYD88</i> : Asian > European		<i>IGHV</i> -M [17]	-
	<i>TP53</i> : Asian < European		<i>IGHV</i> -UM	Poor [45]
	<i>SF3B1</i> : Asian < European		<i>IGHV</i> -UM	Poor [45]
	<i>NOTCH1</i> : Asian > European		<i>IGHV</i> -UM	Poor [36]

2.8 โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟซิตชนิดเรื้อรังในประเทศไทย

สำหรับในประเทศไทย โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟซิตชนิดเรื้อรังเป็นโรคที่พบน้อยมาก และยังมีข้อมูลรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความชุก และอุบัติการณ์ของโรคที่ชัดเจน เนื่องจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่ในแต่ละปีมีจำนวนน้อยมาก จากการศึกษาลักษณะทางคลินิกของโรค CLL ย้อนหลังในคนไทยที่ได้รับการวินิจฉัย ระหว่างปีพ.ศ.2506-2531 (ค.ศ.1963-1988) พบว่ามีผู้ป่วยเพียง 184 รายเท่านั้น มีอายุเฉลี่ยประมาณ 60-80 ปี อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 2:1 และมี 12% ของผู้ป่วยที่เป็นผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 50 ปี โดยอาการส่วนใหญ่ที่พบในผู้ป่วยชาวไทย คือ ม้ามโต 64%, ต่อม้ำเหลืองโต 60% โลหิตจาง 54% และมีผู้ป่วยเพียง 8% เท่านั้นที่ไม่มีการแสดงอาการ ผู้ป่วยชาวไทยส่วนใหญ่จะได้รับการวินิจฉัยโรคว่าอยู่ในระยะที่มีความเสี่ยงสูง (Rai III, IV) ซึ่งจากการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยในไทยกับผู้ป่วยชาวตะวันตกที่มีระยะของโรคเท่ากัน พบว่า อัตราการรอดชีวิตในคนไทยสั้นกว่า [14]

2.9 การรักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง

จะเริ่มทำการรักษาเฉพาะกับผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวหรือมีอาการ มีการลุกลามของโรค หรือได้รับการประเมินตามระบบ Binet หรือ Rai ที่มีความเสี่ยงสูงเท่านั้น การลุกลามของโรคมีผลมาจากการแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์ไม่สมดุลกัน ซึ่งเกิดจากการตายของเซลล์ที่ลดลง (apoptosis) หรือ การแบ่งเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการรักษาจะเน้นไปที่กลไกการตายและการแบ่งตัวของเซลล์ [1] และยังมีไม่มีแนวทางการรักษาที่เป็นมาตรฐานสำหรับผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำ ซึ่งการเลือกยาจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาการตอบสนองจากการรักษาครั้งแรก สมรรถภาพของผู้ป่วย และผลข้างเคียงจากการรักษาครั้งก่อน และการตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรมก่อนให้ยาจะสามารถช่วยในการป้องกันการใช้ยาของผู้ป่วยได้ [47] โดยมีตัวเลือกในการรักษาโดยการใช้ยา 3 กลุ่ม ได้แก่ ยาในกลุ่ม Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor เช่น ibrutinib และ acalabrutinib, ยาในกลุ่ม immunochemotherapy เช่น rituximab-fludarabine (R-FC), rituximab-bendamustine (R-B) และ chemoimmunotherapy



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

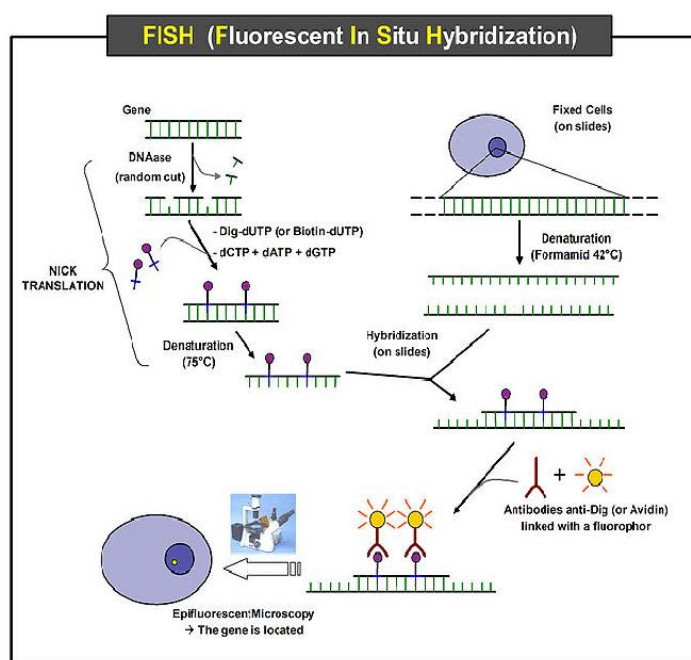
ผู้ป่วยและกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาในสหสถาบัน แบบย้อนหลัง (Retrospective study) ในผู้ป่วยโรค CLL ที่ได้รับการรักษาในประเทศไทย โดยใช้ตัวอย่างทางชีวภาพที่เหลือจำนวน 80 ราย จากโครงการวิจัย การลงทะเบียนผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิดเรื้อรัง ในประเทศไทย: การศึกษาโดยสหสถาบัน (IRB No.580/60) ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2561 ถึงพฤศจิกายน 2564 ในการวิเคราะห์สถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV*, ตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน โดยใช้ Next generation sequencing (NGS) และทำการเก็บรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ เชื้อชาติ ข้อมูลความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete blood count; CBC) และข้อมูลลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของเซลล์ และผลการวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม โดยผ่านการรับรองจากคณะกรรมการการวิจัยจริยธรรมการวิจัยในคนแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No.112/65)

การเก็บรวบรวมผลการวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม ด้วยเทคนิค Fluorescent in situ hybridization (FISH)

ทำการรวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้จากการศึกษาของโครงการวิจัย IRB No.580/60 ที่มีการเก็บตัวอย่างเลือดในหลอดที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด Sodium heparin 2-5 มิลลิลิตร ส่งศูนย์ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย เพื่อทำการวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม del17p และ del11q โดยรักษาอุณหภูมิของตัวอย่าง 4-30 °C หากไม่สามารถนำส่งได้ในวันที่เจาะ ให้เก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็น 4 °C และนำส่งภายใน 36 ชั่วโมง ตัวอย่างจะถูกนำมาวัดค่า white blood cell โดยใช้เซลล์ที่อยู่ในระยะ interphase จากนั้นทำการ fix เซลล์เพื่อให้เซลล์คงตัว โดยใช้ 3:1 Ethanol: Acetic acid และนำเซลล์มาหยดลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง เติมน้ำ probe (MetaSystems Probes, Altusheim, Germany) ที่จำเพาะกับบริเวณที่ต้องการศึกษา (del17p และ del11q) ปริมาณ 10 ul ปิดด้วยแผ่น coverslip ทำการ denature โดยให้ความร้อนกับสไลด์บนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ DNA ในเซลล์แยกสายคู่ออกเป็นสายเดี่ยว ๆ ทำการ hybridization โดยบ่มที่ 37°C ค้างคืน เพื่อให้ probe เข้าไปจับกับ DNA บริเวณที่จำเพาะกับ probe จากนั้นทำการแกะ coverslip และล้างสไลด์เพื่อเอา probe ส่วนเกิน หรือ

probe ที่จับแบบไม่จำเพาะออก (post-hybridization wash) โดยใช้ 0.4x saline-sodium citrate (SSC) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นใช้ 2x SSC, 0.05% Tween20 ล้างผ่านสไลด์ที่อุณหภูมิอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเติม DAPI/antifade ปิดด้วยแผ่น coverslip ทิ้งไว้ 10 นาที ก่อนนำไปอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม



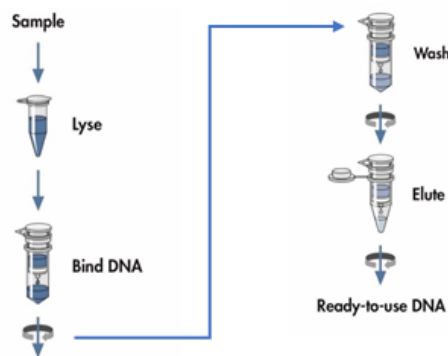
รูปที่ 6 Fluorescent in situ hybridization (FISH) [48]

การเก็บรวบรวมผลการวิเคราะห์การแสดงออกของเซลล์ ด้วยเทคนิค Flow cytometry

ทำการรวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของเซลล์ ด้วยเทคนิค Flow cytometry โดยใช้แอนติบอดี ดังนี้ Kappa-FITC, Lambda-PE, CD19-PE CF594, CD5-APC-H7, CD20-BV421, CD23-FITC, CD10-PE, CD200-APC, CD22-APC, CD79b-APC-H7 จาก Becton Dickinson (BD Biosciences, CA, USA) วิเคราะห์เซลล์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์ BD LSRFortessa™ (BD Biosciences, CA, USA)

การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดมาสกัด DNA ด้วยชุดน้ำยา QIAamp® DNA mini kit (QIAamp, Hilden, Germany) โดยนำเลือดจากหลอดเก็บเลือดที่มีสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA ปริมาตร 200 µl ผสมกับ proteinase K ปริมาตร 20 µl และ buffer AL ปริมาตร 200 µl บ่มที่อุณหภูมิ 56°C ใน water bath เป็นเวลา 10 นาที เพื่อ lyse cell จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 µl แล้วเทสารผสมลงใน QIAamp mini spin column จากนั้นปิดฝาแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ collection tube ที่มีสารผสมอยู่ และย้าย QIAamp mini spin column ใส่ collection tube อันใหม่ จากนั้นทำการล้าง เติม buffer AW1 ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ collection tube ที่มีสารผสมอยู่ และย้าย QIAamp mini spin column ใส่ลงใน collection tube อันใหม่ ทำการล้างซ้ำโดยการเติม buffer AW2 ปริมาตร 500 µl แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ที่ collection tube ที่มีสารผสมอยู่ และย้าย QIAamp mini spin column ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ เติม buffer AE ปริมาตร 100 µl บ่มอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที DNA จะตกลงมาอยู่ใน microcentrifuge tube ที่ QIAamp mini spin column แล้วปิดฝา microcentrifuge tube ที่มี DNA อยู่ เก็บรักษา DNA ไว้ที่ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อป้องกัน DNA เสื่อมสภาพ จนกว่าจะนำ DNA ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Qubit 4 Fluorometer ซึ่งใช้หลักการของการเรืองแสงจากสีฟลูออเรสเซนต์ที่จะเข้าไปจับกับโมเลกุลของสารพันธุกรรมที่ต้องการทราบปริมาณอย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้สามารถวัดความเข้มข้นได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ [49] ก่อนจะนำไปตรวจวิเคราะห์สถานะการณีกลายพันธุ์ของ IGHV และตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีนเกี่ยวข้องกับโรค CLL ต่อไป



รูปที่ 7 ขั้นตอนการสกัด DNA [41]

การตรวจวิเคราะห์สถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* ด้วยเทคนิค Next generation sequencing

นำ DNA ที่ผ่านการสกัด และวัดความเข้มข้นแล้ว มาปรับความเข้มข้น DNA ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 10 ng/ul เตรียม Library โดยการทำให้ Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยเครื่อง Thermal cycle เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *IGHV* ซึ่งใช้ DNA 5 ul, Taq DNA polymerase 0.2 ul และชุดน้ำยา LymphoTrack® IGH FR1 Assay - S5/PGM (Invivoscribe Inc., San Diego, CA, US) ซึ่งเป็น Master Mix 45 ul แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal cycle จากนั้นนำ Library ที่ได้มา purification เพื่อกำจัด DNA, Taq DNA polymerase และน้ำยา Master Mix ส่วนเกินออก วัดความเข้มข้น และคุณภาพของ Library ด้วยเครื่อง Bioanalyzer จากนั้นปรับความเข้มข้นของ Library ให้เหมาะสมก่อนบรรจุ Library ลงใน Chip ด้วยเครื่อง Ion Chef system (Thermo Fisher Scientific) และนำ Chip ไป Sequencing ด้วยเครื่อง Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher Scientific) เพื่อหาลำดับนิวโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม LymphoTrack® Dx software และแปลผลข้อมูล

การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน ด้วยเทคนิค Next generation sequencing

นำ DNA ที่ผ่านการสกัด และวัดความเข้มข้นแล้ว มาปรับความเข้มข้น DNA ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ng/ul จากนั้นนำมาเตรียม Library โดยใช้ชุดน้ำยา Oncomine™ Lymphoma Panel (Thermo Fisher Scientific) และบรรจุ Library ลงใน Chip ด้วยเครื่อง Ion Chef system (Thermo Fisher Scientific) และนำ Chip ไป Sequencing ด้วยเครื่อง Ion GeneStudio S5 (Thermo Fisher Scientific) เพื่อหาลำดับนิวโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ Ion Reporter™ 5.20.0.0

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติดำเนินการโดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 29.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) ใช้ median, mean, และ range ในการวิเคราะห์ลักษณะทางคลินิกและตัวแปรต่อเนื่อง วิเคราะห์ตัวแปรตามหมวดหมู่โดยใช้ frequency (%) การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรตามกลุ่มอายุและอาการ ใช้ Chi's square test, ตัวแปรหมวดหมู่ ใช้ Fisher's exact test และตัวแปรต่อเนื่องใช้ independent sample t-test โดยการทดสอบทางสถิติทั้งหมดเป็นแบบสองด้าน และกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4 ผลการวิจัย

ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค CLL จำนวน 80 ราย พบว่าผู้ป่วยมีอายุเฉลี่ย 66 ปี (35-91 ปี) เป็นเพศชาย 54 คน (67.5%) และเพศหญิง 26 คน (32.5%) อัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง, 2.1:1 โดยผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทยมีค่าเฉลี่ยความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด ณ เวลาที่วินิจฉัยโรคของผู้ป่วย ได้แก่ ฮีโมโกลบิน เม็ดเลือดขาว ลิมโฟไซต์ และจำนวนเกล็ดเลือด คือ 11.90 g/dL (5.60-15.70 g/dL), 55.72×10^3 cell/uL ($3.59-422.00 \times 10^3$ cell/uL), 74.96% (26.40-98.00%) และ 185.78×10^3 cell/uL ($12.00-427.00 \times 10^3$ cell/uL) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

37.5% ของผู้ป่วยโรค CLL พบว่าไม่มีอาการ (Asymptomatic) ส่วนผู้ป่วยที่มีอาการพบต่อมน้ำเหลืองโต (Lymphadenopathy) 35% รองลงมาคือ ม้ามโต 11.3%, อาการข้างเคียงที่เกิดร่วม 11.3%, ภาวะโลหิตจาง (Anemia) 10%, เม็ดเลือดขาวสูง (Lymphocytosis) 8.8% และภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (Thrombocytopenia) 3.8% จากข้อมูลการติดตามผู้ป่วยเป็นเวลา 4 ปี พบว่าผู้ป่วยยังมีชีวิตอยู่ 75% และเสียชีวิต 15% มีผู้ป่วยได้รับยาเคมีบำบัดชนิด Chemotherapy 27.5%, Immunochemotherapy 26.3%, BTK inhibitor 3.8% และมีผู้ป่วยที่ไม่ต้องได้รับการรักษา 37.5% ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยโรค CLL 80 รายในประเทศไทย

Characteristics	N=80 (Range)
Median age	66 (35-91)
Gender	
Male	54 (67.5%)
Female	26 (32.5%)
Ratio (M:F)	2.08:1
Mean Hb (g/dL)	11.90 (5.60-15.70)
Mean WBC ($\times 10^3$ cell/uL)	55.72 (3.59-422.00)
Mean Lymphocyte (%)	74.96 (26.40-98.00)
Mean Plt ($\times 10^3$ cell/uL)	185.78 (12.00-427.00)
Symptoms	
Asymptomatic	30 (37.5%)
Lymphadenopathy	28 (35.0%)
Splénomegaly	9 (11.3%)
Constitutional symptoms	9 (11.3%)
Anemia	8 (10.0%)
Lymphocytosis	7 (8.8%)
Thrombocytopenia	3 (3.8%)
Status	N=72
Dead	12 (15.0%)
Alive	60 (75.0%)
	N=76
No Treatment	30 (37.5%)
Treatment	46 (57.5%)
BTK inhibitor	3 (3.8%)
Immunochemotherapy	21 (26.3%)
Chemotherapy	22 (27.5%)

ผลการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของเซลล์

จากการเก็บรวบรวมผลการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของเซลล์ ด้วยเทคนิค Flow cytometry พบว่าการแสดงออกของเซลล์ที่พบบ่อยที่สุดคือ CD19 (100%) และ CD20 (100%) รองลงมาเป็น CD22 (89.7%), CD79b (89.2%), CD200 (87.0%), CD5 (82.5%), Lambda (48.8%), Kappa (43.8%), CD23 (37.5%) ตามลำดับ และไม่พบว่ามี การแสดงออกของ CD10 (0%) (ตารางที่ 6)

ผลการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม ด้วยเทคนิค Fluorescent in situ hybridization (FISH)

จากการเก็บรวบรวมผลตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วยโรค CLL ชาวไทย จำนวน 80 ราย (ตารางที่ 6) พบว่าผู้ป่วยชาวไทยมี del17p (N=13, 16.3%) มากกว่า del11q (N=5, 6.3%)

ผลการตรวจวิเคราะห์สถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* ด้วยเทคนิค NGS

พบว่าผู้ป่วย 79 รายจาก 80 รายได้รับการตรวจวิเคราะห์สถานะการกลายพันธุ์ *IGHV* พบ *IGHV-M* (N=55, 68.8%) มากกว่า *IGHV-UM* (N=24, 30%) (ตารางที่ 6)

ผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน ด้วยเทคนิค NGS

ผู้ป่วย 71 รายจาก 80 รายที่ได้รับการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน โดยยีนที่พบว่ามี การกลายพันธุ์มากที่สุด คือ *ARID1A* (N=61, 85.9%), *KMT2D* (N=56, 78.9%), *MYD88* (N=13, 18.3%), *TP53* (N=9, 12.7%), *SF3B1* (N=9, 11.3%) และพบการกลายพันธุ์ของ *ATM* (N=7, 9.9%) น้อยที่สุด (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีทั้ง del17p และการกลายพันธุ์ของ *TP53* ร่วมกัน 6 ราย (7.5%) และมี del11q ร่วมกับการกลายพันธุ์ของ *ATM* 3 ราย (3.8%)

ตารางที่ 6 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทย

Parameter	N (%)
Flow cytometry	
CD19	80 (100.0% of 80 cases)
CD20	78 (100.0% of 78 cases)
CD22	61 (89.7% of 68 cases)
CD79b	58 (89.2% of 65 cases)
CD200	67 (87.0% of 77 cases)
CD5	66 (82.5% of 80 cases)
Lambda	39 (48.8% of 80 cases)
Kappa	35 (43.8% of 80 cases)
CD23	30 (37.5% of 80 cases)
CD10	0 (0.0% of 73 cases)
FISH abnormalities	
del 17p	13 (16.3% of 80 cases)
del 11q	5 (6.3% of 80 cases)
Normal	62 (77.5% of 80 cases)
IGHV mutation status	N=79
Mutated	55 (69.6%)
Unmutated	24 (30.4%)
Missing	1
Genetic mutations	N=71
<i>ARID1A</i>	61 (85.9%)
<i>KMT2D</i>	56 (78.9%)
<i>MYD88</i>	13 (18.3%)
<i>TP53</i>	9 (12.7%)
<i>SF3B1</i>	8 (11.3%)
<i>ATM</i>	7 (9.9%)
del17p with <i>TP53</i> mutation	6 (7.5%)
del11q with <i>ATM</i> mutation	3 (3.8%)

จากการเปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกระหว่างผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปีและกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไปในตารางที่ 7 พบว่าในผู้ป่วย 80 ราย เป็นผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อย (<65 ปี) 34 ราย (42.5%) มีอายุเฉลี่ย 55 ปี และ 46 ราย (57.5%) เป็นผู้ป่วยกลุ่มสูงอายุ (≥65 ปี) มีอายุเฉลี่ย 74 ปี โดยผู้ป่วย ทั้ง 2 กลุ่มอายุ พบว่ามีเพศชายมากกว่าเพศหญิง โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่า ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด, อาการที่พบ, สถานะการมีชีวิตอยู่ และการได้รับการรักษา เมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปีและกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไป แม้ว่าผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มจะ ไม่มีความแตกต่างกัน ผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี พบว่ามีค่าเฉลี่ยของฮีโมโกลบิน เม็ดเลือดขาว และลิโพโปรตีน ที่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยอายุ 65 ปีขึ้นไป ในขณะที่ค่าเฉลี่ยเกล็ดเลือดของผู้ป่วยกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไปสูงกว่า อาการที่พบมากที่สุดในผู้ป่วยคือ กลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี คือ ต่อม้ำเหลืองโต แต่ ผู้ป่วยกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไปพบว่าส่วนใหญ่จะไม่มีอาการ และผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปีได้รับยา ในกลุ่ม Chemotherapy มากที่สุด(52.2%) ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไปได้รับยาในกลุ่ม Immunochemotherapy มากที่สุด (56.5%)

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของเซลล์ในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปีมีการแสดงออกของ CD22 ของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (N=22 (78.6%), N= 39 (97.5%) ตามลำดับ, p=0.017) ส่วนการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของ โครโมโซม พบว่าผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี พบ del17p น้อยกว่าผู้ป่วยกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไป (N=5 (14.7%), N=8 (17.4%) ตามลำดับ) ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี พบ del11q มากกว่าผู้ป่วยกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไป (N=4 (11.8%), N=1 (2.2%) ตามลำดับ) นอกจากนี้พบ *IGHV-M* มากกว่า *IGHV-UM* ในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม

ซึ่งจากการเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการระหว่างผู้ป่วยโรค CLL กลุ่ม อายุ น้อย (<65 ปี) และสูงอายุ (≥65 ปี) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของเซลล์, ความผิดปกติของโครโมโซม, สถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* และการกลายพันธุ์ของยีน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มอายุของผู้ป่วย (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกระหว่างผู้ป่วยโรค CLL กลุ่มอายุน้อย (<65 ปี) และ
สูงอายุ (≥65 ปี)

	<65, N=34 (42.5%)	≥65, N=46 (57.5%)	<i>p-value</i>
Mean age	54.74	73.67	
Sex			
Male	24 (70.6%)	30 (65.2%)	0.612
Female	10 (29.4%)	16 (34.8%)	
Mean Hb (g/dL)	12.01	11.83	0.701
Mean WBC (x10 ³ cell/uL)	56.53	55.13	0.933
Mean Lymphocyte (%)	78.41	72.40	0.094
Mean Plt (x10 ³ cell/uL)	169.03	198.15	0.087
Symptoms			
Asymptomatic	12 (35.3%)	18 (39.1%)	0.726
Lymphadenopathy	15 (44.1%)	13 (28.3%)	0.142
Splenomegaly	5 (14.7%)	4 (8.7%)	0.484
Constitutional symptoms	5 (14.7%)	4 (8.7%)	0.484
Lymphocytosis	3 (8.8%)	4 (8.7%)	1.000
Anemia	2 (5.9%)	6 (13.0%)	0.456
Thrombocytopenia	1 (2.9%)	2 (4.3%)	1.000
Status			
Dead	4 (12.9%)	8 (19.5%)	0.456
Alive	27 (87.1%)	33 (80.5%)	
No Treatment	9 (28.1%)	21 (47.7%)	0.084
Treatment	23 (71.9%)	23 (52.3%)	
BTK inhibitor	3 (13.0%)	0 (0%)	0.112
Immunochemotherapy	8 (34.8%)	13 (56.5%)	
Chemotherapy	12 (52.2%)	10 (43.5%)	

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการระหว่างผู้ป่วยโรค CLL กลุ่มอายุน้อย (<65 ปี) และสูงอายุ (≥65 ปี)

	<65, N=34 (42.5%)	≥65, N=46 (57.5%)	<i>p-value</i>
Flow cytometry			
CD19	34 (100%)	46 (100%)	1.000
CD20	32 (100%)	46 (100%)	1.000
CD200	30 (93.8%)	37 (82.2%)	0.180
CD22	22 (78.6%)	39 (97.5%)	0.017
CD79b	24 (88.9%)	34 (89.5%)	1.000
Lambda	18 (52.9%)	21 (45.7%)	0.519
Kappa	13 (38.2%)	22 (47.8%)	0.393
CD5	30 (88.2%)	36 (78.3%)	0.246
CD23	14 (41.2%)	16 (34.8%)	0.559
CD10	0 (0%)	0 (0%)	1.000
FISH abnormalities			
del 17p	5 (14.7%)	8 (17.4%)	0.214
del 11q	4 (11.8%)	1 (2.2%)	
Normal	25 (73.5%)	37 (80.4%)	
IGHV mutation status			
Mutated	22 (66.7%)	33 (71.7%)	0.629
Unmutated	11 (33.3%)	13 (28.3%)	
Missing	1	0	
Genetic mutations			
<i>ARID1A</i>	27 (90.0%)	34 (82.9%)	0.502
<i>KMT2D</i>	25 (83.3%)	31 (67.4%)	0.431
<i>TP53</i>	4 (13.3%)	5 (12.2%)	1.000
<i>ATM</i>	5 (16.7%)	2 (4.9%)	0.125
<i>SF3B1</i>	3 (10.0%)	5 (12.2%)	1.000
<i>MYD88</i>	4 (13.3%)	9 (22.0%)	0.354
del17p with <i>TP53</i> mutation	3 (8.8%)	3 (6.5%)	0.695
del11q with <i>ATM</i> mutation	3 (8.8%)	0 (0%)	0.073

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกระหว่างผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีอาการและมีอาการในตารางที่ 9 พบว่าในผู้ป่วย 76 จาก 80 ราย พบว่าเป็นผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีอาการ 30 ราย (37.5%) มีอายุเฉลี่ย 69 ปี และ 46 ราย (57.5%) เป็นผู้ป่วยที่มีอาการ มีอายุเฉลี่ย 64 ปี และผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มอายุ พบเพศชายมากกว่าเพศหญิง จากข้อมูลความสำเร็จของเม็ดเลือด พบว่าค่าเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการ (12.54 g/dL) สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการ (11.62 g/dL) ($p=0.049$) ดังแสดงในตารางที่ 9 ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในตัวแปรค่าเฉลี่ยความสำเร็จของเม็ดเลือดอื่น ๆ โดยในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มพบว่าผู้ป่วยยังมีชีวิตอยู่มากกว่าผู้ป่วยเสียชีวิต

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของเซลล์ในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีอาการมีการแสดงออกของ CD200 น้อยกว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการ ($N=23$ (76.7%), $N=41$ (93.2%) ตามลำดับ, $p=0.041$) ส่วนการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าผู้ป่วยที่มีอาการพบ del17p ($N=9$, (19.6%)) และ del11q ($N=4$, (8.7%)) มากกว่าผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีอาการ ($N=4$ (13.3%), $N=1$ (3.3%) ตามลำดับ) นอกจากนี้ในผู้ป่วยในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มพบ *IGHV-M* มากกว่า *IGHV-UM* โดยผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีอาการพบ *IGHV-M* มากกว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการ ($N=26$ (86.7%), $N=25$ (55.6%) ตามลำดับ, $p=0.005$) และยังพบการกลายพันธุ์ของยีน *MYD88* ในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่มีอาการ มากกว่าผู้ป่วยกลุ่มที่มีอาการ ($N=9$ (36.%) , $N=4$ (9.3%) ตามลำดับ, $p=0.007$) (ตารางที่ 10)

การกลายพันธุ์ของยีนมีความสัมพันธ์กับลักษณะความผิดปกติของโครโมโซม และสถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* โดยพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *TP53* สัมพันธ์กับ del17p ($p<0.001$) การกลายพันธุ์ของยีน *ATM* สัมพันธ์กับ del11q และ Normal FISH ($p<0.001$) นอกจากนี้ยังพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *SF3B1* สัมพันธ์กับ Normal FISH อีกด้วย ($p=0.041$) (ตารางที่ 11) เมื่อดูความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีนมีความสัมพันธ์กับสถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *TP53* สัมพันธ์กับ *IGHV-UM* ($p=0.010$) และยังพบว่า del17p สัมพันธ์กับ *IGHV-UM* ($p=0.044$)

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกระหว่างผู้ป่วยโรค CLL กลุ่มที่มีอาการ และไม่มีอาการ

	Asymptomatic, N=30 (37.5%)	Symptomatic, N=46 (57.5%)	<i>p-value</i>
Mean age	68.57	64.35	0.102
Sex			
Male	21 (70.0%)	32 (69.6%)	1.000
Female	9 (30.0%)	14 (30.4%)	
Mean Hb (g/dL)	12.54	11.62	0.049
Mean WBC ($\times 10^3$ cell/uL)	46.86	61.35	0.413
Mean Lymphocyte	73.58	75.20	0.663
Mean Plt ($\times 10^3$ cell/uL)	199.63	170.07	0.057
Status			
Dead	3 (10.3%)	9 (20.9%)	0.338
Alive	26 (89.7%)	34 (79.1%)	

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการระหว่างผู้ป่วยโรค CLL กลุ่มที่มีอาการ และไม่มีอาการ

	Asymptomatic, N=30 (37.5%)	Symptomatic, N=46 (57.5%)	<i>p</i> -value
Flow cytometry			
CD19	30 (100%)	46 (100%)	1.000
CD20	30 (100%)	44 (100%)	1.000
CD22	26 (100.0%)	34 (87.2%)	0.057
CD200	23 (76.7%)	41 (93.2%)	0.041
CD79b	22 (88.0%)	33 (89.2%)	0.885
CD5	25 (83.3%)	37 (80.4%)	1.000
Lambda	12 (40.0%)	26 (56.5%)	0.240
Kappa	15 (50.0%)	17 (37%)	0.343
CD23	9 (30.0%)	18 (39.1%)	0.470
CD10	0 (0%)	0 (0%)	1.000
FISH abnormalities			
del 17p	4 (13.3%)	9 (19.6%)	0.466
del 11q	1 (3.3%)	4 (8.7%)	
Normal	25 (83.3%)	33 (71.7%)	
IGHV mutation status			
Mutated	26 (86.7%)	25 (55.6%)	0.005
Unmutated	4 (13.3%)	20 (44.4%)	
Missing		1	
Genetic mutations			
<i>ARID1A</i>	22 (88.0%)	37 (86.0%)	0.819
<i>KMT2D</i>	22 (88.0%)	31 (72.1%)	0.224
<i>TP53</i>	3 (12.0%)	6 (14.0%)	1.000
<i>ATM</i>	3 (12.0%)	4 (9.3%)	0.724
<i>SF3B1</i>	3 (12.0%)	4 (9.3%)	0.724
<i>MYD88</i>	9 (36.0%)	4 (9.3%)	0.007
del17p with TP53 mutation	2 (6.7%)	4 (8.7%)	0.748
del11q with ATM mutation	1 (3.3%)	2 (4.3%)	0.824

ตารางที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะความผิดปกติทางพันธุกรรม

FISH abnormalities				
	del17p	del11q	Normal	<i>p-value</i>
<i>ARID1A</i>	12 (19.7%)	4 (6.6%)	45 (73.8%)	0.499
<i>KMT2D</i>	11 (19.6%)	4 (7.1%)	41 (73.2%)	0.447
<i>TP53</i>	6 (66.7%)	1 (11.1%)	2 (22.2%)	<0.001
<i>ATM</i>	1 (14.3%)	3 (42.9%)	3 (42.9%)	<0.001
<i>SF3B1</i>	1 (12.5%)	2 (25.0%)	5 (62.5%)	0.041
<i>MYD88</i>	1 (100.0%)	0 (0%)	12 (92.3%)	0.297
IGHV status mutation				<i>p-value</i>
	Mutated	Unmutated		
<i>ARID1A</i>	45 (75.0%)	15 (25.0%)	0.025	
<i>KMT2D</i>	40 (71.4%)	16 (28.6%)	0.602	
<i>TP53</i>	3 (33.3%)	6 (66.7%)	0.010	
<i>ATM</i>	4 (57.1%)	3 (42.9%)	0.434	
<i>SF3B1</i>	5 (62.5%)	3 (37.5%)	0.623	
<i>MYD88</i>	12 (92.3%)	1 (7.7%)	0.052	
del17p	6 (46.2%)	7 (53.8%)	0.044	
del11q	2 (40.0%)	3 (60.0%)	0.137	

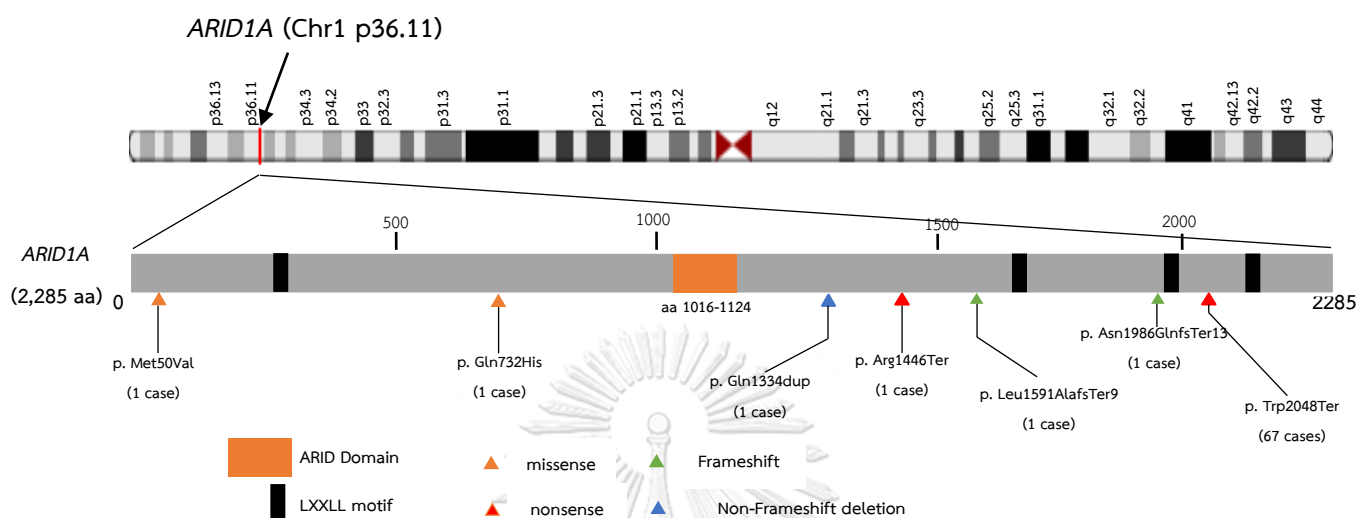
บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการศึกษานี้เป็นการรายงานลักษณะทางคลินิกและลักษณะทางพันธุกรรมของผู้ป่วยชาวไทยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรค CLL พบว่าอายุเฉลี่ยของผู้ป่วย CLL ชาวไทย ณ เวลาที่ได้รับการวินิจฉัยของการศึกษานี้ คือ 66 ปี ซึ่งน้อยกว่าอายุเฉลี่ยของ 70 ปีผู้ป่วย CLL ชาวตะวันตก [8] แต่อยู่ในช่วงอายุเฉลี่ย 63-66 ปี เมื่อเปรียบเทียบกับอายุ ณ เวลาที่ได้รับการวินิจฉัยจากการศึกษาในผู้ป่วยชาวเอเชีย [14, 17, 50] อายุเฉลี่ยที่ต่ำกว่าอาจจะบ่งชี้ได้ว่าเกิดจากลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกัน [5] นอกจากนี้ผู้ป่วยชาวไทยมีอัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิงประมาณ 2.1:1 ซึ่งใกล้เคียงการศึกษาก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยชาวไทย เอเชีย และตะวันตกที่มีอัตราส่วน 2:1 [5, 14, 18] อาการที่พบบ่อยในผู้ป่วยไทย คือ ต่อม้ำเหลืองโต (Lymphadenopathy) รองลงมาคือ ม้ามโต เป็นลักษณะอาการที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรค CLL ชาวไทย เอเชีย และตะวันตก [6, 14, 26] จากการศึกษาครั้งนี้ ความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วยชาวไทยเทียบกับผู้ป่วยชาวเอเชีย และตะวันตก พบ del11q ที่มีความคล้ายคลึงกัน แต่ผู้ป่วยชาวเอเชียจะพบน้อยกว่าผู้ป่วยชาวตะวันตก [9, 38] ในขณะที่พบ del17p ในผู้ป่วยชาวไทยสูงกว่าทั้งสองเชื้อชาติ นอกจากนี้ สถานะการกลายพันธุ์ของ *IGHV* ในผู้ป่วยโรค CLL ชาวไทยพบแบบ *IGHV-M* สูงกว่า *IGHV-UM* ซึ่งเหมือนกับการศึกษาในผู้ป่วยชาวไต้หวัน และผู้ป่วยในชาวเอเชียประเทศอื่น [5, 38] ในทางตรงกันข้ามผู้ป่วยโรค CLL ชาวตะวันตกพบ *IGHV-UM* มากกว่าหรือพบในสัดส่วนใกล้เคียงกับ *IGHV-M* [5, 37, 38] และการกลายพันธุ์ของยีน *ARID1A* พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยชาวไทย และพบการกลายพันธุ์ของ *ATM* น้อยที่สุด แต่ในผู้ป่วยชาวตะวันตกพบ *TP53* มากที่สุด ในขณะที่ผู้ป่วยชาวเอเชียพบ *MYD88* มากที่สุด นอกจากนี้ผู้ป่วยชาวไทยมีการกลายพันธุ์ของยีน *MYD88* ใกล้เคียงกับผู้ป่วยชาวเอเชีย โดยพบบ่อยกว่าในผู้ป่วยชาวตะวันตก และพบการกลายพันธุ์ของยีน *TP53* และ *SF3B1* น้อยกว่าในผู้ป่วยชาวยุโรปเช่นเดียวกับในผู้ป่วยชาวเอเชีย [17, 45, 46]

ยีน *ARID1A* หรือ AT-rich interaction domain 1A เป็นส่วนหนึ่งในการสร้างโปรตีนของ SWI/SNF family ซึ่งทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลของยีน ควบคุมกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครมาติน เพื่อให้ยีนมีการแสดงออกที่เหมาะสม ช่วยในการยับยั้งเนื้องอก (tumor suppressor) ควบคุมเซลล์ไม่ให้แบ่งตัวเร็วเกินไป การกลายพันธุ์ของยีน *ARID1A* ที่พบบ่อยที่สุดในการศึกษานี้เป็นแบบ nonsense อยู่บนโครโมโซม 1 ตำแหน่ง 27106533 เป็นการเปลี่ยนลำดับเบสตำแหน่งที่ 6144 จาก G เป็น A ส่งผลให้กรดอะมิโนตำแหน่ง 2048 เปลี่ยนจาก Tryptophan (Trp) เป็น Termination (Ter) หรือ Stop codon (รูปที่ 8) ซึ่งมีส่วนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ SWI/SNF ซึ่งอาจทำให้การควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ผิดปกติ และนำไปสู่การเกิดมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีการกลายพันธุ์ที่

ตำแหน่งอื่นๆ ด้วย ดังตารางที่ 12 และมีรายงานว่าพบการกลายพันธุ์ของยีน *ARID1A* ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งรังไข่ และเยื่อหุ้มสมองตลก เป็นต้น [51]



รูปที่ 8 การกลายพันธุ์ของยีน *ARID1A* บนโครโมโซม 1 p36.11

ตารางที่ 12 การกลายพันธุ์ของยีน *ARID1A* ที่พบในผู้ป่วยโรค CLL ชาวไทย

Locus	Type	Genotype Ref/ Alt	Coding	Amino acid change	Variant effect	Oncomine gene class	Oncomine variant class
chr1:27023042	SNV	A/G	c.148A>G	p. Met50Val	missense	-	-
chr1:27087909	SNV	G/C	c.2196G>C	p. Gln732His	missense	-	-
chr1:27100181	INDEL	CGCAGCAGCAGCAG CAGCAGCAGCA/CG CAGCAGCAGCAGCA GCAGCAGCAGCA	c.3999_4001 dup	p. Gln1334 dup	non frameshift Insertion	-	-
chr1:27101054	SNV	C/T	c.4336C>T	p. Arg1446Ter	nonsense	Loss of function	Truncating
chr1:27101484	INDEL	CTCCCCTGC/C	c.4767_4774 delTCCCCTGC	p. Leu1591AlafsTer9	Frameshift Deletion	Loss of function	Truncating
chr1:27106342	INDEL	T/TC	c.5955_5956 insC	p. Asn1986GlnfsTer13	Frameshift Insertion	Loss of function	Truncating
chr1:27106533	SNV	G/A	c.6144G>A	p. Trp2048Ter	nonsense	Loss of function	Truncating

ผู้ป่วยโรค CLL ชาวไทยมีผู้ป่วยกลุ่มสูงอายุมากกว่าผู้ป่วยอายุน้อย สอดคล้องกับการศึกษาในผู้ป่วยโรค CLL ประเทศตุรกี [6] ค่าฮีโมโกลบินในผู้ป่วยกลุ่มอายุน้อยกว่า 65 ปี มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าในผู้ป่วยกลุ่มอายุ 65 ปีขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 55 ปี และผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 55 ปี ของผู้ป่วยในสหรัฐอเมริกา [6, 13] และจากการแบ่งอายุผู้ป่วยที่ 65 ปี ตามการแบ่งเกณฑ์ผู้สูงอายุตามคำจำกัดความขององค์การอนามัยโลก (WHO) [15] ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของเซลล์, ความผิดปกติของโครโมโซม, สถานะการกลายพันธุ์ของ IGHV และการกลายพันธุ์ของอื่น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มอายุ

จากการศึกษาครั้งนี้ โรค CLL เป็นโรคที่พบน้อยในประเทศไทย และส่วนใหญ่มักพบในผู้สูงอายุเป็นหลักและมีอายุเฉลี่ย ณ เวลาที่วินิจฉัยน้อยกว่าผู้ป่วยโรค CLL ชาวตะวันตก ในการศึกษานี้ได้ศึกษาถึงลักษณะทางคลินิก และลักษณะทางพันธุกรรมของผู้ป่วยชาวไทยจากการรวบรวมข้อมูลของผู้ป่วยแบบ Multi-center ทำให้ทราบว่าลักษณะทางคลินิก และลักษณะทางพันธุกรรมของผู้ป่วยชาวไทยมีความคล้ายคลึงกับผู้ป่วยชาวเอเชียมากกว่าผู้ป่วยชาวตะวันตก ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเกิดจากความแตกต่างของพันธุกรรมมากกว่าความแตกต่างด้านสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม การศึกษายังมีข้อจำกัดอยู่ คือ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีขนาดเล็ก และระยะเวลาในการติดตามผลยังไม่ยาวนานพอที่จะวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตและการดำเนินของโรค โดยหวังว่าผลการศึกษาคั้งจะสามารถเป็นข้อมูลที่ช่วยให้เข้าใจลักษณะทางคลินิก และลักษณะทางพันธุกรรมของผู้ป่วยโรค CLL ในประเทศไทยมากขึ้น และนำไปสู่การรักษาผู้ป่วยชาวไทยได้ดีขึ้น



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Faguet, G.B., *Chronic lymphocytic leukemia : molecular genetics, biology, diagnosis, and management*. 2004.
2. National Cancer Institute. *Cancer stat facts: leukemia — chronic lymphocytic leukemia (CLL)*. SEER <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html> (2023).
3. Eichhorst, B., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2021. 32(1): p. 23-33.
4. Chihara, D., et al., *Differences in incidence and trends of haematological malignancies in Japan and the United States*. *Br J Haematol*, 2014. 164(4): p. 536-45.
5. Yang, S.M., et al., *The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology?* *Blood Rev*, 2015. 29(3): p. 205-13.
6. Eren, R., et al., *Comparison of clinical features and survival between young and old chronic lymphocytic leukemia patients: a single center study from Turkey*. *Leukemia & Lymphoma*, 2019. 60(3): p. 742-747.
7. Zhang, S. and T.J. Kipps, *The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia*. *Annu Rev Pathol*, 2014. 9: p. 103-18.
8. Yang, S., et al., *Ethnic and geographic diversity of chronic lymphocytic leukaemia*. *Leukemia*, 2021. 35(2): p. 433-439.
9. Döhner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2000. 343(26): p. 1910-6.
10. Hewamana, S. and C. Dearden, *Treatment options for high-risk chronic lymphocytic leukaemia*. *Ther Adv Hematol*, 2011. 2(3): p. 147-59.
11. Eichhorst, B. and M. Hallek, *Prognostication of chronic lymphocytic leukemia in the era of new agents*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016. 2016(1): p. 149-155.
12. Rai, K.R. and P. Jain, *Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now*. *Am J Hematol*, 2016. 91(3): p. 330-40.

13. Parikh, S.A., et al., *Chronic lymphocytic leukemia in young (\leq 55 years) patients: a comprehensive analysis of prognostic factors and outcomes*. *Haematologica*, 2014. 99(1): p. 140-7.
14. Sriphatphiriyakun, T. and C.U. Auewarakul, *Clinical presentation and outcome of Thai patients with chronic lymphocytic leukemia: Retrospective analysis of 184 cases*. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 2005. 23(4): p. 197-203.
15. *World Health Organization. Ageing and life course*. 2018 [cited 2 April 2022 Available from: https://www.who.int/health-topics/ageing#tab=tab_1.
16. Hus, I. and J. Roliński, *Current concepts in diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia*. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015. 19(5): p. 361-7.
17. Chan, T.S., et al., *Clinicopathological features and outcome of chronic lymphocytic leukaemia in Chinese patients*. *Oncotarget*, 2017. 8(15): p. 25455-25468.
18. Kipps, T.J., et al., *Chronic lymphocytic leukaemia*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. 3: p. 16096.
19. Jenny, W.Y.P., et al., *Incidence of Leukemia in Asian Migrants to the United States and Their Descendants*. *Cancer Causes & Control*, 2002. 13(9): p. 791-795.
20. Delgado, J., et al., *Chronic Lymphocytic Leukemia; Pathology and Genetics, in Reference Module in Biomedical Sciences*. 2017.
21. Jakšić, B., et al., *Guidelines for Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. Krohem B-CLL 2017. Acta Clin Croat*, 2018. 57(1): p. 190-215.
22. Hallek, M., et al., *iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL*. *Blood*, 2018. 131(25): p. 2745-2760.
23. Delgado, J., et al., *Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies*. *Haematologica*, 2020. 105(9): p. 2205-2217.
24. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 1975. 46(2): p. 219-234.
25. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. *Cancer*, 1981. 48(1): p. 198-206.

26. Hallek, M., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines*. Blood, 2008. 111(12): p. 5446-5456.
27. Swerdlow, S.H., et al., *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. Blood, 2016. 127(20): p. 2375-90.
28. Hallek, M., *Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment*. Am J Hematol, 2019. 94(11): p. 1266-1287.
29. Salem, D.A. and M. Stetler-Stevenson, *Clinical Flow-Cytometric Testing in Chronic Lymphocytic Leukemia*, in *Immunophenotyping: Methods and Protocols*, J.J.P. McCoy, Editor. 2019, Springer New York: New York, NY. p. 311-321.
30. Rawstron, A.C., et al., *Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project*. Cytometry B Clin Cytom, 2018. 94(1): p. 121-128.
31. Roth, C., *Educational Case: Chronic Lymphocytic Leukemia*. Academic Pathology, 2018. 5: p. 237428951877601.
32. Davi, F., et al., *Immunoglobulin gene analysis in chronic lymphocytic leukemia in the era of next generation sequencing*. Leukemia, 2020. 34(10): p. 2545-2551.
33. Quijada-Alamo, M., et al., *Next-generation sequencing and FISH studies reveal the appearance of gene mutations and chromosomal abnormalities in hematopoietic progenitors in chronic lymphocytic leukemia*. J Hematol Oncol, 2017. 10(1): p. 83.
34. Hengeveld, P.J., et al., *Reading the B-cell receptor immunome in chronic lymphocytic leukemia: revelations and applications*. Exp Hematol, 2021. 93: p. 14-24.
35. Briney, B., et al., *Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire*. Nature, 2019. 566(7744): p. 393-397.
36. Parikh, S.A., et al., *Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis*. Blood, 2016. 127(14): p. 1752-60.

37. Marinelli, M., et al., *Immunoglobulin gene rearrangements in Chinese and Italian patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Oncotarget*, 2016. 7(15): p. 20520-31.
38. Huang, Y.J., et al., *Distinct immunoglobulin heavy chain variable region gene repertoire and lower frequency of del(11q) in Taiwanese patients with chronic lymphocytic leukaemia*. *Br J Haematol*, 2019. 187(1): p. 82-92.
39. Vasconcelos, Y., et al., *Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. *J Clin Oncol*, 2003. 21(21): p. 3928-32.
40. Rodríguez Vicente, A., et al., *Next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: Recent findings and new horizons*. *Oncotarget*, 2015. 8.
41. Parikh, S.A., N.E. Kay, and T.D. Shanafelt, *How we treat Richter syndrome*. *Blood*, 2014. 123(11): p. 1647-57.
42. Lanasa, M.C., *Novel Insights into the Biology of CLL*. *Hematology*, 2010. 2010(1): p. 70-76.
43. Campo, E., et al., *TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics*. *Haematologica*, 2018. 103(12): p. 1956-1968.
44. Bosch, F. and R. Dalla-Favera, *Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019. 16(11): p. 684-701.
45. Landau, D.A. and C.J. Wu, *Chronic lymphocytic leukemia: molecular heterogeneity revealed by high-throughput genomics*. *Genome Medicine*, 2013. 5(5): p. 47.
46. Wang, L., et al., *SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia*. *N Engl J Med*, 2011. 365(26): p. 2497-506.
47. Scarfò, L., A.J. Ferreri, and P. Ghia, *Chronic lymphocytic leukaemia*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016. 104: p. 169-82.
48. Kumar, V., et al., *Immunoserological and molecular techniques used in fish disease diagnosis-A mini review*. 2014. 1: p. 111-117.
49. *Thermo Fisher Scientific. Qubit 4 Fluorometer*. [cited 22 April 2022; Available from: <https://www.thermofisher.com/th/en/home/industrial/spectroscopy-elemental->

[isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/models/qubit-4.html#features.](#)

50. Tomomatsu, J., et al., *Chronic lymphocytic leukemia in a Japanese population: varied immunophenotypic profile, distinctive usage of frequently mutated IGH gene, and indolent clinical behavior.* *Leuk Lymphoma*, 2010. 51(12): p. 2230-9.
51. Bethesda. *ARID1A gene.* 2021 August 30, 2021 [cited July 8, 2023; Available from: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/arid1a/>].





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศิริโรจน์ ขอบบัวคลี่
วัน เดือน ปี เกิด	15 เมษายน 2537
สถานที่เกิด	สมุทรปราการ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY