



การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย
และรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา

THE EXPRESSION OF FTO AND ALKBH5 IN ORAL EPITHELIAL DYSPLASIA AND
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

พิชามญช์ ศรีวิริยกุล

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย
และรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

THE EXPRESSION OF FTO AND ALKBH5 IN ORAL EPITHELIAL DYSPLASIA AND
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Oral and Maxillofacial Sciences)

Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย
และรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา

ของ

พิชามญช์ ศรีวิริยกุล

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทธยา เต๋อบรรพกุล)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรมาภรณ์ กลั่นฤทธิ์)
..... ที่ปรึกษาร่วม	 กรรมการ
(อาจารย์ ดร.รัชพันธุ์ อุดมพัฒน์นกร)	(รองศาสตราจารย์ ดร.อรุณวรรณ หล้าอุบล)

ชื่อเรื่อง	การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา
ผู้วิจัย	พิชามญช์ ศรีวิริกุล
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรายุ แด่บรรพกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. ชัชพันธุ์ อุดมพัฒนาก

FTO และ ALKBH5 มีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการเมทิลเลชันของอาร์เอ็นเอ โดยมีรายงานเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเกิดมะเร็งหลากหลายชนิด แต่ยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคก่อนมะเร็ง และรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา วัตถุประสงค์ของการศึกษา เพื่อศึกษาการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียและมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดยนำชิ้นเนื้อกลุ่มละ 20 ตัวอย่าง มาแยกด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี และศึกษารูปแบบการติดสี จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 รวมทั้งความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test และ Pearson correlation coefficient ผลการศึกษาพบการติดสีของ FTO และ ALKBH5 ในเนื้อเยื่อปกติเพียงร้อยละ 60 และร้อยละ 50 ตามลำดับ ในขณะที่ในชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียและชิ้นเนื้อมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา พบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในทุกชิ้นเนื้อ ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียส่วนใหญ่พบการติดสีระดับปานกลาง โดยพบการติดสีในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิว มีความเข้มและความหนาแน่นเพิ่มขึ้นในชั้นเบซัลเซลล์ แต่ติดสีจางลงในชั้นสไปนัส ในมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาพบการติดสีมากที่สุดและเข้มมากที่สุดในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติ ส่วนในเนื้อเยื่อปกติพบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ที่ความเข้มของการติดสีจางและติดสีเฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิว สำหรับร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียและชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามลำดับ ($p < 0.0001$) นอกจากนั้นในกลุ่มชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมายังพบว่าการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง ($R = 0.6204$, $p = 0.0035$) จากการศึกษาสรุปว่าพบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียและมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมามากกว่าเนื้อเยื่อปกติ อาจเป็นไปได้ว่า FTO และ ALKBH5 มีบทบาทในรอยโรคก่อนมะเร็งและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา อย่างไรก็ตามกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ FTO และ ALKBH5 ในการเกิดมะเร็ง ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ : FTO, ALKBH5, อีพิทีเลียลดิสเพลเซีย, มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา

Title	THE EXPRESSION OF FTO AND ALKBH5 IN ORAL EPITHELIAL DYSPLASIA AND ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA
Author	PICHAMON SRIVIRIYAKUL
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Assistant Professor Dr. Patrayu Taebunpakul
Co Advisor	Dr. Chatchaphan Udompatanakorn

Fat mass and obesity-associated protein (FTO) and α -ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB homolog 5 (ALKBH5) have a role in RNA methylation. They have been reported to promote tumor growth in various cancers. However, the roles of FTO and ALKBH5 in oral potentially malignant disorders (OPMD) and oral squamous cell carcinoma (OSCC) remain unclear. This study aims to investigate the expressions of FTO and ALKBH5 in oral epithelial dysplasia (OED) and OSCC compared to normal oral mucosa. There were 20 specimens of OED, OSCC and normal oral mucosa, stained by the immunohistochemistry technique. The pattern, number of positive cells, staining intensity, histochemical scoring (H-score), and correlation of FTO and ALKBH5 expression were investigated. The data were statistically analyzed using the Kruskal-Wallis test and Pearson correlation coefficient. This study showed that the expressions of FTO and ALKBH5 were found in some specimens of normal oral mucosa at 60% and 50% respectively. Despite the presence of OED and OSCC, expressions of FTO and ALKBH5 were found in all specimens. Most of OED specimens showed moderate staining intensity. It was observed as nuclear staining in the epithelial cells. The intensity and density of staining increased in the basal cell layer but decreased in the spinous layer. However, OSCC showed the strongest staining intensity in the nuclei of abnormal epithelial cells. In normal oral mucosa, FTO and ALKBH5 expressions were low intensity and presented only in the nuclei of epithelial cells. The percentage of cell positivity, staining intensity, and H-score of FTO and ALKBH5 in normal oral mucosa, OED, and OSCC increased respectively ($p < 0.0001$). In OSCC, there was a strong correlation between FTO and ALKBH5 expressions ($R = 0.6204$, $p = 0.0035$). In conclusion, these results indicated the expressions of FTO and ALKBH5 in OED and OSCC were higher than normal oral mucosa, suggesting the possible role of FTO and ALKBH5 in malignant transformation of OED and tumor progression. However, further studies are needed to confirm these results to elucidate the mechanisms underlying the roles of FTO and ALKBH5 in carcinogenesis.

Keyword : FTO, ALKBH5, Oral epithelial dysplasia, Oral squamous cell carcinoma

กิตติกรรมประกาศ

งานปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ทางผู้จัดทำปริญญานิพนธ์ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ทพญ.ภัทราญ แต่บรรพกุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ อ.ดร.ทพ. ชัชพันธุ์ อุดมพัฒนากร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความอนุเคราะห์ ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือและสั่งสอนหลักการคิดอย่างเป็นระบบในการทำปริญญานิพนธ์ ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา ถ่ายทอดความรู้ขั้นตอนการยอมด้วยวิธีทางอิมมูฮิสโตเคมีอย่างละเอียด ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขและเป็นที่กำลังใจสนับสนุนให้ข้าพเจ้าทำปริญญานิพนธ์นี้ได้จนสำเร็จสมบูรณ์ รวมทั้งขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปาก และเวชศาสตร์ช่องปากทุกท่านที่ให้ความรู้และคำปรึกษาในด้านต่าง ๆ แก่ข้าพเจ้า อีกทั้งขอขอบพระคุณ นางสาวอุตมาพร บุญทรง (พี่พร) ผู้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และการสืบค้นข้อมูลย้อนหลังจากใบส่งตรวจชิ้นเนื้อ รวมทั้งขอขอบคุณนางสาววรวิศา อัสภัทรพันธุ์ และเพื่อนร่วมชั้นปีทุกคนที่ให้คำแนะนำและเป็นที่กำลังใจที่ดีเสมอมา สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยสนับสนุนและเป็นที่กำลังใจให้ข้าพเจ้าทั้งในการเรียนและการทำปริญญานิพนธ์มาโดยตลอด

พิชามณู ศิริวิญกุล

สารบัญ

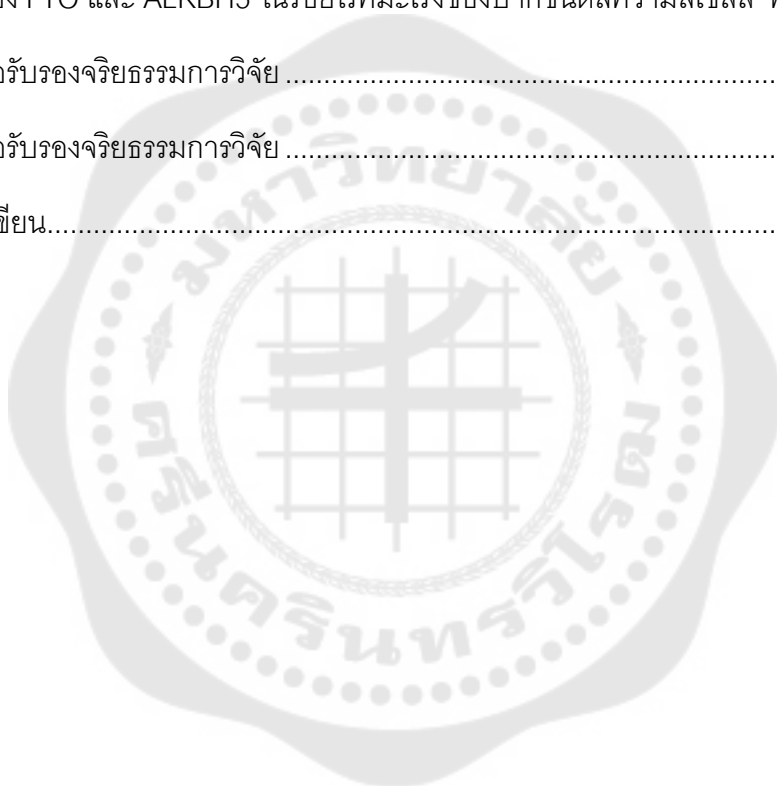
หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประชากรที่ใช้ในการวิจัย.....	4
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ตัวแปรที่ศึกษา	4
กรอบแนวคิดในงานวิจัย	4
สมมติฐานในงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา	6
1.1 สาเหตุของการเกิดโรคหรือปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา	6
1.2 ลักษณะทางคลินิกของมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา	7
1.3 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา	7

1.4 พยาธิกำเนิด การรักษา และพยากรณ์โรคของมะเร็งช่องปากชนิดความผิดปกติของโครโมโซม	8
2. ความผิดปกติของมะเร็งช่องปาก	8
2.1 อีพิทิลีอิมัลติสเปเซียของเยื่อเมือกช่องปาก	8
3. พยาธิกำเนิดของรอยโรคในช่องปาก	9
3.1 การกลายพันธุ์ระดับพันธุกรรม (genetic mutation)	9
3.2 การกลายพันธุ์ระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetic mutation)	10
4. กระบวนการเมทิลเลชันในอาร์เอ็นเอ (RNA methylation)	13
5. กระบวนการดัดแปลง m6A ในมะเร็ง	15
5.1 บทบาทของ FTO และ ALKBH5 ในมะเร็งชนิดต่าง ๆ	16
5.2 บทบาทของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทิลีอิมัลติสเปเซีย และมะเร็งช่องปากชนิดความผิดปกติของโครโมโซม	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	30
1. การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง	30
การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง	30
ประชากรที่ใช้ในการศึกษา	30
2. วิธีการทดลอง	31
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	32
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	32
ขั้นตอนการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี	33
3. การเก็บรวบรวมข้อมูล	36
วิธีเก็บข้อมูล	36
การแปลผล	36
4. การวิเคราะห์ข้อมูล	37

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	37
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	40
ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ศึกษา	40
การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5	42
การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในเนื้อเยื่อไต	42
การแสดงออกของ FTO ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ รอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียและรอยโรคมะเร็ง ช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา	44
การแสดงออกของ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ รอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และรอย โรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา	45
ร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮีสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5	48
ร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5	48
ความเข้มของการย้อมติดสี FTO และ ALKBH5	48
คะแนนฮีสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5	49
การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อยและรอยโรค อีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรง	52
ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5	54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และขอเสนอแนะ	56
สรุปผลการวิจัย	56
อภิปรายผลการวิจัย	57
ขอเสนอแนะ	64
บรรณานุกรม	65
ภาคผนวก	73
การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง	74

การปรับมาตรฐานการประเมินผล	75
ตารางผลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮีสโตเคมี ของ FTO และ ALKBH5 ในเนื้อเยื่อปกติ.....	80
ตารางผลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮีสโตเคมี ของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย.....	81
ตารางผลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮีสโตเคมี ของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา	82
หนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัย	83
หนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัย	84
ประวัติผู้เขียน.....	85



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 บทบาทของ FTO ในมะเร็ง	17
ตาราง 2 บทบาทของ ALKBH5 ในมะเร็ง	22
ตาราง 3 บทบาทของ FTO และ ALKBH5 ในมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา	29
ตาราง 4 ข้อมูลทั่วไปของประชากรที่ศึกษา	41
ตาราง 5 ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนน ฮีสโตเคมีของ FTO ในแต่ละกลุ่มประชากร	50
ตาราง 6 ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนน ฮีสโตเคมีของ ALKBH5 ในแต่ละกลุ่มประชากร	51
ตาราง 7 การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย	53
ตาราง 8 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในแต่ละกลุ่มประชากร	55

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการศึกษา	4
ภาพประกอบ 2 กระบวนการเมทิลเลชันของ m6A.....	14
ภาพประกอบ 3 ลักษณะการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในเนื้อเยื่อไต.....	43
ภาพประกอบ 4 ลักษณะการแสดงออกของ FTO ในชั้นเนื้อเยื่อปกติ ชั้นเนื้อเยื่อที่เสียหายและชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา	45
ภาพประกอบ 5 ลักษณะการแสดงออกของ ALKBH5 ในชั้นเนื้อเยื่อปกติ ชั้นเนื้อเยื่อที่เสียหายและชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา.....	47



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

มะเร็งช่องปากเป็นมะเร็งที่สามารถพบได้บ่อยเป็นอันดับที่ 6 ของมะเร็งทั่วโลก⁽¹⁾ ส่วนในประเทศไทยจากการเก็บข้อมูลของสถาบันมะเร็งแห่งชาติในปี พ.ศ. 2562 พบว่ามะเร็งในช่องปากพบได้บ่อยเป็นอันดับที่ 5 ในเพศชายและอันดับที่ 9 ในเพศหญิง⁽²⁾ โดยร้อยละ 90 – 95 ของมะเร็งช่องปากที่พบจะเป็นชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา (oral squamous cell carcinoma; OSCC)^(3, 4) ซึ่งในทั่วโลกมีรายงานผู้ป่วยมะเร็งช่องปากรายใหม่มากกว่า 300,000 รายต่อปี⁽¹⁾ ลักษณะทางคลินิกของรอยโรคมีความหลากหลาย เช่น เป็นก้อน เป็นแผล (ulcerated lesion) รอยโรคสีแดง รอยโรคสีขาว เป็นต้น⁽⁵⁾ ตำแหน่งที่มักพบได้บ่อยคือ ลิ้น พื้นช่องปาก เหงือกและกระพุ้งแก้ม⁽⁴⁾ ปัจจัยเสี่ยงที่อาจทำให้เกิดมะเร็งช่องปาก ได้แก่ การสูบบุหรี่ การดื่มสุรา การใช้บุหรี่ไร้วัน การเคี้ยวหมากหรือยาเส้น การติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) ชนิด 16 และ 18^(4, 6, 7) และความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในช่องปาก (oral microbiota dysbiosis)^(8, 9) เป็นต้น โดยมีรอยโรคบางชนิดที่มีความเสี่ยงในการเปลี่ยนไปเป็นมะเร็งช่องปากได้ เช่น ลิวโคเพลเคีย (leukoplakia) ซึ่งแสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้ตั้งแต่การเจริญผิดปกติเล็กน้อยของเยื่อบุผิว (mild epithelial dysplasia) ไปจนถึงมะเร็งไม่แพร่กระจาย (carcinoma in situ)^(4, 10) มีรายงานว่า การเจริญผิดปกติปานกลางจนถึงมากของเยื่อบุผิว (moderate to severe epithelial dysplasia) มีอัตราการเปลี่ยนไปเป็นมะเร็งได้ถึงร้อยละ 12⁽⁴⁾ ในปัจจุบันวิธีการรักษาที่เป็นมาตรฐานสำหรับมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา ได้แก่ การผ่าตัดซึ่งอาจทำร่วมกับการใช้รังสีรักษา และการให้ยาเคมีบำบัด⁽¹¹⁾ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิต 5 ปี (five-year survival rate) ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐานอยู่ที่ประมาณร้อยละ 50 เท่านั้นและไม่เพิ่มขึ้นเลยตลอดช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมา^(11, 12)

ในปัจจุบันเชื่อว่าพยาธิกำเนิดของความผิดปกติเสี่ยงมะเร็งช่องปาก (oral potentially malignant disorder; OPMD) และมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา อาจเกิดได้จากการกลายพันธุ์ (mutation) ของลำดับเบสบนสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (DNA) ส่งผลให้การแสดงออกของยีน (gene) มีความผิดปกติไป หรืออาจเกิดจากการกลายพันธุ์ระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetic mutation) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนโดยที่ไม่มี

การเปลี่ยนแปลงลำดับของเบสบนสารพันธุกรรม โดยกระบวนการนี้ในมนุษย์สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายระดับ ได้แก่ กระบวนการเมทิลเลชัน (การเติมหมู่เมทิลหรือการดึงหมู่เมทิลออก) ในดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ (RNA) และกระบวนการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน (histone modification)⁽¹³⁾ โดย N⁶-methyladenosine (m6A) RNA methylation คือกระบวนการเติมหมู่เมทิลเข้าไปที่ไนโตรเจนลำดับที่ 6 ของเบสอะดีโนซีนในอาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นกระบวนการที่ผันกลับได้และถือเป็นกระบวนการดัดแปลงเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (messenger RNA, mRNA) ที่มีความสำคัญในเซลล์ยูคาริโอต⁽¹⁴⁾ โดยปกติกระบวนการนี้มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของ mRNA ได้แก่ กระบวนการตัดต่อ (splicing) การคงอยู่ (stability) การเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน (translational initiation) การขนส่ง (transportation) เป็นต้น^(15, 16)

มีการศึกษาพบว่ากระบวนการเมทิลเลชันของ m6A และกลุ่มเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการนี้มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว (acute myeloid leukemia)⁽¹⁷⁾ มะเร็งเต้านม⁽¹⁸⁾ และมะเร็งกระเพาะอาหาร⁽¹⁹⁾ เป็นต้น โดยมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของเอนไซม์ในกลุ่ม m6A erasers ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ RNA demethylase ได้แก่ fat mass and obesity-associated protein (FTO) และ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase ALKB homolog 5 (ALKBH5) มีความสัมพันธ์กับมะเร็งชนิดต่าง ๆ โดยส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อกระบวนการตายและรอดชีวิตของเซลล์ (apoptosis and cell survival) การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและการพยากรณ์ของโรค⁽²⁰⁾ มีหลายการศึกษาที่รายงานบทบาทของ FTO ในการก่อให้เกิดมะเร็ง (oncogenic roles) โดยพบการแสดงออกของ FTO เพิ่มขึ้นในมะเร็ง ได้แก่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว⁽²¹⁾ มะเร็งเต้านม⁽²²⁾ และมะเร็งสมองชนิดไกลิโอเบลาสโตมา (Glioblastoma)⁽²³⁾ ในส่วนของ ALKBH5 มีการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ ALKBH5 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งได้เช่นกัน เช่น มะเร็งเต้านม⁽²⁴⁾ มะเร็งสมองชนิดไกลิโอเบลาสโตมา⁽²⁵⁾ และมะเร็งกระเพาะอาหาร⁽²⁶⁾

อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ FTO ในมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมายังมีอยู่ไม่มาก มีเพียงการศึกษาของ Wang และคณะ ในปี 2021 ซึ่งพบว่าระดับการแสดงออกของยีนและโปรตีน FTO เพิ่มขึ้นในตัวอย่างชิ้นเนื้ออวัยวะเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย FTO ส่งเสริมให้การแสดงออกของยีนและโปรตีน eIF4G1 (eukaryotic translation initiation factor gamma 1) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้กระบวนการเซลล์กลืนกินตัวเอง (autophagy) ลดลง และส่งเสริมการเพิ่มจำนวน (proliferation) การเคลื่อนย้าย (migration) และการลุกลาม (invasion) ของเซลล์มะเร็ง⁽²⁷⁾ ส่วนการศึกษา

การแสดงออกของ ALKBH5 ในมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนม่านั้นมีเพียงการศึกษาของ Shriwas และคณะ ในปี 2020 พบระดับการแสดงออกของโปรตีน ALKBH5 เพิ่มขึ้นในตัวอย่างชิ้นเนื้อรอยโรคที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัดเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อรอยโรคที่ยังไม่รับยาเคมีบำบัด โดย ALKBH5 จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน *Forkhead box M1 (FOXM1)* และ *NANOG* ทำให้การแสดงออกของโปรตีน FOXM1 และ NANOG เพิ่มขึ้น ส่งเสริมให้มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมามีดื้อต่อยาเคมีบำบัด แต่ไม่มีการศึกษาในรอยโรสดังกล่าวเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ⁽²⁸⁾ นอกจากนั้นบทบาทหน้าที่และการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคก่อนมะเร็ง เช่น รอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย (oral epithelial dysplasia) ยังไม่มีการศึกษาวิจัยมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคก่อนมะเร็งและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา ด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อเพิ่มความเข้าใจถึงบทบาทของ FTO และ ALKBH5 ในพยาธิกำเนิดของรอยโรค OSCC ตั้งแต่ระยะเริ่มต้น ซึ่งอาจนำไปสู่การสร้างตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ชนิดใหม่ในรอยโรคชนิดนี้ โดยจะทำการศึกษาถึงรูปแบบและการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียและมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อเยื่อปกติที่ไม่มีการอักเสบ

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคก่อนมะเร็งในช่องปาก (รอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย) มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา และเนื้อเยื่อปกติ

ความสำคัญของการวิจัย

ผลที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงบทบาทของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคก่อนมะเร็งในช่องปากและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา ซึ่งอาจนำไปสู่การสร้างตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดใหม่ในรอยโรคชนิดนี้ เพื่อใช้ประเมินความเสี่ยงและการพยากรณ์ของโรคในผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก หรืออาจนำไปสู่การค้นพบเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา (target of drug action) เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งในช่องปากได้ในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 20 ตัวอย่าง ได้แก่ ขึ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซีย ขึ้นเนื้อมะเร็งชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา และขึ้นเนื้อเยื่อปกติซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม

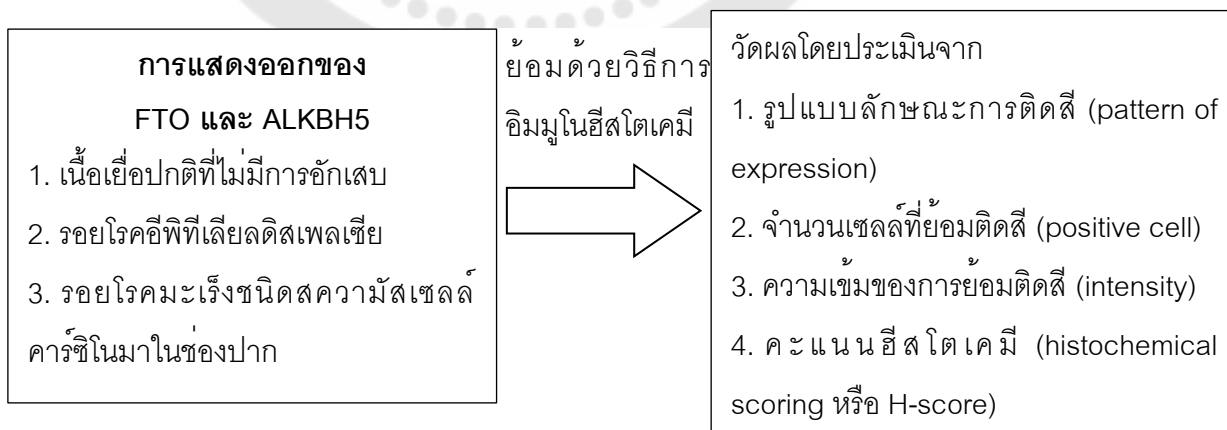
กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

1. ขึ้นเนื้อกลุ่มศึกษา
 - 1.1 ขึ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซีย
 - 1.2 ขึ้นเนื้อมะเร็งชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา
2. กลุ่มควบคุม ขึ้นเนื้อเยื่อปกติ

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ แบ่งเป็นดังนี้
 - 1.1 ขึ้นเนื้อกลุ่มศึกษา
 - 1.1.1 ขึ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซีย
 - 1.1.2 ขึ้นเนื้อมะเร็งชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา
 - 1.2 กลุ่มควบคุมที่เป็นขึ้นเนื้อเยื่อปกติ
2. ตัวแปรตาม ได้แก่ การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5

กรอบแนวคิดในงานวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการศึกษา

สมมติฐานในงานวิจัย

1. การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 จะมีความแตกต่างกันในกลุ่มเนื้อเยื่อปกติ กลุ่มรอยโรคอีพิทีเลียลดีสเพลเซีย และกลุ่มมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา
2. จำนวนเซลล์ ความเข้มของสีย้อมติดเซลล์ และคะแนนฮีสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 จะมีความแตกต่างกันในกลุ่มเนื้อเยื่อปกติ กลุ่มรอยโรคอีพิทีเลียลดีสเพลเซีย และกลุ่มมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา
2. ความผิดปกติเสี่ยงมะเร็งช่องปาก
3. พยาธิกำเนิดของรอยโรคมะเร็งในช่องปาก (pathogenesis)
4. กระบวนการเมทิลเลชันในอาร์เอ็นเอ
5. กระบวนการดัดแปลง m6A (m6A modification) ในมะเร็ง

1. มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา

มะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาคือมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผิวมีความผิดปกติ ซึ่งพบได้บ่อยที่สุดในบรรดามะเร็งในช่องปาก โดยคิดเป็นร้อยละ 90 - 95 ของมะเร็งที่พบในช่องปากทั้งหมด^(1, 4) พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง 1.9 ถึง 2 เท่า⁽³⁾ ในประชากรทั่วโลกพบรายงานจำนวนผู้ป่วยมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมามากกว่า 300,000 คนต่อปี⁽¹⁾ หรือคิดเป็นร้อยละ 5 ของมะเร็งทั้งหมดที่พบในเพศชาย และร้อยละ 2 ของมะเร็งทั้งหมดที่พบในเพศหญิง ส่วนมากพบในผู้ป่วยอายุ 50-70 ปี แต่ก็พบในคนที่อายุน้อยได้เช่นกัน⁽²⁹⁾

1.1 สาเหตุของการเกิดโรคหรือปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา

ได้แก่ 1) การสูบบุหรี่ โดยพบว่าในผู้ที่สูบบุหรี่จะมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาบริเวณศีรษะและลำคอ (squamous cell carcinoma of the head and neck) มากกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ถึง 10 เท่า ซึ่งความเสี่ยงนี้จะเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณบุหรี่ที่สูบ และความเสี่ยงจะลดลงเมื่อเลิกบุหรี่⁽⁷⁾ 2) การดื่มแอลกอฮอล์ โดยผู้ที่สูบบุหรี่อย่างเดียวมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาบริเวณศีรษะและลำคอเพิ่มขึ้นร้อยละ 1 - 4 ส่วนผู้ที่ทั้งสูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์จะยิ่งเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมามากขึ้นถึง 2 เท่าของผู้ที่ไม่เคยสูบบุหรี่⁽³⁰⁾ 3) การใช้น้ำหรือไวรัสนี้ 4) การเคี้ยวหมากหรือยาเส้น 5) การติดเชื้อ HPV โดยเฉพาะเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16 และ 18⁽²⁹⁾ และ 6) ความไม่สมดุล

ของจุลินทรีย์ในช่องปาก โดยพบว่าในน้ำลายและพื้นผิวรอยโรคของผู้ป่วยมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ในช่องปากมากกว่าในคนปกติ โดยเฉพาะเชื้อที่ก่อโรคปริทันต์ เช่น *Fusobacterium nucleatum* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น^(8, 31) ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบ การเมตาบอลิซึมของสารก่อมะเร็งและผลต่อการอักเสบ (metabolism of carcinogens and inflammatory effects) และอาจเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์เป็นมะเร็ง⁽⁹⁾

1.2 ลักษณะทางคลินิกของมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา

รอยโรคมีลักษณะทางคลินิกค่อนข้างหลากหลาย ได้แก่ รอยโรคแบบมีการยกนูน (exophytic lesion) รอยโรคแบบมีการยุบตัว (endophytic lesion) รอยโรคลิ้นโคเพลเคีย รอยโรคอีริโทรเพลเคีย (erythroplakia) หรือรอยโรคอีริโทรลิ้นโคเพลเคีย (erythroleukoplakia) ตำแหน่งในช่องปากที่มักพบรอยโรคมะเร็งสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา ได้แก่ กระพุ้งแก้ม เหงือก เพดานปาก ลิ้นและพื้นช่องปาก ถ้าเป็นรอยโรคขนาดเล็กผู้ป่วยอาจยังไม่มีอาการ เมื่อรอยโรคมีขนาดใหญ่ขึ้น จะมีอาการทางคลินิกชัดเจน เช่น เจ็บ เคี้ยวอาหารลำบาก กลืนลำบาก ลิ้นขยับได้น้อยลง เป็นต้น และในรอยโรคระยะท้าย ๆ จะมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะต่าง ๆ ได้⁽⁶⁾

1.3 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา

พบกลุ่มของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติ เช่น อัตราส่วนของนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมเพิ่มขึ้นกว่าปกติ นิวเคลียสในเซลล์ย้อมติดสีเข้ม พบการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติ เป็นต้น โดยกลุ่มของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติเหล่านี้จะลุกลามลงไปที่ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันข้างใต้แสดงลักษณะของมะเร็งชนิดร้ายแรง (malignant) ซึ่งสามารถแบ่งตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้เป็น⁽⁶⁾

1. Well differentiated squamous cell carcinoma ลักษณะของเซลล์เนื้องอกมีลักษณะใกล้เคียงกับสควamousเซลล์และมีการสร้างเคอราตินมาก อาจเห็นเป็นลักษณะของก้อนเคอราติน (keratin pearl) ได้

2. Moderately differentiated squamous cell carcinoma เซลล์เนื้องอกจะเริ่มแสดงความหลากหลายของเซลล์และนิวเคลียสเพิ่มมากขึ้น พบการแบ่งตัวของเซลล์ที่ผิดปกติมากขึ้น เริ่มมีการสร้างเคอราตินที่น้อยลง

3. Poorly differentiated squamous cell carcinoma เซลล์เนื้องอกมีรูปร่างที่แตกต่างจากสควamousเซลล์ปกติจนแยกไม่ออกกว่าเซลล์ต้นกำเนิดคืออะไร เซลล์แสดงความผิดปกติในทุกด้านอย่างชัดเจน และไม่พบการสร้างเคอราติน

โดยทั่วไปมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มักจะพบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเป็นแบบ Well หรือ Moderately differentiated squamous cell carcinoma⁽²⁹⁾

1.4 พยาธิกำเนิด การรักษา และพยากรณ์โรคของมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา

ปัจจุบันเชื่อว่าพยาธิกำเนิดของมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา อาจเกิดได้จากการกลายพันธุ์ของลำดับเบสบนสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ ส่งผลให้การแสดงออกของยีนมีความผิดปกติไป เช่น การกลายพันธุ์ของยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) ชนิด *tumor protein 53 (TP53)* และ *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)*^(32, 33) หรือการกลายพันธุ์ของยีนกำเนิดมะเร็ง (proto-oncogenes) ชนิด *neuroblastoma ras viral oncogene homolog (NRAS)* และ *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha (PIK3CA)* ซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติในการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์จนนำไปสู่การเกิดมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา⁽³⁴⁾ หรืออาจเกิดจากการกลายพันธุ์ระดับเหนือพันธุกรรม⁽¹³⁾ วิธีการรักษาที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบันสำหรับมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา ได้แก่ การผ่าตัดซึ่งอาจทำร่วมกับการใช้รังสีรักษา และการให้ยาเคมีบำบัด⁽¹¹⁾ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิต 5 ปีของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีมาตรฐานอยู่ที่ประมาณร้อยละ 50^(11, 12)

2. ความผิดปกติเสี่ยงมะเร็งช่องปาก

ความผิดปกติเสี่ยงมะเร็งช่องปาก คือกลุ่มรอยโรคที่มีโอกาสเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งช่องปาก โดยรวมทั้งรอยโรคก่อนมะเร็งช่องปาก (oral precancerous lesion) ซึ่งเป็นรอยโรคบริเวณเนื้อเยื่ออ่อนในช่องปากที่มีผลทำให้เยื่อช่องปากเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งมากขึ้น และสภาวะโดยทั่วไปที่มีผลเพิ่มโอกาสการเป็นมะเร็ง (precancerous condition)⁽⁴⁾ ตัวอย่างของรอยโรคที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความเสี่ยงในการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งช่องปากได้ ได้แก่ ลิ่วโคเพลเคีย อีริโทรเพลเคีย ไลเคนแพลนัสในช่องปาก (oral lichen planus) ดิสคอยด์ลูฟัสอีริทิมาโตซัส (discoid lupus erythematosus) เป็นต้น^(4, 10) โดยพบว่าลักษณะทางคลินิกที่ส่งผลต่อการเพิ่มโอกาสการเปลี่ยนไปเป็นมะเร็ง ได้แก่ ขนาดของรอยโรคที่ใหญ่กว่า 200 ตารางมิลลิเมตร และรอยโรคสีแดงที่ผิวไม่เรียบ เป็นต้น⁽³⁵⁾

2.1 อีพิทีเลียลดิสเพลเซียของเยื่อช่องปาก

อีพิทีเลียลดิสเพลเซียของเยื่อช่องปาก คือลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่เซลล์เยื่อช่องปากแสดงลักษณะที่ผิดปกติไป รูปร่างเซลล์ผิดปกติ การเจริญเติบโตผิดปกติ หรือ

การจัดเรียงตัวของเซลล์ที่ผิดปกติไป มีผลทำให้เยื่อช่องปากเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งมากขึ้น โดยอาจแสดงลักษณะทางคลินิกเป็นรอยโรคลิ้นโคเพลเคีย รอยโรคอีริโทรเพลเคีย หรือรอยโรคอีริโทรลิ้นโคเพลเคียก็ได้⁽⁴⁾ ในปี ค.ศ.2005 องค์การอนามัยโลกได้มีการแบ่งประเภทของการเจริญผิดปกติของเยื่อผิว โดยแบ่งตามลักษณะทางจุลพยาธิของเซลล์เยื่อผิวได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

1. ไฮเพอร์เคอราโทซิส (hyperkeratosis)
2. อีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย (mild epithelial dysplasia)
3. อีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับปานกลาง (moderate epithelial dysplasia)
4. อีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรง (severe epithelial dysplasia)
5. มะเร็งยังไม่แพร่กระจาย (carcinoma in situ)

แต่ล่าสุดในปี ค.ศ.2017 องค์การอนามัยโลกได้มีการแบ่งประเภทของการเจริญผิดปกติของเยื่อผิว โดยเหลือเพียง 3 กลุ่มเท่านั้น⁽³⁶⁾ คือ

1. อีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย (mild epithelial dysplasia)
2. อีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับปานกลาง (moderate epithelial dysplasia)
3. อีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรง (severe epithelial dysplasia)

อีพิทีเลียลดิสเพลเซียของเยื่อผิวช่องปากมีอัตราการเปลี่ยนไปเป็นมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาได้ถึงร้อยละ 12 โดยพบว่ายิ่งการเจริญผิดปกติของเยื่อผิวรุนแรงมากขึ้นยิ่งมีโอกาสเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาได้มากขึ้นเช่นกัน⁽⁴⁾

3. พยาธิกำเนิดของรอยโรคมะเร็งในช่องปาก

ปัจจุบันเชื่อว่าพยาธิกำเนิดของมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา อาจเกิดได้จาก

3.1 การกลายพันธุ์ระดับพันธุกรรม (genetic mutation)

เช่น การกลายพันธุ์ของลำดับเบสบนดีเอ็นเอ ส่งผลให้การแสดงออกของยีนมีความผิดปกติไป จนนำไปสู่การเกิดมะเร็ง⁽³⁴⁾ ในการศึกษาของ Lindermann และคณะ ในปี 2018 พบว่ายีน *TP53* เป็นยีนที่มีการกลายพันธุ์ได้บ่อยที่สุดในผู้ป่วยมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา พบการกลายพันธุ์ของยีน *TP53* ถึงร้อยละ 65-85 โดยมักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบสคู่ใดคู่หนึ่งในสายพันธุกรรม ทำให้แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่ต่างไปจากเดิม (missense mutation) ส่งผลให้การแสดงออกของยีนผิดปกติไป โดยมักเกิดการกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่ง DNA binding domain ของยีน *TP53* ทำให้ได้โปรตีน p53 ที่มีการกลายพันธุ์ออกมา ซึ่ง p53 ดังกล่าว จะไปมีผลต่อยีนที่ควบคุมการซ่อมแซมดีเอ็นเอ วัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) และ

กระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ส่งผลให้มะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาติดต่อรังสีรักษาและยาเคมีบำบัด และมีอัตราการรอดชีวิตต่ำลง⁽³²⁾

3.2 การกลายพันธุ์ระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetic mutation)

การควบคุมระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetics) คือการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกิดจากกระบวนการต่าง ๆ ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลำดับของดีเอ็นเอ⁽¹³⁾ ประกอบไปด้วย 4 กลไกหลัก^(13, 37) ได้แก่

1. การเกิดเมทิลเลชันของดีเอ็นเอ (DNA methylation)
2. การปรับแต่งของโปรตีนฮิสโตน (histone modification)
3. ตำแหน่งของนิวคลีโอโซม (nucleosome positioning)
4. ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA หรือ miRNA)

กลไกดังกล่าวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาติน (chromatin) และโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนและเอนไซม์ในกระบวนการทรานสคริปชัน (Transcription) จึงส่งผลต่อการแสดงออกของยีน

3.2.1 การเกิดเมทิลเลชันของดีเอ็นเอ (DNA methylation)

กระบวนการเมทิลเลชัน คือการเติมหมู่เมทิล (-CH₃) หรือการดึงหมู่เมทิลออกจากสายพันธุกรรม มีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในร่างกายมนุษย์ หากมีความผิดปกติของกระบวนการนี้ จะทำให้การแสดงออกของยีนผิดปกติและนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ กระบวนการเมทิลเลชันมี 2 กลไกหลัก ได้แก่ กระบวนการ Genome-wide hypomethylation ซึ่งทำให้เกิดภาวะความไม่เสถียรของยีนและความผิดปกติของจำนวนหรือโครงสร้างของแท่งโครโมโซม (genome and chromosome instability) และมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของยีนกำเนิดมะเร็ง อีกกลไกหนึ่ง ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของการเติมหมู่เมทิล (hypermethylation) ที่บริเวณ Cytosine-phosphate-Guanine islands (CpG islands) ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน ซึ่งมักเกิดกับยีนต้านมะเร็ง และทำให้มีการแสดงออกของยีนต้านมะเร็งลดลงจนนำไปสู่การเกิดมะเร็ง⁽³⁸⁾ โดยกระบวนการเมทิลเลชันนี้เป็นกระบวนการที่ผันกลับได้ (reversible)

การเพิ่มขึ้นของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 ของเบสในนิวคลีโอไทด์ที่มีเบสไซโทซีนต่อกับเบสกวานีน (cytosine-guanine (CpG) nucleotide) ซึ่งบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์นี้อยู่อย่างหนาแน่น เรียกว่า CpG island โดยมักพบภายในบริเวณทรานสคริปชันโปรโมเตอร์ (transcription promoter) ของดีเอ็นเอ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA methyltransferases (DNMTs) ส่งผลให้ยีนนั้นไม่มีการแสดงออก (gene silencing) กระบวนการนี้พบว่าเกี่ยวข้องกับ

การเกิดมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น ในมะเร็งเต้านมและมะเร็งรังไข่ เมื่อเกิดการเพิ่มขึ้นของการเติมหมู่เมทิลจะทำให้การแสดงออกของยีน *Breast cancer gene 1 (BRCA1)* ลดลง ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง ส่งผลให้มะเร็งเติบโตมากขึ้น ในเนื้องอกสมองชนิดไกลิโอมา (glioma) และมะเร็งลำไส้ (colorectal cancer) พบว่าเมื่อเกิดการเพิ่มขึ้นของการเติมหมู่เมทิลจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair) ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ยีนต้านมะเร็ง เช่น *p53* และ *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)* ได้ง่ายขึ้น ทำให้เกิดมะเร็งได้ โดย MGMT ถือเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่ถูกค้นพบเป็นตัวแรกของมะเร็งที่เกิดจากกระบวนการเกิดเมทิลเลชันของดีเอ็นเอ โดยพบว่าสามารถตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดชื่อ Temozolomide ได้ดี⁽³⁷⁾

นอกจากนี้การลดลงของกระบวนการเมทิลเลชัน (hypomethylation) ก็สามารถทำให้เกิดมะเร็งได้เช่นกัน เช่น การลดลงของการเติมหมู่เมทิลที่บริเวณ CpG island ซึ่งเป็นตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *Long interspersed nuclear element 1 (LINE-1)* ทำให้เกิดการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสายโครมาตินที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *MET* ซึ่งเป็นยีนก่อมะเร็ง ดังนั้นจึงเป็นการกระตุ้นยีนก่อมะเร็ง การเกิดการลดลงของกระบวนการเมทิลเลชันของยีน *LINE-1* ยังใช้เป็นตัวบ่งชี้การลุกลามและการพยากรณ์โรคของมะเร็งได้หลายชนิด เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งผิวหนังชนิดเมลาโนมา มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และมะเร็งไต เป็นต้น⁽³⁷⁾

3.2.2 การปรับแต่งของโปรตีนฮิสโตน (histone modification)

โปรตีนฮิสโตนที่ขดอยู่กับสายดีเอ็นเอจะมีส่วนปลายสายเอ็น (N-terminal tail) ที่จะเกิดกระบวนการต่าง ๆ ได้แก่ การเติมหมู่เมทิลหรือเมทิลเลชัน การเติมหมู่อะซิติกหรืออะซิติกเลชัน (acetylation), การเติมยูบิควิติน (ubiquitination) และการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ต่อไป ซึ่งส่งผลต่อโปรตีนเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน การเกิด การปรับแต่งของโปรตีนฮิสโตนนี้จะมีการเปลี่ยนฮิสโตนให้เกิดเป็นรหัสของฮิสโตน (histone code) โดยต้องอาศัยเอนไซม์ต่าง ๆ ส่งผลให้นิวคลีโอโซม (nucleosome) ขดตัวแน่นขึ้น ทำให้ทรานสคริปชัน แฟกเตอร์ (transcription factor) ไม่สามารถมาจับได้ จึงไม่เกิดการแสดงออกของยีนนั้น หรือส่งผลให้นิวคลีโอโซมคลายตัวออก ทำให้ให้ทรานสคริปชัน แฟกเตอร์สามารถมาจับได้ จึงเกิดการแสดงออกของยีนนั้น โดยขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนที่ควบคุม เช่น การเติมหมู่อะซิติก (acetyl) เข้าไปที่กรดอะมิโนไลซีนของโปรตีนฮิสโตน ทำให้ประจุลบจากหมู่อะซิติกไปผลักกับ

ประจุลบของดีเอ็นเอ จึงทำให้สายดีเอ็นเอและโปรตีนฮิสโตนคลายตัวออกจากกัน ส่งผลให้เอนไซม์ RNA polymerase และทรานสคริปชัน แฟกเตอร์สามารถเข้าถึงตำแหน่งโปรโมเตอร์บนสายดีเอ็นเอได้ โดยอาศัยเอนไซม์ histone acetyltransferases (HATs) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน ในขณะที่การดึงหมู่อะซิติกออกจากโปรตีนฮิสโตน ทำให้สายดีเอ็นเอจับกับโปรตีนฮิสโตนซึ่งมีประจุบวกได้แน่นขึ้น ส่งผลให้ทรานสคริปชัน แฟกเตอร์เข้ามาจับที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ไม่ได้ โดยอาศัยเอนไซม์ histone deacetylases (HDACs) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จึงทำให้ไม่เกิดการแสดงออกของยีนนั้น ๆ การเติมหมู่เมทิลให้โปรตีนฮิสโตน โดยเอนไซม์ histone methyltransferases (HMT) จะส่งผลให้เกิดได้ทั้งการแสดงออกของยีนหรือไม่มีการแสดงออกของยีนก็ได้ ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่ไปเติมหมู่เมทิล⁽¹³⁾

ดังนั้นในการควบคุมการแสดงออกของยีน นอกจากต้องอาศัยกระบวนการเกิดเมทิลเลชันของดีเอ็นเอแล้ว ยังต้องอาศัยการปรับแต่งของโปรตีนฮิสโตนร่วมด้วย โดยทั่วไปตำแหน่งที่มีการทรานสคริปชันของยีนอย่างต่อเนื่องจะมีระดับของดีเอ็นเอที่เกิดเมทิลเลชันต่ำ แต่มีฮิสโตนที่เกิดอะซิติกเลชันในระดับที่สูง ในทางกลับกันยีนที่มีการทำงานน้อยหรือมีการทรานสคริปชันน้อย จะมีระดับของดีเอ็นเอที่เกิดเมทิลเลชันสูง แต่มีฮิสโตนที่เกิดอะซิติกเลชันในระดับที่ต่ำ⁽¹³⁾

3.2.3 ตำแหน่งของนิวคลีโอโซม (nucleosome positioning)

ตำแหน่งของนิวคลีโอโซมที่เปลี่ยนแปลงไปมักเป็นผลมาจากการเกิดเมทิลเลชันในสายดีเอ็นเอและการปรับแต่งของโปรตีนฮิสโตน ทำให้ทรานสคริปชัน แฟกเตอร์มาจับไม่ได้ จึงไม่เกิดการแสดงออกของยีนด้านมะเร็ง เช่น การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งใน SWItch/Sucrose Non-Fermentable complex (SWI-SNF complex) เปลี่ยนแปลงรูปร่าง ทำให้ไม่เกิดการแสดงออกของยีน *p21* และ *p16* ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง จึงนำไปสู่การเกิดมะเร็ง⁽¹³⁾

3.2.4 ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNA หรือ miRNA)

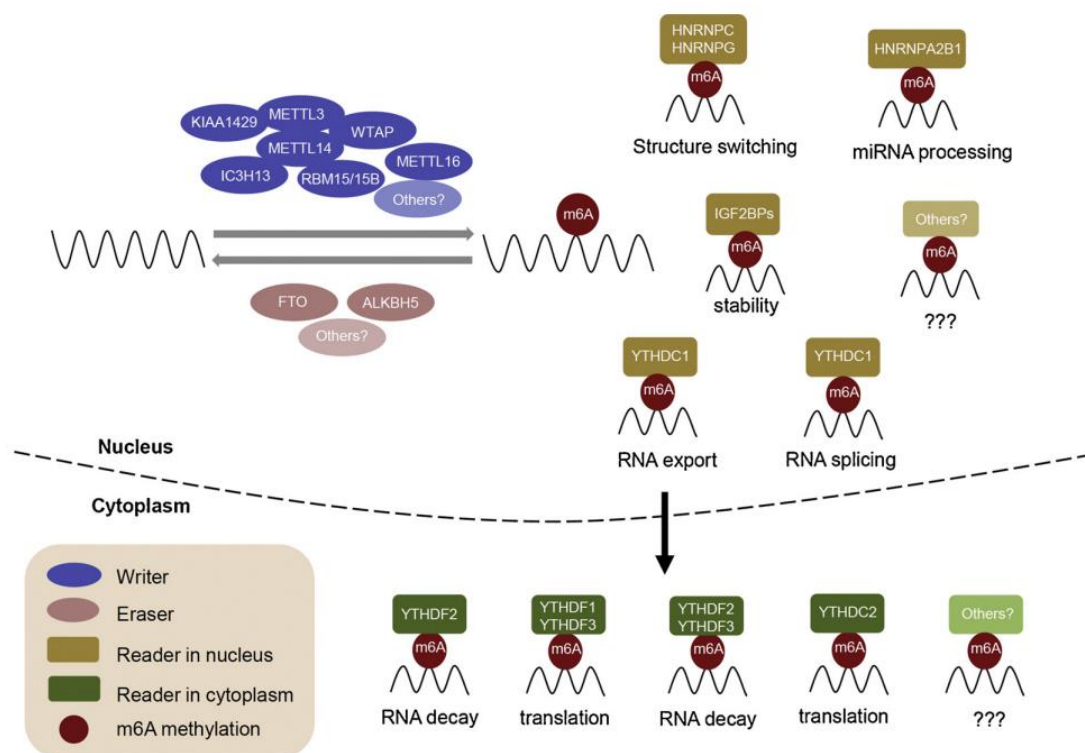
ไมโครอาร์เอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอขนาดเล็กที่ไม่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน แต่มีผลต่อการแสดงออกของยีน โดยเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทรานสคริปชัน การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ไมโครอาร์เอ็นเอทำหน้าที่ได้ทั้งด้านการเกิดมะเร็งและส่งเสริมการเกิดมะเร็ง ขึ้นอยู่กับยีนเป้าหมายของมัน เช่น ในมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบบเรื้อรัง (chronic lymphocytic leukemia) จะพบ *miR-15* และ *miR-16* ซึ่งเป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่ต้านการเกิดมะเร็งจะไปลดการแสดงออกของยีนเป้าหมายคือยีน *B-cell lymphoma 2 (BCL2)* ซึ่งเป็นยีนที่ต้านการตายของเซลล์ ในทางตรงกันข้ามจะพบ *miR-21* ซึ่งเป็นไมโครอาร์เอ็นเอที่ส่งเสริมการเกิด

มะเร็ง จะไปเพิ่มการแสดงออกของยีนเป้าหมายคือยีน *PTEN* ในมะเร็งสมองชนิด ไกลโอโบลาสโตมา⁽¹³⁾

ในปัจจุบันพบว่ากระบวนการควบคุมระดับเนื้อพันธุกรรมสามารถเกิดได้ทั้งในระดับ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ เช่น การดัดแปลง N⁶-methyladenosine (m6A) ซึ่งจัดเป็นการควบคุม ระดับเนื้อพันธุกรรมในระดับอาร์เอ็นเอ เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนที่คล้ายกับการเกิด กระบวนการเมทิลเลชันของดีเอ็นเอ และการปรับแต่งฮิสโตน⁽¹³⁾

4. กระบวนการเมทิลเลชันในอาร์เอ็นเอ (RNA methylation)

N⁶-methyladenosine (m6A) RNA methylation คือกระบวนการเติมหมู่เมทิลเข้าไป ที่ไนโตรเจนลำดับที่ 6 ของเบสอะดีโนซีนในอาร์เอ็นเอ ซึ่งถือเป็นกระบวนการดัดแปลง เมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอที่มีความสำคัญในเซลล์ยูคาริโอต⁽¹⁴⁾ กระบวนการดัดแปลง m6A ดังกล่าว มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ ได้แก่ กระบวนการตัดต่อ (splicing) การคงอยู่ (stability) การเริ่มต้นการสังเคราะห์โปรตีน (translational initiation) การขนส่ง (transportation) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับกลไกทางชีววิทยาของ ร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกหลายอย่าง เช่น กระบวนการเจริญในระยะเอมบริโอ การเจริญของ เนื้อเยื่อ การสร้างและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อไปทำหน้าที่ของเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) การเจริญของระบบประสาท การควบคุมจังหวะเซอร์คาเดียน (circadian rhythms) ในร่างกาย มนุษย์ การตอบสนองต่อความเครียด การกำหนดเพศ และการเกิดมะเร็งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม^(15, 16, 39-41) โดยกระบวนการสังเคราะห์ m6A ประกอบด้วย 3 องค์ประกอบหลักได้แก่ m6A writers, m6A erasers และ m6A readers⁽²⁹⁾ (ภาพประกอบ 2) มีรายละเอียดดังนี้



ภาพประกอบ 2 กระบวนการเมทิลเลชันของ m6A

ที่มา : Sun T, Wu R, Ming L. The role of m6A RNA methylation in cancer. Biomed Pharmacother. 2019;112:108613.

1. m6A writers (methyltransferases) จัดเป็นกลุ่มเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ที่ควบคุมการเติมหมู่เมทิลของ m6A โดยประกอบไปด้วยเอนไซม์ Methyltransferase-like 3 (METTL3), เอนไซม์ Methyltransferase-like 14 (METTL14) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นองค์ประกอบหลักของ m6A writers นอกจากนั้นยังมีองค์ประกอบอื่นๆ ใน m6A writers ได้แก่ Wilms' tumor 1-associated protein (WTAP), Methyltransferase-like 16 (METTL16), VIRMA (KIAA1429) และ RNA-binding motif protein 15 (RBM 15) ^(20, 42)

2. m6A erasers (demethylases) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการนำหมู่เมทิลออกจาก m6A ซึ่งเป็นสิ่งที่แสดงว่ากระบวนการดัดแปลง m6A เป็นกระบวนการที่ผันกลับได้ โดยมีเอนไซม์

ที่เป็นองค์ประกอบหลัก 2 ชนิด ได้แก่ fat mass and obesity-associated protein (FTO) และ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase homolog 5 (ALKBH5)^(20, 42) FTO เป็นเอนไซม์ RNA demethylase ตัวแรกที่ถูกค้นพบ⁽⁴³⁾ จัดอยู่ในตระกูล α -ketoglutarate-dependent dioxygenase⁽²⁰⁾ มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับกระบวนการสร้างเซลล์ไขมัน (adipogenesis) และภาวะอ้วน (obesity)⁽⁴⁴⁾ ในขณะที่ ALKBH5 จัดเป็นเอนไซม์ RNA demethylase ตัวที่สองที่ถูกค้นพบ จัดอยู่ในตระกูล α -ketoglutarate-dependent dioxygenase เช่นเดียวกับ FTO⁽²⁰⁾ มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับกระบวนการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) และกระบวนการสร้างกระดูก (ossification)⁽⁴⁵⁾

3. m6A readers (m6A-binding protein) ซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีนที่ควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมของ m6A โดย m6A readers จะเข้ามาจับกับ m6A modification อีกที โดยมีทั้ง m6A readers ที่พบในนิวเคลียสและในไซโทพลาซึมของเซลล์ กลุ่มของ m6A readers ที่พบในนิวเคลียส ได้แก่ YTH domain-containing protein 1 (YTHDC1), Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 - 3 (IGF2BP1 - 3) ส่วน m6A readers ที่พบในไซโทพลาซึม ได้แก่ YTHDC2, YTH N6-Methyladenosine RNA Binding Protein 1 - 3 (YTHDF1 - 3) เป็นต้น^(20, 42)

5. กระบวนการดัดแปลง m6A ในมะเร็ง

ในปัจจุบันนักวิจัยพบว่ากระบวนการเมทิลเลชันในระดับอาร์เอ็นเอของ m6A และโปรตีนที่เกี่ยวข้องทั้ง m6A writers, erasers, และ readers มีความเกี่ยวข้องกับการกำเนิดมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ ของมนุษย์ เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว⁽¹⁷⁾ มะเร็งเต้านม⁽¹⁸⁾ มะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer)⁽⁴⁶⁾ และมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก (endometrial cancer)⁽⁴⁷⁾ เป็นต้น โดยจากการศึกษาของ Wang และคณะ ในปี 2020 พบระดับการแสดงออกของ m6A เพิ่มขึ้นในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดยการที่มี m6A เพิ่มมากขึ้นใน Bcl-2 mRNA จะส่งเสริมให้เกิดการทรานสเลชัน (translation) เป็นโปรตีน Bcl-2 มากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนและลดการตายแบบอะพอพโทซิส ของเซลล์มะเร็งเต้านม⁽¹⁸⁾ อย่างไรก็ตาม Liu และคณะ ในปี 2018 พบระดับการแสดงออกของ m6A ลดลงในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก และได้สรุปว่าการแสดงออกของ m6A ที่น้อยลง นำไปสู่กระบวนการเกิดสภาวะกระตุ้นของโปรตีน Akt strain transforming (Akt) และ mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) ซึ่งส่งผลต่อการอยู่รอดของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก⁽⁴⁷⁾

ในมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซีโนมาพบว่ามีการศึกษาถึงกระบวนการดัดแปลง m6A โดยศึกษาถึงบทบาทของ m6A writers พบว่าระดับการแสดงออกของ METTL3 เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซีโนมาเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดยมีกลไกคือ METTL3 จะไปเติมหมู่เมทิลที่ mRNA ของยีนต่าง ๆ เช่น *cellular Myc (c-Myc)* mRNA, *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 (BMI1)* mRNA หรือผ่านทาง p38 MAPK pathway (mitogen-activated protein kinase) เป็นต้น⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾ ทำให้เสถียรภาพของ c-Myc mRNA เพิ่มขึ้น การแสดงออกของโปรตีน BMI1 และ p38 เพิ่มขึ้นจึงส่งเสริมการเพิ่มจำนวน การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และพบว่าระดับการแสดงออกของ METTL3 ที่เพิ่มขึ้นนั้นสัมพันธ์กับระยะของโรคมะเร็งที่รุนแรงขึ้น การแพร่กระจายไปต่อมน้ำเหลือง และเป็นปัจจัยที่ใช้พยากรณ์โรค (prognostic factor) สำหรับอัตราการรอดชีวิต 5 ปี แต่ไม่พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกของ METTL3 กับเพศและอายุของผู้ป่วย⁽⁴⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า m6A readers เช่น Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2B1 (HNRNPA2B1) มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซีโนมาเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดยมีกลไกผ่านทาง Long Interspersed Nuclear Element-1 /Transforming Growth Factor β -1 /Snail signaling pathway (LINE-1/TGF- β 1/Snail signaling pathway) ทำให้การแสดงออกของโปรตีน LINE-1 เพิ่มขึ้นจึงส่งเสริมการเพิ่มจำนวน การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และพบว่าระดับการแสดงออกของ HNRNPA2B1 ที่เพิ่มขึ้นนั้นสัมพันธ์กับระยะของโรคมะเร็งที่รุนแรงขึ้น และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง⁽⁵¹⁾ ส่วนการศึกษาใน m6A erasers จะกล่าวถึงในลำดับถัดไป

5.1 บทบาทของ FTO และ ALKBH5 ในมะเร็งชนิดต่าง ๆ

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าทั้ง FTO และ ALKBH5 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการกำเนิดมะเร็ง และการต้านมะเร็งชนิดต่าง ๆ ดังมีรายละเอียดแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตาราง 1 บทบาทของ FTO ในมะเร็ง

บทบาท ของ FTO	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
กำเนิดมะเร็ง	Acute myeloid leukemia	ศึกษาโดยวิธี quantitative PCR (qPCR), Western blot และ m6A dot blot พบการแสดงออกของโปรตีน FTO ที่เพิ่มขึ้น แต่การแสดงออกของ m6A ลดลงในตัวอย่างชิ้นเนื้อ มะเร็งเม็ดเลือดขาวเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดย เอนไซม์ FTO จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน <i>Amanah Saham Bumiputera 2 (ASB2)</i> และ <i>Retinoic Acid Receptor Alpha (RARA)</i> ทำให้ระดับของ m6A ลดลง และยับยั้งการแสดงออกของยีน <i>ASB2</i> และ <i>RARA</i> ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเจริญเติบโตและยับยั้งการทำงานของ all-trans-retinoic acid (ATRA) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยลดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว	(21)
กำเนิดมะเร็ง	Breast cancer	ศึกษาโดยวิธี reverse transcription PCR (RT-PCR), RNA dot blot, RNA immunoprecipitation sequencing (RIP-seq), Western blot และ immunohistochemistry (IHC) ในเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และ MCF-7 และในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมชนิด double negative breast cancer (DNBC : ER-/PR-/Her2+) พบการแสดงออกของโปรตีน FTO เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ และพบว่าชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านมมี m6A ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย FTO จะส่งเสริมการเพิ่มจำนวน การสร้างโคไลน์ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง โดย FTO จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก 3'UTR ของยีน <i>Bcl-2</i> and <i>Nineteen kilodalton Interacting Protein-3 (BNIP3)</i> และเหนี่ยวนำให้ถูกทำลายโดยกลไกของ YTHDF2 ทำให้ระดับการแสดงออกของ m6A และยีน <i>BNIP3</i> ลดลง ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส จึงทำให้เซลล์มะเร็งเพิ่มจำนวน	(22)

ตาราง 1 (ต่อ)

บทบาท ของ FTO	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
กำเนิดมะเร็ง	Bladder cancer	ศึกษาโดยวิธี m6A sequencing, RNA sequencing, RNA immunoprecipitation (RIP), qPCR, Western blot และ IHC พบระดับการแสดงออกของยีน <i>FTO</i> และโปรตีน <i>FTO</i> ที่เพิ่มขึ้น แต่การแสดงออกของ m6A ลดลงในชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย <i>FTO</i> จะส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ผ่านทางกลไกที่ <i>FTO</i> ไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน <i>metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1)</i> ทำให้เพิ่มเสถียรภาพของ mRNA ของยีน <i>MALAT1</i> และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน <i>MALAT1</i> ซึ่งเป็นตัวไปยับยั้งไมโครอาร์เอ็นเอ <i>miR-384</i> ทำให้การแสดงออกของโปรตีน <i>Mal T cell differentiation protein 2 (MAL2)</i> เพิ่มขึ้น จึงส่งเสริมการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง โดยการแสดงออกของ <i>FTO</i> ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง	(52)
กำเนิดมะเร็ง	Gastric cancer	ศึกษาโดยวิธี quantitative real-time PCR (qRT-PCR), Western blot และ IHC พบระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน <i>FTO</i> ที่เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย <i>FTO</i> จะส่งเสริมการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน การเคลื่อนย้าย และการลุกลามของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร โดยการแสดงออกของ <i>FTO</i> ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง อัตราการรอดชีวิตที่ลดลงและพยากรณ์โรคที่แย่ลง	(53)

ตาราง 1 (ต่อ)

บทบาท ของ FTO	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
กำเนิดมะเร็ง	Glioblastoma	ศึกษาโดยวิธี RNA dot blot และ reverse transcriptase PCR (RT-PCR) พบว่าระดับ m6A เพิ่มขึ้นในเซลล์ต้นกำเนิดไกลิโอเบลาสโตมา (Glioblastoma stem cell) ที่มีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นที่ทำหน้าที่จำเพาะ (differentiation) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดไกลิโอเบลาสโตมาที่มีการเพิ่มจำนวน โดย FTO จะไปส่งเสริมการลูกลามของมะเร็งสมองชนิดไกลิโอเบลาสโตมา	(23)
ต้านมะเร็ง	Clear cell renal cell carcinoma	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, Western blot และ IHC พบระดับการแสดงออกของโปรตีน FTO ลดลงในชิ้นเนื้อมะเร็งไตชนิดเซลล์ใสเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดยพบว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีระดับความรุนแรงมากจะพบการแสดงออกของ FTO ลดลง กลไกการทำงานของ FTO จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก adenosine residues ใน 3'UTR ของ mRNA ของ ยีน <i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1α)</i> ซึ่งเป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของเซลล์ ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของ m6A ลดลง แต่เพิ่มความเสถียรของ <i>PGC-1α</i> mRNA และเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน <i>PGC-1α</i> ซึ่งส่งผลให้เพิ่มการเกิดกระบวนการชีวกำเนิดของไมโทคอนเดรีย (mitochondria biogenesis) และไปยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็ง	(54)

ตาราง 1 (ต่อ)

บทบาท ของ FTO	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
ต้านมะเร็ง	Intrahepatic cholangio carcinoma	ศึกษาโดยวิธี IHC และ tissue microarray พบการแสดงออก ของโปรตีน FTO ลดลงในชิ้นเนื้อมะเร็งท่อน้ำดีในเนื้อตับ เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย FTO จะไป ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผ่านทาง การยับยั้ง การแสดงออกของยีนก่อมะเร็ง เช่น <i>TEA Domain Transcription Factor 2 (TEAD2)</i> และ <i>CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4 (CMTM4)</i> และ ส่งเสริมการแสดงออกของยีนต้านมะเร็ง (<i>HAO2, NR5A2, CCL19, TCF21, NTRK2, SCML4</i>) โดย FTO ยังช่วยส่งเสริม การตายของเซลล์แบบ อะพอพโทซิส และยับยั้ง การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งอีกด้วย การแสดงออกของ โปรตีน FTO ยังสัมพันธ์กับการเปลี่ยนสภาพของมะเร็ง (tumor differentiation) โดยพบว่า FTO มีการแสดงออกลดลง ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีในเนื้อตับชนิด poorly differentiated	(55)
ต้านมะเร็ง	Primary hepatocellular carcinoma	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR และ IHC พบการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน FTO ลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งเซลล์ตับ เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดยพบการติดสี ของ FTO ที่ลดลงบริเวณนิวเคลียสของเซลล์มะเร็ง โดย การแสดงออกของ FTO ที่ลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งเซลล์ตับนี้ สัมพันธ์กับขนาดของมะเร็ง การแพร่กระจาย การลุกลามเข้า หลอดเลือด (vascular invasion) อัตราการรอดชีวิตที่สั้นลง (overall survival time) และการพยากรณ์โรคที่แย่ลง	(56)

ตาราง 1 (ต่อ)

บทบาท ของ FTO	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
กำเนิดมะเร็ง	Lung squamous cell carcinoma	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR และ Western blot ในเซลล์มะเร็ง และตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ปอด พบระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน FTO เพิ่มขึ้น แต่การแสดงออกของ m6A ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์เยื่อปอดปกติและเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย FTO จะ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา ที่ปอด ผ่านกลไกที่ FTO ไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน <i>Myeloid Zinc Finger 1 (MZF1)</i> ทำให้เพิ่มเสถียรภาพของ mRNA ของยีน <i>MZF1</i> และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน <i>MZF1</i> ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยการแสดงออกของ FTO ที่เพิ่มขึ้นนี้สัมพันธ์กับพยากรณ์ของโรคที่แย่ลง	(57)
กำเนิดมะเร็ง	Cervical squamous cell carcinoma	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, Western blot และ IHC พบระดับ การแสดงออกของ mRNA ของ FTO ที่เพิ่มขึ้นในตัวอย่างชิ้นเนื้อ มะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ปากมดลูกเมื่อเปรียบเทียบกับ เนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย FTO จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก m6A ทำให้ระดับการแสดงออกของ m6A ใน mRNA ของ β -catenin ลดลง ส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน β -catenin เพิ่มขึ้น และไปเพิ่มการแสดงออกของ excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) จึงทำให้ มะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ปากมดลูกดื้อต่อการให้ ยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี และในเนื้อเยื่อมะเร็ง สความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ปากมดลูกที่มีการแสดงออกของ ทั้ง FTO และ β -catenin ในระดับที่สูงจะมีพยากรณ์ของโรค ที่แย่กว่าในเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของ FTO และ β -catenin ในระดับที่ต่ำ	(58)

ตาราง 1 (ต่อ)

บทบาท ของ FTO	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
กำเนิดมะเร็ง	Esophageal squamous cell carcinoma	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, Western blot และ IHC พบ การแสดงออกของโปรตีน FTO ที่เพิ่มขึ้นในตัวอย่างชิ้นเนื้อของ มะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่หลอดอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับ เนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย FTO จะไปส่งเสริม การเจริญเติบโต การเคลื่อนย้าย และการสร้างโคโลนีของ เซลล์มะเร็งผ่านทาง การเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ในยีน <i>Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13)</i> และการแสดงออกของโปรตีน MMP13 ให้เพิ่มขึ้น	(59)

ตาราง 2 บทบาทของ ALKBH5 ในมะเร็ง

บทบาทของ ALKBH5	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
กำเนิดมะเร็ง	Acute myeloid leukemia	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, Western blot, RNA sequencing, RIP-seq และ m6A sequencing พบการแสดงออกของยีนและ โปรตีน ALKBH5 เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว เมื่อเปรียบเทียบกับในเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่ปกติ และ การแสดงออกของ ALKBH5 ที่เพิ่มขึ้นนี้สัมพันธ์กับการพยากรณ์ โรคที่แย่ลง โดย ALKBH5 จะไปเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 (TACC3) ส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวและเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น รวมถึงยับยั้งการตายของเซลล์มะเร็ง	(60)

ตาราง 2 (ต่อ)

บทบาทของ ALKBH5	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
กำเนิดมะเร็ง	Breast cancer	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR และ IHC ในเซลล์มะเร็งเต้านม 9 ชนิด พบว่าการแสดงออกของ ALKBH5 ขึ้นอยู่กับสภาวะขาดออกซิเจน (hypoxic condition) โดยเมื่อออกซิเจนต่ำจะชักนำให้การแสดงออกของ ALKBH5 เพิ่มขึ้น ซึ่งจะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก adenosine residues ใน 3'UTR ของ mRNA ของยีน <i>NANOG</i> ส่งผลให้เพิ่มความเสถียรของ <i>NANOG</i> mRNA และการแสดงออกของโปรตีน <i>NANOG</i> เพิ่มขึ้น โดย <i>NANOG</i> มีบทบาทสำคัญในการทำให้เซลล์ต้นกำเนิดของมะเร็งเต้านมเกิดการสร้างก้อนเนื้อมะเร็งระยะเริ่มแรกและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และพบว่ามี การแสดงออกของโปรตีน ALKBH5 และ HIF-1 α (<i>Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha</i>) ในชิ้นเนื้อมะเร็งเต้านม	(24, 61)
กำเนิดมะเร็ง	Gastric cancer	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, Western blot, IHC และ immunofluorescence พบระดับการแสดงออกของโปรตีน ALKBH5 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะอาหาร เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย ALKBH5 ส่งเสริมให้เกิดการลุกลามและการแพร่กระจายของมะเร็งกระเพาะอาหารผ่านการไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน <i>Nuclear Enriched Abundant Transcript 1 (NEAT1)</i> ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน NEAT1 เพิ่มขึ้น ซึ่งจะไปมีผลให้เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) จึงยิ่งเพิ่มการลุกลามและการแพร่กระจายของมะเร็ง	(26)

ตาราง 2 (ต่อ)

บทบาทของ	ชนิดของ	กลไก	References
ALKBH5	มะเร็ง		
กำเนิดมะเร็ง	Glioblastoma	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, IHC, immunofluorescence และ Western blot พบระดับการแสดงออกของโปรตีน ALKBH5 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งสมองชนิดไกลิโอเบลาสโตมา และมักติดสีบริเวณนิวเคลียส โดย ALKBH5 ทำให้การแสดงออกของโปรตีน FOXM1 เพิ่มขึ้น ส่งเสริมให้เซลล์ต้นกำเนิดไกลิโอเบลาสโตมาเพิ่มจำนวน และเกิดเป็นมะเร็ง	(25)
กำเนิดมะเร็ง	Epithelial ovarian cancer	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, Western blot และ IHC พบระดับการแสดงออกของโปรตีน ALKBH5 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเซลล์เยื่อบุผิวรังไข่เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อรังไข่ปกติ และติดสีเด่นชัดที่เยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาซึม โดยในมะเร็งระยะท้าย (stage III/IV) พบการแสดงออกของ ALKBH5 สูงกว่ามะเร็งระยะเริ่มแรก (stage I/II) และสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตโดยโรคสงบ (progression free survival) และอัตราการรอดชีวิตโดยรวม (overall survival) ที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มของการย้อมติดสีสัมพันธ์กับระดับของเนื้องอก (Grading of tumor) โดยเนื้อเยื่อมะเร็งระดับ 2 และ 3 มีความเข้มของการย้อมติดสีมากกว่ามะเร็งระดับ 1 และพบการแสดงออกของโปรตีน ALKBH5 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งเซลล์เยื่อบุผิวรังไข่เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย ALKBH5 จะดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน <i>NEAT1</i> ทำให้เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน <i>NEAT1</i> ซึ่งทำให้โปรตีน <i>EZH2</i> แสดงออกเพิ่มขึ้นด้วย ส่งผลให้มะเร็งลุกลามและแพร่กระจาย และ ALKBH5 ยังไปยับยั้งการกลืนกินตัวเองของเซลล์อีกด้วย ผ่านการกระตุ้นกลไก EGFR-PIK3CA-AKT-mTOR signaling pathway	(62)

ตาราง 2 (ต่อ)

บทบาทของ ALKBH5	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
กำเนิดมะเร็ง	Non-small cell lung cancer (NSCLC)	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, RIP-qPCR และ Western blot, พบว่าระดับการแสดงออกของ m6A ลดลง แต่ mRNA และ โปรตีน ALKBH5 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งปอดเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ และการแสดงออกของ ALKBH5 ที่เพิ่มขึ้นนี้สัมพันธ์กับผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีพยากรณ์โรคที่แย่ลง โดย ALKBH5 จะส่งเสริมการเพิ่มจำนวน และลดการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งปอด ผ่านกลไกที่ ALKBH5 ไปลดเสถียรภาพของ mRNA ของยีน <i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3)</i> และลดการผลิตโปรตีน TIMP3	(63)
กำเนิดมะเร็ง	Renal cell carcinoma	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, Western blot, RIP, methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP), m6A dot blot, mRNA stability และ IHC พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน ALKBH5 เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งไตเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ การแสดงออกของ ALKBH5 ที่เพิ่มขึ้นนี้สัมพันธ์กับขนาดของเนื้องอกที่ใหญ่ขึ้น ระยะของมะเร็งที่ลุกลามแพร่กระจาย พยากรณ์โรคที่แย่ลง และอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง โดย ALKBH5 จะส่งเสริมการเพิ่มจำนวน การสร้างโคโลนี และการลุกลามของเซลล์มะเร็ง ผ่านการที่ ALKBH5 ไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน <i>Aurora Kinase B (AURKB)</i> ส่งผลให้ระดับของ m6A ลดลงและเสถียรภาพของ mRNA ของยีน <i>AURKB</i> เพิ่มขึ้น ทำให้การแสดงออกของโปรตีน AURKB เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นโปรตีนที่สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง	(64)

ตาราง 2 (ต่อ)

บทบาทของ ALKBH5	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
ต้านมะเร็ง	Pancreatic cancer	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, Western blot, MeRIP และ IHC พบว่าระดับการแสดงออกของ m6A mRNA ของยีน <i>ALKBH5</i> และโปรตีน <i>ALKBH5</i> ลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อนเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดยพบระดับการแสดงออกของ <i>ALKBH5</i> ที่ต่ำในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อนชนิด poorly differentiated ในขณะที่พบระดับการแสดงออกของ <i>ALKBH5</i> สูงในเนื้อเยื่อมะเร็งตับอ่อนชนิด well differentiated และ moderately differentiated นอกจากนี้ยังพบว่า การแสดงออกของ <i>ALKBH5</i> ที่ต่ำสัมพันธ์กับการมีอัตราการรอดชีวิตที่สั้นลง โดยโปรตีน <i>ALKBH5</i> จะไปลดการเพิ่มจำนวน การลุกลามและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งผ่านทางกลไกที่ <i>ALKBH5</i> ไปดึงหมู่มะทิลออกจาก mRNA ของยีน <i>Period Circadian Regulator 1 (PER1)</i> ทำให้การแสดงออกของโปรตีน <i>PER1</i> เพิ่มขึ้น	(65)
ต้านมะเร็ง	Hepatocellular carcinoma	ศึกษาโดยวิธี MeRIP-seq, RNA sequencing, m6A dot blot, MeRIP-qPCR, Western blot และ IHC พบระดับการแสดงออกของโปรตีน <i>ALKBH5</i> ลดลงในเนื้อเยื่อมะเร็งตับเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย <i>ALKBH5</i> จะไปดึงหมู่มะทิลออกจาก mRNA ของยีน <i>LYPD1</i> ทำให้ระดับ m6A ลดลง ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน <i>LYPD1</i> ลดลง จึงทำให้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการลุกลามของเซลล์มะเร็งตับ และพบว่าการแสดงออกของ <i>ALKBH5</i> ที่ลดลงนี้สัมพันธ์กับพยากรณ์ของโรคมะเร็งตับที่แย่งลง	(66)

ตาราง 2 (ต่อ)

บทบาทของ ALKBH5	ชนิดของ มะเร็ง	กลไก	References
ต้านมะเร็ง	Bladder cancer	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, m6A dot blot, MeRIP-qPCR, Western blot และ IHC พบระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน ALKBH5 ลดลงในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดยพบการติดสีของ ALKBH5 ที่บริเวณนิวเคลียสและไซโทพลาซึม การแสดงออกของ ALKBH5 ที่ลดลงนี้สัมพันธ์กับระยะของมะเร็งที่แย่งพยากรณ์โรคที่แย่ง และอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง โดย ALKBH5 จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน <i>Casein Kinase 2 Alpha (CK2α)</i> ทำให้ระดับ m6A และเสถียรภาพของ mRNA ของยีน <i>CK2α</i> ลดลง ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน <i>CK2α</i> และ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) ลดลง จึงทำให้ลดการเพิ่มจำนวน การสร้างโคโลนี การลุกลามของเซลล์มะเร็ง เพิ่มการตอบสนองต่อยา Cisplatin และเพิ่มการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	(67)
กำเนิดมะเร็ง	Esophageal squamous cell carcinoma	ศึกษาโดยวิธี วิธี qRT-PCR, Western blot และ IHC พบการแสดงออกของ ALKBH5 ในชั้นเนื้อมะเร็งสควamous คาร์ซิโนมาที่หลอดอาหาร โดยพบติดสีในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติ ซึ่งพบว่า ALKBH5 มีบทบาทในการส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง สควamous คาร์ซิโนมาที่หลอดอาหารและการแสดงออกของ ALKBH5 ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับพยากรณ์โรคที่แย่ง	(68)

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของทั้ง FTO และ ALKBH5 ในมะเร็งในการศึกษาเดียวกันมีอยู่ไม่มาก มีเพียงการศึกษาของ Strick และคณะ ในปี 2020 พบว่าระดับการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ลดลงในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งไตชนิดเซลล์ใส (clear cell renal cell carcinoma) เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตปกติ โดยพบการแสดงออกของยีน FTO และ ALKBH5 ที่ต่ำในมะเร็งไตชนิดเซลล์ใสในระยะแพร่กระจาย (M1) เมื่อเปรียบเทียบกับในระยะที่ยังไม่มีการแพร่กระจาย (M0) ซึ่งระดับการแสดงออกของยีน FTO และ ALKBH5 ที่ต่ำนี้สัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง จากผลการยับยั้งทางอิมมูโนฮิสโตเคมีทั้ง FTO และ ALKBH5 จะติดสีเข้มที่นิวเคลียสและติดสีจางที่ไซโทพลาซึม โดยการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองจะแตกต่างกันในมะเร็งไตชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ใน oncocytoma ซึ่งจัดเป็นเนื้องอกไม่ร้ายที่ไต (benign renal lesion) พบว่ามีระดับการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อไตปกติและเนื้อเยื่อมะเร็งไตชนิดอื่น ๆ⁽⁶⁹⁾

5.2 บทบาทของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าบทบาทหน้าที่และการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคก่อนมะเร็ง เช่น รอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย ยังไม่มีการศึกษาวิจัยมาก่อน ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมายังมีอยู่ไม่มาก ดังมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตาราง 3 บทบาทของ FTO และ ALKBH5 ในมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา

บทบาทของ FTO และ ALKBH5	ชนิดของมะเร็ง	กลไก	References
กำเนิดมะเร็ง	Oral squamous cell carcinoma	ศึกษาโดยวิธี qRT-PCR, Western blot และ IHC พบการแสดงออกของยีนและโปรตีน FTO เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดย FTO มีความเกี่ยวข้องกับ การควบคุมกระบวนการเซลล์กลืนกินตัวเอง และการเกิดมะเร็งผ่านทางกลไกที่ FTO ส่งเสริมให้การแสดงออกของยีนและโปรตีน eIF4 G1 เพิ่มขึ้น ส่งผลให้กระบวนการเซลล์กลืนกินตัวเองลดลง และส่งเสริมการเพิ่มจำนวน การเคลื่อนย้าย และการลุกลามของเซลล์มะเร็ง	(27)
กำเนิดมะเร็ง	Oral squamous cell carcinoma	ศึกษาโดยวิธี IHC, immunoblotting และ qRT-PCR พบว่า การแสดงออกของโปรตีน ALKBH5, FOXM1 และ NANOG เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ตัดต่อยาเคมีบำบัดเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ยังไม่รับยาเคมีบำบัด โดยมีโปรตีน human DEAD-box RNA helicase (DDX3) ไปควบคุมการแสดงออกของ ALKBH5 ให้ไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน FOXM1 และ NANOG ทำให้การแสดงออกของโปรตีน FOXM1 และ NANOG เพิ่มขึ้น ส่งเสริมให้มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาตัดต่อยาเคมีบำบัด แต่ไม่มีการศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ	(28)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง
2. วิธีการทดลอง
3. การเก็บรวบรวมข้อมูล
4. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การกำหนดประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง

คำนวณจำนวนกลุ่มตัวอย่างโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป G*Power เวอร์ชัน 3.1.9.4⁽⁷⁰⁾ กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 และค่าขนาดอิทธิพล (effect size) ตามการประมาณค่าขนาดอิทธิพลของ Cohen ที่ได้กำหนดไว้เป็น 0.40⁽⁷¹⁾ เมื่อคำนวณด้วยโปรแกรมแล้วได้ค่าจำนวนประชากรทั้งหมดเป็น 102 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มตัวอย่าง จึงได้จำนวนกลุ่มตัวอย่างเป็นกลุ่มละ 34 ตัวอย่าง และจากการกำหนดจำนวนกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม โดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Lekshmy และคณะ ในปี 2020 ที่มีกลุ่มตัวอย่างที่ใกล้เคียงกับการศึกษานี้⁽⁷²⁾ จึงกำหนดจำนวนกลุ่มตัวอย่าง ดังนี้

1. ขึ้นเนื้อเยื่อปกติและไม่มีการอักเสบ สำหรับเป็นกลุ่มควบคุมจำนวน 20 ตัวอย่าง
2. ขึ้นเนื้อเยื่อโรคอีพิทีเลียลดีสเพลเซีย จำนวน 20 ตัวอย่าง
3. ขึ้นเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดสควamous คาร์ซิโนมา จำนวน 20 ตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา

แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. ขึ้นเนื้อเยื่อศึกษา
 - 1.1 ขึ้นเนื้อเยื่ออีพิทีเลียลดีสเพลเซีย จำนวน 20 ตัวอย่าง
 - 1.2 ขึ้นเนื้อเยื่อมะเร็งชนิดสควamous คาร์ซิโนมา จำนวน 20 ตัวอย่าง

เกณฑ์การคัดเลือก คือ ขึ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาว่าเป็นอีพิทีเลียลดีสเพลเซีย และมะเร็งชนิดสควamous คาร์ซิโนมา ตามเกณฑ์ของ

องค์การอนามัยโลก ปี ค.ศ. 2017 ⁽⁴⁾ โดยเป็นชั้นเนื้อในบลิ๊อคพาราฟินที่อยู่ในคลังของแผนกพยาธิวิทยาของปากคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ระหว่างปี พ.ศ. 2553 ถึง 2563

เกณฑ์การคัดออก คือ ชั้นเนื้อเยื่อไม่สมบูรณ์ คือไม่สามารถเห็นชั้นเยื่อบุผิวได้

2. กลุ่มควบคุม ชั้นเนื้อเยื่อปกติและไม่มีการอักเสบ จำนวน 20 ตัวอย่าง

เกณฑ์การคัดเข้า คือ ชั้นเนื้อเยื่อปกติที่ได้มาจากผู้ป่วยที่มาจากการศึกษาเรื่อง การแสดงออกของคาเทปซินและตัวยับยั้งโปรติเอสในรอยโรคไลเคนแพลันัสในช่องปากเมื่อตรวจ ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemical expression of cathepsin and its protease inhibitor in oral lichen planus) ซึ่งได้รับการรับรองจริยธรรมงานวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่รับรอง DENTSWU-EC08/2560

เกณฑ์การคัดออก คือ ชั้นเนื้อเยื่อไม่สมบูรณ์ คือไม่สามารถเห็นชั้นเยื่อบุผิวได้

การศึกษานี้ได้รับการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ หมายเลขรับรอง SWUEC/X-463/2563 และ SWUEC/X-031/2565

2. วิธีการทดลอง

การศึกษาจะเป็นการนำชิ้นเนื้อที่ถูกเก็บในพาราฟินมาย้อมสีด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อดู

1. รูปแบบลักษณะการติดสี (pattern of expression)
2. ร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี (% cell positivity)
3. ความเข้มของการย้อมติดสี (intensity)
4. คะแนนฮิสโตเคมี (histochemical scoring หรือ H-score)

และนำมาวิเคราะห์ผล โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการคัดเลือกชิ้นเนื้อรอยโรคที่ผิดปกติที่เลือกติดสไลด์ และมะเร็งชนิดสควamous คาร์ซิโนมา จากในคลังข้อมูลชิ้นเนื้อของแผนกทันตพยาธิวิทยา โดยเป็นชิ้นเนื้อที่ได้จากทั้งใน คณะทันตแพทยศาสตร์และชิ้นเนื้อที่ส่งมาจากภายนอกคณะ สืบค้นย้อนหลังตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ถึง 2563 รวมถึงข้อมูลประกอบการส่งชิ้นเนื้อของทันตแพทย์ผู้ส่งตรวจ ซึ่งผู้วิจัยได้มาจาก ใบส่งตรวจทางพยาธิวิทยา

2. ทำการคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อปกติที่ได้มาจากผู้ป่วยจากการศึกษาเรื่องการแสดงออกของคาเทปซินและตัวยับยั้งโปรติเอสในรอยโรคไลเคนแพลนัสในช่องปากเมื่อตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (เลขที่รับรอง DENTSWU-EC08/2560)

3. ทำการย้อมชิ้นเนื้อจากประชากรกลุ่มต่าง ๆ ตามที่ได้กำหนดจำนวนไว้ เพื่อดูการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

4. รวบรวมข้อมูล แปลผลและทำการวิเคราะห์ข้อมูล

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. สไลด์ชนิด glass slide coated (FLEX IHC Microscope slide, HAD, China)
2. กระจกปิดสไลด์ หรือ cover slip (HAD, China)
3. ช่องเก็บความชื้น (humidity chamber)
4. ขวดขนาด 1,000 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร
5. เครื่องอบสไลด์ (Shandong Sito Biotechnology Co.Ltd, China)
6. ไมโครเวฟ (Samsung, South korea)
7. โถย้อมสไลด์ (Staining jar with rack)
8. กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (Motic, China)
9. ปากกา (DAKO: S2002, Glostrup, Denmark)
10. อุปกรณ์เบ็ดเตล็ด เช่น ปิเปต เทปติดฉลาก กระดาษชำระ และอื่น ๆ

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. Xylene (Pharmco-Aaper, USA)
2. Absolute ethanol (Sigma, USA)
3. Rabbit monoclonal Anti-FTO antibody [EPR6895] (ab124892, Abcam, Inc., UK)
4. Rabbit monoclonal Anti-ALKBH5 antibody (ab244296, Abcam, Inc., UK)
5. Tri-sodium citrate dihydrate 99% (Loba Chemie, India)
6. Tween 20 (Sigma, USA)
7. ชุดย้อม Envision (DAKO Omnis, Denmark)
8. Tris base (Sigma, USA)
9. NaCl (Sigma, USA)
10. Bovine serum albumin หรือ BSA (Sigma, USA)
11. สีย้อม Hematoxylin (Leica Biosystems, Canada)

12. Bio Mount HM (BioOptica, Italy)

ขั้นตอนการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

1. ขั้นตอนการเตรียมสารเคมี

1.1 เตรียม sodium citrate buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (sodium citrate และ 0.05% Tween 20 ที่มีค่า pH เท่ากับ 6.0) โดยใช้สาร Tri-sodium citrate 2.94 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นใช้ HCl 1 N เพื่อปรับค่า pH ให้ Tween 0.5 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 เตรียม Tris/EDTA buffer 50x ที่มีค่า pH เท่ากับ 9.0 โดยผสม Envision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (DAKO K8004) กับน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:49 โดยเตรียมสารให้ได้ปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.3 เตรียม wash buffer 20x โดยผสม Envision™ FLEX wash buffer (DAKO S3006) กับน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:19 โดยเตรียมสารให้ได้ปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

1.4 เตรียม Envision™ FLEX Substrate Working Solution (DAKO K3468) โดยนำ Envision™ FLEX Substrate buffer (SM803) 1 มิลลิลิตรมาผสมกับ Envision™ FLEX DAB ผสม chromogen (DM827) 1 หยด ปิดฝาผสมให้เข้ากัน

1.5 เตรียม Tris-Buffered Saline – Tween 20 (TBS-T) โดยนำ Tris base 1.51 กรัม ผสมกับ NaCl 4.38 กรัม ทำละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร ใช้ HCl 1 N เพื่อปรับค่า pH เป็น 7.4 จะได้สารละลาย TBS จากนั้นหยด Tween 20 ปริมาณ 50 ไมโครลิตรลงใน TBS 100 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จะได้เป็นสารละลาย TBS-T ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.05 จากนั้นใส่ BSA 5 กรัม ผสมให้เข้ากันจะได้เป็น BSA ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ใน TBS-T

2. การเตรียมสไลด์

2.1 ตัดชิ้นเนื้อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มรอยโรคที่ฝังอยู่ในพาราฟินให้มีความหนา 4 ไมโครเมตร บนสไลด์ชนิด glass slide coated จากนั้นนำสไลด์ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

2.2 นำสไลด์ที่ผ่านการอบแล้วไปเข้าขั้นตอนการละลายพาราฟินออก (deparaffinization) และการเติมน้ำ (rehydration) โดยแช่ในไซลีน (xylene) 3 ภาชนะ ภาชนะละ 3 นาที จากนั้นนำมาจุ่มในเอทานอล 95% (ethanol) 3 ภาชนะ ภาชนะละ 10 ครั้ง แล้วนำมาแช่น้ำประปา โดยเปิดให้น้ำประปาไหลผ่าน 2-3 นาที

3. Microwave method

3.1 นำ citrate buffer ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีค่า pH เท่ากับ 6.0 (กรณีที่ใช้ Anti-ALKBH5 antibody ในการย้อม) หรือนำ Tris/EDTA buffer ที่มีค่า pH เท่ากับ 9.0 (กรณีที่ใช้ Anti-FTO antibody ในการย้อม) โดยเตรียมปริมาตรรวม 300 มิลลิลิตร มาให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ 700 วัตต์จนเดือดเป็นเวลา 3 นาที

3.2 นำสไลด์ที่เตรียมไว้เรียงใส่ใน rack แล้วแช่ใน citrate buffer หรือ Tris/EDTA buffer ที่ทำการให้ความร้อนไว้แล้วในขั้นตอน 3.1 จากนั้นนำไปให้ความร้อนอีกครั้งด้วยไมโครเวฟ 700 วัตต์ เป็นเวลา 10 นาที

3.3 เมื่อครบ 10 นาที นำภาชนะออกมาพักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที (cool down) แล้วนำมาแช่น้ำประปา โดยเปิดให้น้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที

4. Block endogenous peroxidase activity

4.1 นำสไลด์ที่เตรียมเสร็จจากขั้นตอนที่ 3 สะบัดน้ำให้หมด แล้วนำมาเรียงใส่ช่องเก็บความชื้น โดยเติมน้ำในช่องเก็บความชื้นเล็กน้อย

4.2 หยด Peroxidase blocking (DAKO S2023, Denmark) แล้วปิดฝาช่องเก็บความชื้น จับเวลาทิ้งไว้ 5 นาที

4.3 เมื่อครบ 5 นาทีนำสไลด์มาสะบัดเพื่อให้ peroxidase blocking ออก แล้วเรียงใส่ใน rack นำมาผ่านน้ำประปานาน 5 นาที

4.4 จากนั้นนำสไลด์มาล้างด้วย wash buffer (DAKO S3006, Denmark) โดยจุ่มขึ้นลง 10 ครั้งแล้วเททิ้ง เติมน้ำ wash buffer ลงไปใหม่แช่ทิ้งไว้ 5 นาที เก็บ wash buffer ที่ใช้แล้วไว้ไม่ต้องทิ้ง

5. Block nonspecific background

5.1 นำสไลด์มาสะบัด wash buffer ออกจากสไลด์จนหมด และเช็ดตามขอบสไลด์โดยรอบชั้นเนื้อ ใช้ปากกา (DAKO S2002, Denmark) วรอบชั้นเนื้อและเรียงสไลด์ใส่ช่องเก็บความชื้น โดยระวังอย่าให้สไลด์แห้ง

5.2 จากนั้นหยด protein block (5% BSA ใน TBS-T) ให้พอกทั่วชั้นเนื้อ ปิดฝาช่องเก็บความชื้น ทิ้งไว้นาน 10 นาที

6. Antibody application

6.1 สะบัด protein block จากสไลด์ให้หมด ๆ ชับน้ำตรงขอบที่วางปากกาเรียงสไลด์ใส่ในช่องเก็บความชื้น ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง และหยดสาร primary antibody คือ Anti-FTO antibody ที่ความเข้มข้น 1: 100 หรือ Anti-ALKBH5 antibody ที่ความเข้มข้น 1: 1000

ลงบนสไลด์ให้ท่วมชิ้นเนื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง)

6.2 เมื่อครบเวลาให้เคาะ primary antibody ออกแล้วเรียงสไลด์ใส่ใน rack ล้างด้วย wash buffer ที่เตรียมไว้จากขั้นตอนที่ 4.4 จุ่มสไลด์ขึ้นลง 10 ครั้งแล้วเท wash buffer ที่จุ่มจากนั้นล้างสไลด์โดยการแช่ใน wash buffer ใหม่อีก 2 ครั้ง ครึ่งละ 3 นาที แล้วเก็บ wash buffer ครั้งสุดท้ายนี้ไว้

6.3 สะบัด wash buffer ออกจากสไลด์ ชับน้ำตรงขอบที่วางปากกา เรียงสไลด์ใส่ในช่องเก็บความชื้น โดยระวังอย่าให้สไลด์แห้ง

6.4 หยด Envision™ FLEX HRP (SM802, Denmark) แคปพอท่วมสไลด์ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

6.5 ล้างสไลด์ด้วย wash buffer ที่เก็บไว้ในขั้นตอนที่ 5.2 จุ่มขึ้นลง 10 ครั้งแล้วเท wash buffer ที่จุ่มจากนั้นล้างสไลด์โดยการแช่ใน wash buffer ใหม่อีก 2 ครั้ง ครึ่งละ 3 นาที แล้วเท wash buffer ที่ทิ้งไป

7. Color development

7.1 สะบัดสไลด์ ชับน้ำตรงขอบที่วางปากกา เรียงสไลด์ใส่ในช่องเก็บความชื้น จากนั้นใช้ปิเปตพลาสติกหยดสาร Envision™ FLEX Substrate Working Solution (DAKO K3468, Denmark) พอท่วมสไลด์ ปิดฝาช่องเก็บความชื้น โดยระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศบนสไลด์ จับเวลาทิ้งไว้ 5 นาที

7.2 เรียงสไลด์ใส่ใน rack จากนั้นเปิดให้น้ำประปาไหลผ่านอย่างน้อย 5 นาที เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา

7.3 ทำ counterstain ด้วยการนำสไลด์มาจุ่มในอีมาทอกซิลิน (hematoxylin) 2-3 ครั้ง แล้วเปิดให้น้ำประปาไหลผ่านสไลด์เป็นเวลา 5 นาที

7.4 หลังจากผ่านน้ำประปาแล้วจึงมาทำกระบวนการไล่น้ำออก (dehydration) โดยจุ่มในเอทานอล 95% จำนวน 2 ภาชนะ ภาชนะละ 10 ครั้ง แล้วจุ่มใน absolute ethanol จำนวน 2 ภาชนะ ภาชนะละ 10 ครั้ง จากนั้นจุ่มในไซลีน จำนวน 3 ภาชนะ ภาชนะละ 10 ครั้ง เช้นกัน สะบัดสไลด์ให้หมดแล้วนำกระจกปิดสไลด์มาปิด

3. การเก็บรวบรวมข้อมูล

วิธีเก็บข้อมูล

ทำการเก็บข้อมูลเพศ อายุ และตำแหน่งที่ตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างในทั้ง 3 กลุ่ม และวัดผลการแสดงออกของ FTO หรือ ALKBH5 โดยการเก็บข้อมูลด้วยการถ่ายภาพจากสไลด์ของชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (Motic, China) ที่เลนส์กำลังขยายขนาด 100 เท่า โดยในการนับจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO หรือ ALKBH5 แต่ละชิ้นเนื้อตัวอย่างจะต้องผ่านการนับจำนวนเซลล์อย่างน้อย 1,000 เซลล์ต่อสไลด์ของชิ้นเนื้อ โดยใช้โปรแกรม ImageJ Fiji โดยเซลล์ที่จะถือว่ามี การแสดงออก คือ เซลล์ที่ติดสีน้ำตาลบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ในชั้นเยื่อหุ้ม การแปลผลจะทำการศึกษารูปแบบการติดสี นับจำนวนเซลล์ที่ติดสียอม FTO หรือ ALKBH5 ศึกษาความเข้มของการติดสี และคะแนนฮีสโตเคมี และทำการบันทึกผลเป็นตารางข้อมูล โดยมีรายละเอียดดังนี้

การแปลผล

1. รูปแบบลักษณะการติดสี

แปลผลโดยการบรรยายรูปแบบการติดสีของ FTO และ ALKBH5 ของชิ้นเนื้อทั้ง 3 กลุ่ม คือ ชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา มาเปรียบเทียบกัน

2. ร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี

แปลผลโดยการนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี FTO และ ALKBH5 นำมาคิดเป็นร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสี แล้วนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละจำนวนเซลล์ที่ติดสี FTO และ ALKBH5 ระหว่าง 3 กลุ่ม คือ ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา

3. ความเข้มของการย้อมติดสี

แปลผลโดยการกำหนดคะแนนระดับความเข้มสีที่พบ ดังนี้

คะแนน 0 = ไม่ติดสี

คะแนน 1 = ติดสีที่ระดับความเข้มน้อย

คะแนน 2 = ติดสีที่ระดับความเข้มปานกลาง

คะแนน 3 = ติดสีที่ระดับความเข้มรุนแรง

นำคะแนนระดับความเข้มของการติดสีของ FTO และ ALKBH5 มาเปรียบเทียบกันใน 3 กลุ่ม คือ ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา

4. คะแนนฮีสโตเคมี

คำนวณได้จากผลรวมของผลคูณของค่าระดับความเข้ม (มีค่า 0, 1, 2, และ 3) และค่าร้อยละของเซลล์ที่ติดสีในแต่ละระดับความเข้มขั้นนั้นๆ โดย H-score จะมีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0 ถึง 300 คะแนน โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้⁽⁷²⁾

คะแนนฮีสโตเคมี = $(0 \times \text{ร้อยละของเซลล์ที่ไม่ติดสี}) + (1 \times \text{ร้อยละของเซลล์ที่ติดสีที่ระดับความเข้มน้อย}) + (2 \times \text{ร้อยละของเซลล์ที่ติดสีที่ระดับความเข้มปานกลาง}) + (3 \times \text{ร้อยละของเซลล์ที่ติดสีที่ระดับความเข้มมาก})$

แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และแปลผลโดยนำมาเปรียบเทียบกับกัน 3 กลุ่ม คือ ในชั้นเนื้อเยื่อปกติ ชั้นเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ และชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา

การเก็บข้อมูลและการแปลผลดังกล่าวจะทำโดยผู้ทำวิจัยที่ได้รับการฝึกการอ่านผลทางจุลพยาธิวิทยาจำนวน 1 คน ซึ่งผ่านการทดสอบค่าความเชื่อมั่นระหว่างผู้วิจัยกับทันตแพทย์เฉพาะทางด้านพยาธิวิทยา โดยคำนวณจากค่าสัมประสิทธิ์สหพันธ์ภายในชั้น (Intraclass correlation coefficient; ICC) กรณีเป็นข้อมูลชนิดต่อเนื่อง คือ ร้อยละของเซลล์ที่ย้อมติดสีและคะแนนฮีสโตเคมี และคำนวณจากค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา (Cohen's Kappa) กรณีเป็นข้อมูลชนิดไม่ต่อเนื่อง คือ ความเข้มของการย้อมติดสี

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

แบ่งเป็น 2 ส่วน

1. วิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistic) อธิบายรูปแบบการติดสีของ FTO และ ALKBH5 ของชั้นเนื้อเยื่อทั้ง 3 กลุ่ม คือ ชั้นเนื้อเยื่อปกติ ชั้นเนื้อเยื่อผิดปกติ และชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา มาเปรียบเทียบกับ

2. วิเคราะห์เชิงปริมาณ

2.1 ข้อมูลทั่วไปของประชากรที่ศึกษา โดยใช้สถิติ Chi-square test ในการวิเคราะห์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของเพศของประชากรในกลุ่มเนื้อเยื่อปกติ กลุ่มเนื้อเยื่อผิดปกติ และกลุ่มมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา ส่วนอายุ

ของประชากร ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ในการวิเคราะห์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของอายุของประชากรทั้ง 3 กลุ่ม

2.2 จำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดีสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย นำข้อมูลไปตรวจสอบหาการแจกแจงข้อมูลว่ามีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ โดยใช้ Shapiro-Wilk test ถ้าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสี FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่ม โดยใช้สถิติ One way ANOVA แต่หากข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ นำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Kruskal-Wallis test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง และใช้สถิติ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่าง

2.3 ความเข้มของการย้อมติดสีของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดีสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา แสดงข้อมูลเป็นร้อยละและความถี่ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างความเข้มของการย้อมติดสีของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่ม ลักษณะข้อมูลที่ได้เป็นมาตราอันดับ (Ordinal Scale) จึงใช้สถิติ Kruskal-Wallis test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง

2.4 คะแนนฮีสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดีสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย นำข้อมูลไปตรวจสอบหาการแจกแจงข้อมูลว่ามีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ ถ้าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างคะแนนฮีสโตเคมี ของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่ม โดยใช้สถิติ One way ANOVA แต่หากข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ นำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Kruskal-Wallis test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง และใช้สถิติ Dunn's multiple comparison test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่มตัวอย่าง

2.5 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดีสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา นำข้อมูลไปตรวจสอบหาการแจกแจงข้อมูลว่ามีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ ถ้าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FTO และ

ALKBH5 โดยใช้ Pearson correlation coefficient แต่หากข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ นำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Spearman's rank correlation coefficient และมีเกณฑ์ในการแปลความหมายค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ดังนี้⁽⁷³⁾

r มีค่าตั้งแต่ 0.8 ขึ้นไป แปลว่า มีความสัมพันธ์กันในระดับสูงมาก

r มีค่าระหว่าง 0.6 ถึง 0.799 แปลว่า มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง

r มีค่าระหว่าง 0.4 ถึง 0.599 แปลว่า มีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง

r มีค่าระหว่าง 0.2 ถึง 0.399 แปลว่า มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ

r มีค่าระหว่าง 0.001 ถึง 0.199 แปลว่า มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำมาก

โดยสถิติทั้งหมดคำนวณที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม

GraphPad Prism เวอร์ชัน 9 (GraphPad Software, USA)



บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรที่ศึกษา

กลุ่มประชากรที่ศึกษาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัวอย่าง โดยสัดส่วนประชากรเพศชายต่อเพศหญิงในกลุ่มเนื้อเยื่อปกติ กลุ่มอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และกลุ่มมะเร็งช่องปาก ชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา คิดเป็น 1.5:1 , 1:1.5 และ 4:1 ตามลำดับ อายุเฉลี่ยของกลุ่มเนื้อเยื่อปกติ กลุ่มอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และกลุ่มมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา คิดเป็น 35.05 ± 13.24 ปี, 57.65 ± 12.40 ปี และ 64.30 ± 14.68 ปี ตามลำดับ โดยอายุเฉลี่ยของกลุ่มอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และกลุ่มมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมามีค่าใกล้เคียงกัน แต่ในกลุ่มเนื้อเยื่อปกติมีอายุเฉลี่ยต่ำกว่าอีก 2 กลุ่ม จากการเปรียบเทียบทั้งสามกลุ่มประชากรพบว่าอายุเฉลี่ยและเพศของประชากรทั้งสามกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตำแหน่งที่ทำการตัดชิ้นเนื้อ ในกลุ่มเนื้อเยื่อปกติ ได้แก่ เหงือก 15 ราย (ร้อยละ 75) และเยื่อข้างแก้ม 5 ราย (ร้อยละ 25) ส่วนในกลุ่มอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย ได้แก่ ลิ้น 11 ราย (ร้อยละ 55), เพดานปาก 4 ราย (ร้อยละ 20), เยื่อข้างแก้ม 3 ราย (ร้อยละ 15) และเหงือก 2 ราย (ร้อยละ 10) และกลุ่มมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา ได้แก่ เหงือก 10 ราย (ร้อยละ 50), ลิ้น 4 ราย (ร้อยละ 20), เพดานปาก 3 ราย (ร้อยละ 15), เยื่อข้างแก้ม 2 ราย (ร้อยละ 10) และพื้นช่องปาก 1 ราย (ร้อยละ 5)

ในกลุ่มอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย มีลักษณะทางจุลพยาธิเป็นอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย จำนวน 10 ราย (ร้อยละ 50) ซึ่งจัดเป็นอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย (low grade epithelial dysplasia) และเป็นอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับปานกลางถึงอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรง จำนวน 10 ราย (ร้อยละ 50) ซึ่งจัดเป็นอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรง (high grade epithelial dysplasia) สำหรับกลุ่มมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มีลักษณะทางจุลพยาธิเป็น Well-differentiated SCC จำนวน 16 ราย (ร้อยละ 80) และเป็น Moderate-differentiated SCC จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 20) ส่วนขนาดของก้อนมะเร็ง (tumor size) มีขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 เซนติเมตร จำนวน 11 ราย (ร้อยละ 55) และมีขนาดมากกว่า 2 ถึง 4 เซนติเมตร จำนวน 9 ราย (ร้อยละ 45)

ตาราง 4 ข้อมูลทั่วไปของประชากรที่ศึกษา

ตัวแปร	ชั้นเนื้อเยื่อ ปกติ (n=20)	ชั้นเนื้ออีพิทีเลียล ดิสเพลเซีย (n=20)	ชั้นเนื้อมะเร็งช่องปาก ชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา (n=20)	p-value
เพศ (ชาย, ร้อยละ)				0.0357
ชาย	12 (60)	8 (40)	16 (80)	
หญิง	8 (40)	12 (60)	4 (20)	
อายุ (ปี)				< 0.0001
ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	35.05 $\pm$ 13.24	57.65 $\pm$ 12.40	64.30 $\pm$ 14.68	
ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด (ปี)	21 - 64	31 - 82	41 - 83	
ตำแหน่งที่ตัดชิ้นเนื้อ (ชาย, ร้อยละ)				
เหงือก	15 (75)	2 (10)	10 (50)	-
ลิ้น	0 (0)	11 (55)	4 (20)	-
เพดานปาก	0 (0)	4 (20)	3 (15)	-
เยื่อข้างแก้ม	5 (25)	3 (15)	2 (10)	-
พื้นช่องปาก	0 (0)	0 (0)	1 (5)	-
ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ อีพิทีเลียลดิสเพลเซีย (ชาย, ร้อยละ)				
ระดับน้อย (Mild)	-	10 (50)	-	-
ระดับปานกลางถึงรุนแรง (Moderate to severe)	-	10 (50)	-	-
ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของ มะเร็งช่องปากชนิด สความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา (ชาย, ร้อยละ)				
Well-differentiated	-	-	16 (80)	-
Moderate-differentiated	-	-	4 (20)	-

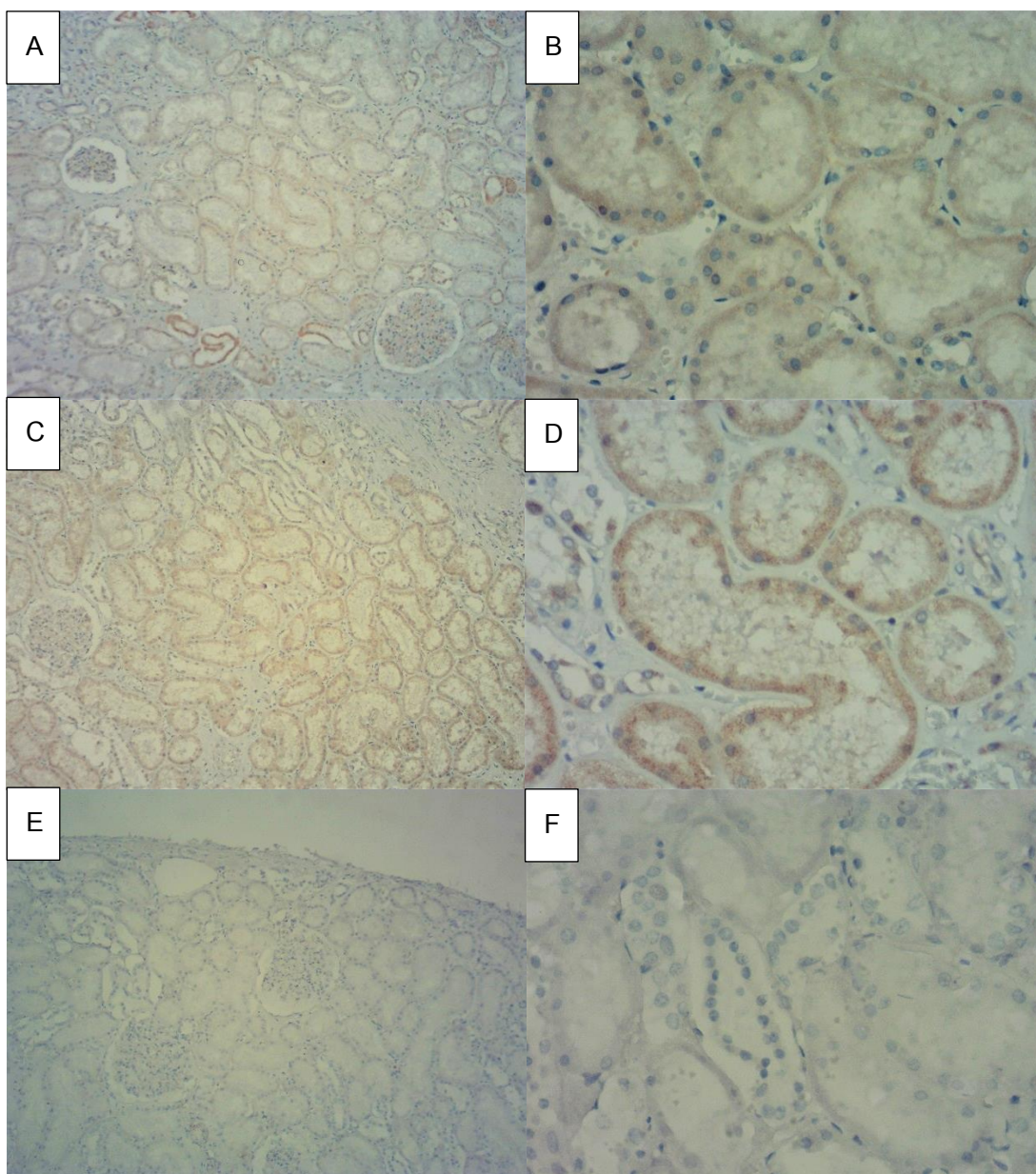
ตาราง 4 (ต่อ)

ตัวแปร	ชิ้นเนื้อเยื่อ ปกติ (n=20)	ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียล ดิสเพลเซีย (n=20)	ชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปาก ชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา (n=20)	p-value
ขนาดก้อนมะเร็ง (ราย, รอยละ)				
≤ 2 ซม.	-	-	11 (55)	-
> 2 ถึง ≤ 4 ซม.	-	-	9 (45)	-

การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5

การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในเนื้อเยื่อไต

การศึกษานี้ใช้เนื้อเยื่อไต (human kidney tissue) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) พบว่าการแสดงออกของ FTO (ภาพประกอบ 3A และ 3B) และ ALKBH5 (ภาพประกอบ 3C และ 3D) ในเนื้อเยื่อไตมีลักษณะการติดสีเป็นจุดเล็ก ๆ และติดสีกระจายอยู่ทั่วไปในไซโทพลาซึมของเซลล์ที่อาศัยอยู่ในแต่ละท่อของเนื้อเยื่อไต และทำการย้อมในชิ้นเนื้อเยื่อไตโดยไม่ใส่แอนติบอดีต่อ FTO และ ALKBH5 เพื่อเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) ซึ่งไม่พบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อไตดังกล่าว (ภาพประกอบ 3E และ 3F)



ภาพประกอบ 3 ลักษณะการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในเนื้อเยื่อไต

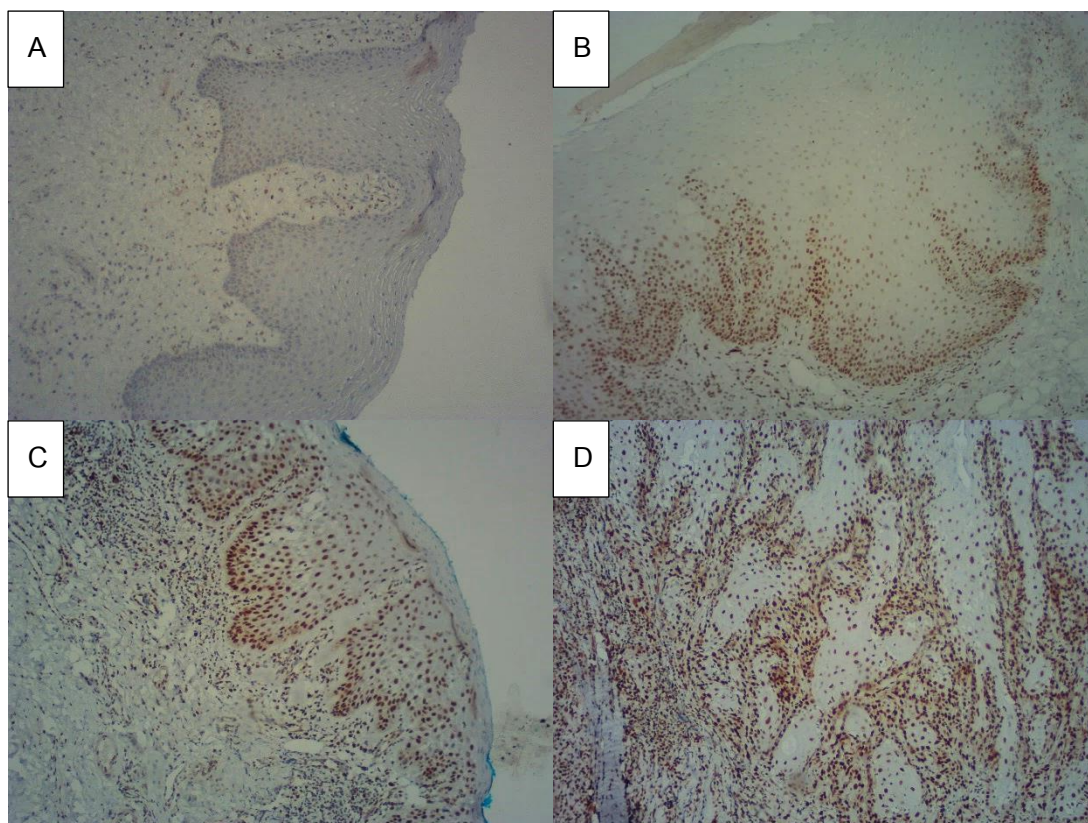
ภาพ A และ B แสดงชิ้นเนื้อเยื่อไตที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ FTO ภาพ C และ D แสดงชิ้นเนื้อเยื่อไตที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ ALKBH5 ส่วนภาพ E และ F แสดงชิ้นเนื้อเยื่อไตที่ย้อมโดยไม่ใส่แอนติบอดีต่อ FTO และ ALKBH5 (ภาพ A, C และ E กำลังขยาย 100 เท่า, ภาพ B, D และ F กำลังขยาย 400 เท่า)

การแสดงออกของ FTO ในชั้นเนื้อเยื่อปกติ รอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียและ รอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา

จากการศึกษาพบการแสดงออกของ FTO ในเนื้อเยื่อปกติ จำนวน 12 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60 โดยพบการแสดงออกของ FTO ติดสีในชั้นเยื่อบุผิวเท่านั้น การติดสีมีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ ส่วนมากจะติดสีจางและติดสีเฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิว (ภาพประกอบ 4A)

ในชั้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียพบการแสดงออกของ FTO ในทุกตัวอย่างชั้นเนื้อคิดเป็นร้อยละ 100 โดยพบว่าในชั้นเยื่อบุผิวมีการติดสีเป็นจุดเล็ก ๆ ส่วนมากติดสีระดับปานกลางและติดสีเฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิว โดยพบการติดสีที่ระดับความเข้มที่มากขึ้นและหนาแน่นขึ้นในชั้นที่ติดกับชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หรือชั้นเบซัลเซลล์ (basal cell layer) และพบการติดสีจางลงในชั้นที่อยู่สูงขึ้นไปหรือชั้นสไปนัส (spinous layer) นอกจากนี้ในชั้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียที่มีลักษณะทางจุลพยาธิเป็นอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย จะมีการติดสีในระดับความเข้มที่จางกว่าและหนาแน่นน้อยกว่า (ภาพประกอบ 4B) แต่ในชั้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับปานกลางถึงรุนแรงจะพบการติดสีที่ระดับความเข้มที่มากกว่าหนาแน่นมากกว่าและติดสีเกือบทุกชั้นในชั้นเยื่อบุผิวเมื่อเปรียบเทียบกับในชั้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย (ภาพประกอบ 4C)

ในชั้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาพบการแสดงออกของ FTO ในทุกตัวอย่างชั้นเนื้อ คิดเป็นร้อยละ 100 โดยพบการติดสีในชั้นเนื้อเยื่อบุผิว ลักษณะการติดสีเป็นจุดเล็ก ๆ ส่วนมากพบติดสีระดับความเข้มรุนแรง และติดเกือบทุกเซลล์ของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติ โดยติดสีเฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์ (ภาพประกอบ 4D)



ภาพประกอบ 4 ลักษณะการแสดงออกของ FTO ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ
ชิ้นเนื้ออีพิทิลีเยลิสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา

ภาพ A แสดงชิ้นเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ FTO ภาพ B แสดงชิ้นเนื้ออีพิทิลีเยลิสเพลเซียระดับน้อยที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ FTO ภาพ C แสดงชิ้นเนื้ออีพิทิลีเยลิสเพลเซียระดับปานกลางถึงรุนแรงที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ FTO และภาพ D แสดงชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ FTO (กำลังขยาย 100 เท่า)

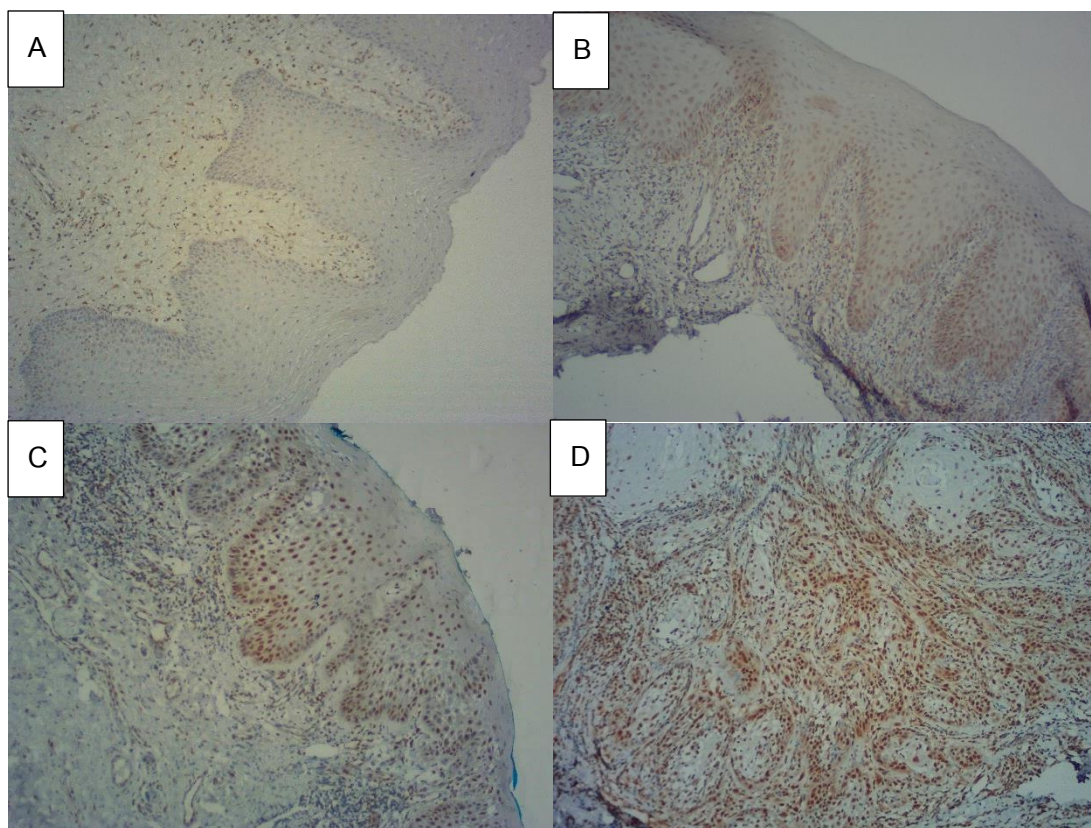
การแสดงออกของ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ รอยโรคอีพิทิลีเยลิสเพลเซีย และรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา

จากการศึกษาพบการแสดงออกของ ALKBH5 มีแนวโน้มการแสดงออกแบบเดียวกับของ FTO โดยในเนื้อเยื่อปกติพบการแสดงออกของ ALKBH5 จำนวน 10 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20

ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50 โดยพบการแสดงออกของ ALKBH5 ติดสีในชั้นเยื่อบุผิวเท่านั้น การติดสีมีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ ส่วนมากจะติดสีจางและติดสีเฉพาะในนิวเคลียสของ เซลล์เยื่อบุผิว (ภาพประกอบ 5A)

ในชั้นเนื้ออีพิทีเลียลติสเฟลเซียพบการแสดงออกของ ALKBH5 ในทุกตัวอย่างชั้นเนื้อ คิดเป็นร้อยละ 100 โดยพบว่าในชั้นเยื่อบุผิวมีการติดสีเป็นจุดเล็ก ๆ ส่วนมากติดสีระดับปานกลาง และติดสีเฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิว โดยพบการติดสีที่ระดับความเข้มที่มากขึ้นและหนาแน่นขึ้นในชั้นที่ติดกับชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หรือชั้นเบซัลเซลล์ และพบการติดสีจางลงในชั้นที่อยู่สูงขึ้นไปหรือชั้นสไปนัส นอกจากนี้ในชั้นเนื้ออีพิทีเลียลติสเฟลเซียที่มีลักษณะทางจุลพยาธิเป็น อีพิทีเลียลติสเฟลเซียระดับน้อย จะมีการติดสีในระดับความเข้มที่จางกว่าและหนาแน่นน้อยกว่า (ภาพประกอบ 5B) แต่ในชั้นเนื้ออีพิทีเลียลติสเฟลเซียระดับปานกลางถึงรุนแรงจะพบการติดสีที่ระดับความเข้มที่มากกว่า หนาแน่นมากกว่าและติดสีเกือบทุกชั้นในชั้นเยื่อบุผิวเมื่อเปรียบเทียบกับในชั้นเนื้ออีพิทีเลียลติสเฟลเซียระดับน้อย (ภาพประกอบ 5C)

ในชั้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาพบการแสดงออกของ ALKBH5 ในทุกตัวอย่างชั้นเนื้อ คิดเป็นร้อยละ 100 โดยพบการติดสีในชั้นเนื้อเยื่อบุผิว ลักษณะการติดสีเป็นจุดเล็ก ๆ ส่วนมากพบติดสีระดับความเข้มรุนแรง และติดเกือบทุกเซลล์ของ เซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติ โดยติดสีเฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์ (ภาพประกอบ 5D)



ภาพประกอบ 5 ลักษณะการแสดงออกของ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ
ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดีสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา

ภาพ A แสดงชิ้นเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ ALKBH5 ภาพ B แสดง
ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดีสเพลเซียระดับน้อยที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ ALKBH5 ภาพ C แสดงชิ้นเนื้อ
อีพิทีเลียลดีสเพลเซียระดับปานกลางถึงรุนแรงที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ ALKBH5 และภาพ D
แสดงชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาปกติที่ย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ ALKBH5
(กำลังขยาย 100 เท่า)

ร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5

ร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5

ผลการศึกษาจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลติสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาพบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO เพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยมีค่าเป็น 6.34 ± 9.44 , 41.19 ± 20.71 และ 82.78 ± 17.92 ส่วนจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ALKBH5 พบว่าในชิ้นเนื้อทั้ง 3 กลุ่มมีค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ALKBH5 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับของ FTO โดยมีค่าเป็น 4.03 ± 5.42 , 32.99 ± 16.65 และ 72.45 ± 27.27 ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลติสเพลเซียมีค่ามากกว่าในชิ้นเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา มีค่ามากกว่าในชิ้นเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในขณะเดียวกันค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาก็มีค่ามากกว่าในรอยโรคอีพิทีเลียลติสเพลเซียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ) เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6

ความเข้มของการย้อมติดสี FTO และ ALKBH5

ความเข้มของการย้อมติดสีของ FTO พบว่าในชิ้นเนื้อเยื่อปกติมีความเข้มของการย้อมติดสีส่วนใหญ่เป็นคะแนน 0 คือไม่ติดสี โดยพบจำนวน 8 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40 ในรอยโรคอีพิทีเลียลติสเพลเซียพบความเข้มของการย้อมติดสีส่วนใหญ่เป็นคะแนน 2 คือ ติดสีที่ระดับความเข้มปานกลาง โดยพบจำนวน 9 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 45 ส่วนในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาพบความเข้มของการย้อมติดสีส่วนใหญ่เป็นคะแนน 3 คือ ติดสีที่ระดับความเข้มรุนแรง โดยพบจำนวน 11 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 55 (ตาราง 5)

ความเข้มของการย้อมติดสีของ ALKBH5 พบว่าในชิ้นเนื้อเยื่อปกติมีความเข้มของการย้อมติดสีส่วนใหญ่เป็นคะแนน 0 คือไม่ติดสี โดยพบจำนวน 10 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50 ในรอยโรคอีพิทีเลียลติสเพลเซียพบความเข้มของการย้อมติดสีส่วนใหญ่เป็นคะแนน 2 คือ ติดสีที่ระดับความเข้มปานกลาง โดยพบจำนวน 12 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60 ส่วนในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมาพบความเข้มของการย้อมติดสีส่วนใหญ่เป็นคะแนน 2 คือ ติดสีที่ระดับความเข้มปานกลาง โดยพบจำนวน 11 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 55 (ตาราง 6)

จากผลการศึกษาพบว่าความเข้มของการย้อมติดสีของทั้ง FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่มประชากร มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือมีความเข้มของการย้อมติดสีเพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลติสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมาตามลำดับ โดยคะแนนความเข้มของการย้อมติดสีของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลติสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมาเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

คะแนนฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5

จากผลการศึกษาคะแนนฮิสโตเคมีของ FTO ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลติสเพลเซีย และชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมาพบว่ามีค่าเฉลี่ยคะแนนฮิสโตเคมีของ FTO เพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยมีค่าเป็น 9.73 ± 14.90 , 85.35 ± 51.82 และ 188.38 ± 56.71 ส่วนคะแนนฮิสโตเคมีของ ALKBH5 พบว่าในชิ้นเนื้อทั้ง 3 กลุ่มมีค่าเฉลี่ยคะแนนฮิสโตเคมีของ ALKBH5 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับของ FTO โดยมีค่าเป็น 6.96 ± 10.10 , 61.04 ± 40.97 และ 162.38 ± 70.75 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยคะแนนฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่มประชากรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยค่าเฉลี่ยคะแนนฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลติสเพลเซียมีค่ามากกว่าในชิ้นเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ส่วนในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมาพบว่ามีค่ามากกว่าในชิ้นเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในขณะเดียวกันในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมาก็มีค่ามากกว่าในรอยโรคอีพิทีเลียลติสเพลเซียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$ และ $p < 0.05$) เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6

ตาราง 5 ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮีสโตเคมีของ FTO ในแต่ละกลุ่มประชากร

ตัวแปร	FTO			p-value
	ชั้นเนื้อเยื่อ ปกติ ^a (n=20)	ชั้นเนื้อเยื่อพีทีไลเอล ดิสเพลเซีย ^b (n=20)	ชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปาก ชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา ^c (n=20)	
ร้อยละของจำนวน เซลล์ที่มีการแสดงออก				< 0.0001 ^{abc}
ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน	6.34 $\pm$ 9.44	41.19 $\pm$ 20.71	82.78 $\pm$ 17.92	0.0009 ^{ab}
ความเข้มของการย้อม ติดสี (ราย, ร้อยละ)				< 0.0001 ^{ac}
0 = ไม่ติดสี	8 (40)	0 (0)	0 (0)	0.0043 ^{bc}
1 = ติดสีจาง	7 (35)	3 (15)	1 (5)	
2 = ติดสีปานกลาง	5 (25)	9 (45)	8 (40)	
3 = ติดสีเข้มรุนแรง	0 (0)	8 (40)	11 (55)	
รวม	20 (100)	20 (100)	20 (100)	
คะแนนฮีสโตเคมี				< 0.0001 ^{abc}
ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน	9.73 $\pm$ 14.90	85.35 $\pm$ 51.82	188.38 $\pm$ 56.71	0.0004 ^{ab}
				< 0.0001 ^{ac}
				0.0083 ^{bc}

^a แทนกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อปกติ, ^b แทนกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อพีทีไลเอลดิสเพลเซีย, ^c แทนกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา, ^{ab} แสดงค่า p-value ของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก และคะแนนฮีสโตเคมีของกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อปกติและกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อพีทีไลเอลดิสเพลเซียเปรียบเทียบกันทางสถิติ, ^{ac} แสดงค่า p-value ของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก และคะแนนฮีสโตเคมีของกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อปกติและกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาเปรียบเทียบกันทางสถิติ, ^{bc} แสดงค่า p-value ของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก และคะแนนฮีสโตเคมีของกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อพีทีไลเอลดิสเพลเซียและกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาเปรียบเทียบกันทางสถิติ และ ^{abc} แสดงค่า p-value ของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมสีและคะแนนฮีสโตเคมีของทั้ง 3 กลุ่มเปรียบเทียบกันทางสถิติ

ตาราง 6 ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮีสโตเคมีของ ALKBH5 ในแต่ละกลุ่มประชากร

ตัวแปร	ALKBH5			p-value
	ชั้นเนื้อเยื่อ ปกติ ^a (n=20)	ชั้นเนื้อเยื่อพีทีไลเอล ดิสเพลเซีย ^b (n=20)	ชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปาก ชนิดสควamous คาร์ซิโนมา ^c (n=20)	
ร้อยละของจำนวน เซลล์ที่มีการแสดงออก				< 0.0001 ^{abc}
ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน	4.03 ± 5.42	32.99 ± 16.65	72.45 ± 27.27	0.0005 ^{ab} < 0.0001 ^{ac} 0.0165 ^{bc}
ความเข้มของการย้อม ติดสี (ราย, ร้อยละ)				< 0.0001 ^{abc}
0 = ไม่ติดสี	10 (50)	0 (0)	0 (0)	
1 = ติดสีจาง	5 (25)	6 (30)	1 (5)	
2 = ติดสีปานกลาง	4 (20)	12 (60)	11 (55)	
3 = ติดสีเข้มรุนแรง	1 (5)	2 (10)	8 (40)	
รวม	20 (100)	20 (100)	20 (100)	
คะแนนฮีสโตเคมี				< 0.0001 ^{abc}
ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน	6.96 ± 10.10	61.04 ± 40.97	162.38 ± 70.75	0.0006 ^{ab} < 0.0001 ^{ac} 0.0165 ^{bc}

^a แทนกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อปกติ, ^b แทนกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อพีทีไลเอลดิสเพลเซีย, ^c แทนกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous คาร์ซิโนมา, ^{ab} แสดงค่า p-value ของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก และคะแนนฮีสโตเคมีของกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อปกติและกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อพีทีไลเอลดิสเพลเซียเปรียบเทียบกับทางสถิติ, ^{ac} แสดงค่า p-value ของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก และคะแนนฮีสโตเคมีของกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อปกติและกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous คาร์ซิโนมาเปรียบเทียบกับทางสถิติ, ^{bc} แสดงค่า p-value ของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก และคะแนนฮีสโตเคมีของกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อพีทีไลเอลดิสเพลเซียและกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous คาร์ซิโนมาเปรียบเทียบกับทางสถิติ และ ^{abc} แสดงค่า p-value ของร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมสีและคะแนนฮีสโตเคมีของทั้ง 3 กลุ่มเปรียบเทียบกับทางสถิติ

การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อยและ รอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรง

จากผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรงมีค่ามากกว่าในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย โดยค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO มีค่าเป็น 50.04 ± 24.10 และ 32.33 ± 12.26 ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ALKBH5 มีค่าเป็น 36.27 ± 18.19 และ 29.70 ± 15.16 ตามลำดับ สำหรับการเปรียบเทียบการย้อมติดสีพบว่าความเข้มของการย้อมติดสีของ FTO ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย ส่วนใหญ่เป็นคะแนน 2 (ร้อยละ 50) และในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรง ส่วนใหญ่เป็นคะแนน 2 (ร้อยละ 40) และ 3 (ร้อยละ 40) ส่วนความเข้มของการย้อมติดสีของ ALKBH5 ส่วนใหญ่เป็นคะแนน 2 ทั้งในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย และระดับรุนแรง (ร้อยละ 60) นอกจากนั้นพบว่าค่าเฉลี่ยคะแนนฮีสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรงมีค่ามากกว่าในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย โดยค่าเฉลี่ยคะแนนฮีสโตเคมีของ FTO มีค่าเป็น 100.50 ± 64.74 และ 70.20 ± 31.08 ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยคะแนนฮีสโตเคมีของ ALKBH5 มีค่าเป็น 70.44 ± 49.61 และ 51.64 ± 29.75 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซีย ทั้ง 2 กลุ่มเปรียบเทียบกัน ทั้งร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮีสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 7

ตาราง 7 การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย

แอนติบอดี	ตัวแปร	ชั้นเนื้ออีพิทีเลียล ดิสเพลเซีย ระดับน้อย (low grade OED) (n=10)	ชั้นเนื้ออีพิทีเลียล ดิสเพลเซีย ระดับรุนแรง (high grade OED) (n=10)	P-value
FTO	ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มี			0.0530
	การแสดงออก*			
	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน	32.33 ± 12.26	50.04 ± 24.10	
	มาตรฐาน			
	ความเข้มของการย้อมติดสี			0.7488
	(ราย, ร้อยละ)**			
	0 = ไม่ติดสี	0 (0)	0 (0)	
	1 = ติดสีจาง	1 (10)	2 (20)	
	2 = ติดสีปานกลาง	5 (50)	4 (40)	
	3 = ติดสีเข้มรุนแรง	4 (40)	4 (40)	
	รวม	10 (100)	10 (100)	
ALKBH5	คะแนนฮิสโตเคมี***			0.5288
	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน	70.20 ± 31.08	100.50 ± 64.74	
	มาตรฐาน			
	ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มี			0.3919
	การแสดงออก*			
	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน	29.70 ± 15.16	36.27 ± 18.19	
	มาตรฐาน			
	ความเข้มของการย้อมติดสี			0.1360
	(ราย, ร้อยละ)**			
	0 = ไม่ติดสี	0 (0)	0 (0)	
	1 = ติดสีจาง	4 (40)	2 (20)	
	2 = ติดสีปานกลาง	6 (60)	6 (60)	
	3 = ติดสีเข้มรุนแรง	0 (0)	2 (20)	
	รวม	10 (100)	10 (100)	

ตาราง 7 (ต่อ)

แอนติบอดี	ตัวแปร	ชั้นเนื้อเยื่อที่เลเยล ดิสเพลเซีย ระดับน้อย (low grade OED) (n=10)	ชั้นเนื้อเยื่อที่เลเยล ดิสเพลเซีย ระดับรุนแรง (high grade OED) (n=10)	P-value
ALKBH5	คะแนนฮิสโตเคมี*			0.3177
	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน	51.64 ± 29.75	70.44 ± 49.61	

*ใช้ Unpaired t test วิเคราะห์ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของทั้ง FTO และ ALKBH5 และคะแนนฮิสโตเคมีของ ALKBH5

**ใช้ Chi-square test วิเคราะห์ความเข้มของการติดสีของทั้ง FTO และ ALKBH5

***ใช้ Mann Whitney test วิเคราะห์คะแนนฮิสโตเคมีของ FTO

ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา มีความสัมพันธ์ทางบวกในระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R = 0.6204$, $p < 0.01$) ซึ่งบ่งบอกว่าการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา มีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน แต่ในกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อปกติและกลุ่มชั้นเนื้อเยื่อที่เลเยลดิสเพลเซียนั้น การแสดงออกของ FTO ไม่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ ALKBH5 (ตาราง 8)

ตาราง 8 ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในแต่ละกลุ่มประชากร

แอนติบอดี		ALKBH5	
FTO	ขึ้นเนื้อเยื่อปกติ*	R	0.05063
		P value	0.8321
	ขึ้นเนื้ออวัยวะที่เลี้ยงดิสเพลเซีย**	R	0.05064
		P value	0.8321
	ขึ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์	R	0.6204
		P value	0.0035
	คาร์ซิโนมา**		

* ใช้ Spearman's rank correlation coefficient วิเคราะห์ในกลุ่มขึ้นเนื้อเยื่อปกติ

** ใช้ Pearson correlation coefficient วิเคราะห์ในกลุ่มขึ้นเนื้ออวัยวะที่เลี้ยงดิสเพลเซียและกลุ่มขึ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการแสดงออกของ FTO และการแสดงออกของ ALKBH5 ในรอยโรคกับในเนื้อเยื่อปกติ ด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยแบ่งหัวข้อการสรุปผลได้ดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้พบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มากกว่าในเนื้อเยื่อปกติ โดยรูปแบบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 มีแนวโน้มการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน สำหรับร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนนฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในชั้นเนื้อเยื่อปกติ ชั้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และชั้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาพบว่ามีความเพิ่มขึ้นตามลำดับ ดังนี้

1) ค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่มประชากร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มีค่ามากกว่าในเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในขณะเดียวกันค่าเฉลี่ยร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาก็มีค่ามากกว่าในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ) เช่นกัน

2) ความเข้มของการย้อมติดสี พบว่าคะแนนความเข้มของการย้อมติดสีของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่มประชากร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

3) ค่าเฉลี่ยคะแนนฮีสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในทั้ง 3 กลุ่มประชากร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยค่าเฉลี่ยคะแนนฮีสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียและในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มีค่ามากกว่าในเนื้อเยื่อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และในขณะเดียวกัน ในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มีค่ามากกว่าในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$ และ $p < 0.05$) เช่นกัน

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าพบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มากกว่าในเนื้อเยื่อปกติ อาจเป็นไปได้ว่า FTO และ ALKBH5 มีบทบาทในรอยโรคก่อนมะเร็งและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา ซึ่งบทบาทดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการดำเนินไปเป็นโรคมะเร็ง อย่างไรก็ตามกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ FTO และ ALKBH5 ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

อภิปรายผลการวิจัย

พยาธิกำเนิดของรอยโรคก่อนมะเร็งและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา สามารถเกิดจากการกลายพันธุ์ระดับเหนือพันธุกรรม เช่น กระบวนการเมทิลเลชันในอาร์เอ็นเอ เป็นต้น⁽¹³⁾ ปัจจุบันพบว่ากระบวนการเมทิลเลชันของ m6A และกลุ่มเอนไซม์ที่ควบคุม เช่น FTO และ ALKBH5 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการนำหมู่เมทิลออกจาก m6A มีบทบาททั้งการก่อมะเร็งและการต้านมะเร็ง โดยการเปลี่ยนแปลงระดับของ FTO และ ALKBH5 นี้มีผลต่อการตาย การเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและการพยากรณ์ของโรคมะเร็งหลายชนิด⁽²⁰⁾

จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า FTO มีบทบาทเกี่ยวข้องกับรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา โดยการศึกษาของ Wang และคณะ ในปี 2021 พบว่าในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มีการแสดงออกของ FTO ที่เพิ่มขึ้น โดยพบการติดสีในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติ ในขณะที่ในชิ้นเนื้อเยื่อปกติพบการติดสีน้อยหรือไม่มีการติดสี⁽²⁷⁾ สำหรับ ALKBH5 นั้น มีรายงานการศึกษาของ Shriwas และคณะ ในปี 2020 พบว่าในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มีการแสดงออกของ ALKBH5 โดยพบการติดสีในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติ⁽²⁸⁾ และพบการแสดงออกของ ALKBH5 ที่เพิ่มมากขึ้นในมะเร็งชนิดอื่นๆ เช่น การศึกษาของ Nagaki และคณะ ในปี 2020 พบการแสดงออกของ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา ที่หลอดอาหาร โดยพบการติดสีในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติ⁽⁶⁸⁾ และการศึกษา

ของ Zhang และคณะ ในปี 2017 ที่พบการแสดงออกของ ALKBH5 ในชั้นเนื้อมะเร็งสมองชนิดไกลิโอเบลาสโตมา โดยพบการติดสีในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติเช่นเดียวกัน⁽²⁵⁾ ซึ่งสอดคล้องกับผลของการศึกษาในครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของ FTO ในทุกชั้นเนื้อตัวอย่างของรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา โดยพบการติดสีในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติและมีระดับความเข้มที่รุนแรง เมื่อเปรียบเทียบกับในชั้นเนื้อเยื่อปกติที่พบการแสดงออกของ FTO เพียงร้อยละ 60 และมีระดับการติดสีจาง ส่วนการแสดงออกของ ALKBH5 จากการศึกษานี้พบว่ามีความโน้มการแสดงออกแบบเดียวกับ FTO กล่าวคือในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาพบการแสดงออกของ ALKBH5 ในทุกชั้นเนื้อตัวอย่าง โดยพบการติดสีในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติและมีระดับความเข้มที่รุนแรง เมื่อเปรียบเทียบกับในชั้นเนื้อเยื่อปกติที่พบการแสดงออกของ ALKBH5 เพียงร้อยละ 50 และมีระดับการติดสีจาง ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวจึงสนับสนุนผลของการศึกษานี้ที่พบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ที่เพิ่มมากขึ้นในมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาเมื่อเปรียบเทียบกับในเนื้อเยื่อปกติ และทั้ง FTO และ ALKBH5 นั้นน่าจะมีความสัมพันธ์ในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา

สำหรับในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย จากการศึกษานี้พบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในทุกตัวอย่างชั้นเนื้อ ซึ่งมีรูปแบบการติดสีที่ระดับปานกลางและติดสีเฉพาะในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุผิว โดยเฉพาะในเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติเหมือนในชั้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา โดยในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย มีการติดสีที่ระดับความเข้มที่มากขึ้นและหนาแน่นในชั้นเบซัลเซลล์ และพบการติดสีจางลงในชั้นสไปนัส เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการศึกษาการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียในช่องปากมาก่อน มีเพียงการศึกษาในรอยโรคมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ปากมดลูก พบว่าระดับการแสดงออกของ mRNA ของโปรตีน FTO เพิ่มขึ้นในชั้นเนื้อมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ปากมดลูกและในชั้นเนื้อ high grade cervical squamous intraepithelial neoplasia เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดยพบว่า FTO จะทำให้การแสดงออกของโปรตีน β -catenin เพิ่มขึ้น จึงทำให้มะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ปากมดลูกคือการให้ยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี⁽⁵⁸⁾ และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า FTO มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการเซลล์กลืนกินตัวเอง และการเกิดมะเร็ง ซึ่งศึกษาโดยทำการยับยั้งการแสดงออกของ FTO ด้วยการน็อคดาวน์ (knockdown) FTO จากเซลล์ไลน์มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์

คาร์ซีโนมา พบว่าส่งเสริมให้เกิดกระบวนการเซลล์กลืนกินตัวเอง และไปลดการเพิ่มจำนวน การเคลื่อนย้าย และการลุกลามของเซลล์มะเร็งให้ลดลง โดยเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ FTO ใน เซลล์ไลน์แล้ว ยิ่งพบว่าเซลล์มะเร็งลดการเจริญเติบโต และลดการแพร่กระจาย (metastasis) ของมะเร็ง⁽²⁷⁾ สำหรับ ALKBH5 นั้น พบว่า ALKBH5 มีบทบาทในการส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของ เซลล์มะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซีโนมาที่หลอดอาหาร และการแสดงออกของ ALKBH5 ที่เพิ่มขึ้น สัมพันธ์กับพยากรณ์ของโรคที่แย่ลง ซึ่งการศึกษานี้ทำโดยยับยั้งการแสดงออกของ ALKBH5 ด้วยการน็อคดาวน์ ALKBH5 จากเซลล์ไลน์มะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซีโนมาที่หลอดอาหาร และ พบว่าทำให้กระบวนการวัฏจักรของเซลล์ช้าลง และการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลดลง⁽⁶⁸⁾ และ ALKBH5 ยังมีบทบาทในการส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวและเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น รวมถึง ยับยั้งการเกิดอะพอพอโทซิสของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยพบการแสดงออกของยีนและโปรตีน ALKBH5 เพิ่มขึ้นในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่ปกติ⁽⁶⁰⁾ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าทั้ง FTO และ ALKBH5 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมจำนวนเซลล์และ การตายของเซลล์มะเร็ง และจากการศึกษานี้พบการแสดงออกที่มากขึ้นของ FTO และ ALKBH5 ในเซลล์เยื่อบุผิวที่มีความผิดปกติของรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย จึงอาจเป็นไปได้ว่าทั้ง FTO และ ALKBH5 น่าจะมีผลต่อกระบวนการวัฏจักรของเซลล์ ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวน ของเซลล์ที่ผิดปกติในรอยโรคกลุ่มนี้ด้วยเช่นกัน

สำหรับกลไกการทำงานของ FTO ในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซีโนมา มีรายงานว่าเกิดขึ้นผ่านทางกลไกที่ FTO ไปส่งเสริมให้มีการแสดงออกของยีน *eIF4G1* เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ส่งเสริมกระบวนการการเกิดมะเร็ง และยับยั้งกระบวนการ เซลล์กลืนกินตัวเอง และทำให้การแสดงออกของโปรตีน *eIF4G1* เพิ่มขึ้น ส่งผลให้กระบวนการ เซลล์กลืนกินตัวเองลดลง และส่งเสริมการเพิ่มจำนวน การเคลื่อนย้าย และการลุกลามของ เซลล์มะเร็ง⁽²⁷⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซีโนมาที่อวัยวะอื่น ๆ ได้แก่ การศึกษาของ Zhou และคณะ ในปี 2017 พบว่า FTO จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก m6A ส่งเสริม ให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน β -catenin เพิ่มขึ้น และไปเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน ERCC1 จึงทำให้มะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซีโนมาที่ปากมดลูกต่อการให้ยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี และยังพบว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซีโนมาที่ปากมดลูกที่มีการแสดงออกของทั้ง FTO และ β -catenin ในระดับสูงจะมีพยากรณ์ของโรคที่แย่กว่าในเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของ FTO และ β -catenin ในระดับต่ำ⁽⁵⁸⁾ และการศึกษาของ Liu และคณะ ในปี 2020 รายงานว่า FTO จะไป

ส่งเสริมการเจริญเติบโต การเคลื่อนย้าย และการสร้างโคโลนีของเซลล์มะเร็ง ผ่านทางการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ในยีน *MMP13* และทำให้การแสดงออกของโปรตีน *MMP13* เพิ่มขึ้น⁽⁵⁹⁾

ส่วนกลไกของ ALKBH5 ในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา มีรายงานเพียงการศึกษาของ Shriwas และคณะ ในปี 2020 ที่พบว่าระดับการแสดงออกของ ALKBH5 เพิ่มขึ้นในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัดเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ยังไม่ได้รับยาเคมีบำบัด โดยมีกลไกคือ ALKBH5 จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน *FOXM1* และยีน *NANOG* ทำให้การแสดงออกของโปรตีน *FOXM1* และ *NANOG* เพิ่มขึ้น ส่งเสริมให้มะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาดื้อต่อยาเคมีบำบัด⁽²⁸⁾ และการศึกษาของ Jin และคณะ ในปี 2022 ที่พบระดับการแสดงออกของ ALKBH5 ที่เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ศีรษะและลำคอเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดย ALKBH5 จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน *DEXD/H-Box Helicase 58 (DDX58)* ทำให้การแสดงออกของโปรตีน *Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)* ลดลง และยับยั้งสัญญาณของ *IKKε/TBK1/IRF3 pathway* ส่งผลให้การหลั่งของ *Interferon alpha (IFNα)* ลดลง ทำให้การทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่จะมาฆ่าเซลล์มะเร็งนั้นลดลง และส่งเสริมการดำเนินไปของมะเร็งสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมาที่ศีรษะและลำคอ⁽⁷⁴⁾ นอกจากนี้ยังพบรายงานการศึกษาในมะเร็งชนิดอื่น ๆ ได้แก่ การศึกษาของ Zhang และคณะ ในปี 2017 ซึ่งรายงานว่า ALKBH5 ทำให้การแสดงออกของโปรตีน *FOXM1* เพิ่มขึ้น ส่งเสริมให้สเต็มเซลล์ไกลอบลาสโตมาเพิ่มจำนวนและเกิดเป็นมะเร็งสมอง⁽²⁵⁾ และการศึกษาของ Zhang และคณะ ในปี 2019 ซึ่งรายงานว่า ALKBH5 ส่งเสริมให้เกิดการกลูกลามและการแพร่กระจายของมะเร็งกระเพาะอาหารผ่านทาง การไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน *NEAT1* ส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีน *NEAT1* เพิ่มขึ้น ซึ่งไปมีผลให้เพิ่มการกลูกลามและการแพร่กระจายของมะเร็ง⁽²⁶⁾

ส่วนกลไกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน แต่จากการศึกษาของ Li และคณะ ในปี 2022 ที่รายงานว่า FTO จะไปดึงหมู่เมทิลออกจาก mRNA ของยีน *Yes-Associated Protein 1 (YAP1)* ทำให้เพิ่มความเสถียรของ mRNA ของยีน *YAP1* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทในการส่งเสริมการดำเนินของโรค และการกลูกลามของมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา⁽⁷⁵⁾ และรายงานที่พบการแสดงออกของ *YAP1* ที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียและเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์

คาร์ซิโนมา เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดยยิ่งรอยโรคมีความรุนแรงมากขึ้น ยิ่งพบการแสดงออกของ YAP เพิ่มขึ้นด้วย⁽⁷⁶⁾ จึงอาจเป็นไปได้ว่า FTO ส่งผลให้รอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียมีการดำเนินโรคและการลุกลามไป ผ่านการทำงานของ YAP สำหรับ ALKBH5 นั้นพบว่าการน็อคดาวน์ ALKBH5 ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็ง เพิ่มการอะพอพโทซิส และไปลดระดับการแสดงออกของโปรตีน Ki-67 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่บ่งบอกถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation marker)⁽⁷⁴⁾ โดยมีรายงานว่าสามารถพบการแสดงออกของ Ki-67 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียได้ด้วย โดยระดับการแสดงออกของ Ki-67 ในเนื้อเยื่อปกติ รอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามลำดับ และยิ่งรอยโรคมีความรุนแรงมากขึ้น ยิ่งมีการแสดงออกของ Ki-67 เพิ่มขึ้น⁽⁷⁷⁾ และยังพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ALKBH5 จะไปยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน RIG-I และยับยั้งการหลั่ง IFN α ส่งผลให้เซลล์มะเร็งมีการเพิ่มจำนวน⁽⁷⁴⁾ ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวจึงอาจเป็นไปได้ว่ากลไกการทำงานของ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย อาจเกิดขึ้นโดยไปส่งผลต่อ Ki-67, RIG-I และ IFN α

นอกจากนั้นในการศึกษานี้ยังพบว่าค่าเฉลี่ยคะแนนฮีสโตเคมีของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียมีค่ามากกว่าในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ และเมื่อเปรียบเทียบทั้ง 3 กลุ่มพบว่าค่าเฉลี่ยคะแนนฮีสโตเคมีในชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียและชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามลำดับ จากผลการศึกษาแสดงว่ายิ่งรอยโรคมีความผิดปกติที่ใกล้เคียงมะเร็งมากขึ้น ยิ่งมีการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ที่มากขึ้น ระดับความเข้มของการติดสีและค่าเฉลี่ยคะแนนฮีสโตเคมีที่มากขึ้นเช่นกัน จากผลดังกล่าวบ่งชี้ว่า FTO และ ALKBH5 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย และอาจเกี่ยวข้องกับการดำเนินไปของโรคมะเร็ง โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า FTO และ ALKBH5 มีความเกี่ยวข้องกับการแพร่กระจายของมะเร็ง ได้แก่ การศึกษาโดยการยับยั้งการแสดงออกของ FTO ด้วยการน็อคดาวน์ FTO จากเซลล์ไลน์มะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมา พบว่าส่งผลให้ลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง และยังพบว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาที่มีการแสดงออกของ FTO ในระดับสูง สัมพันธ์กับอัตราการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำคอในอัตราที่สูงขึ้นเช่นกัน⁽²⁷⁾ ส่วน ALKBH5 มีการศึกษาในมะเร็งสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาที่หลอดอาหาร พบว่ายังมีการแสดงออกของ ALKBH5 ในระดับสูงจะสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง และมีพยากรณ์โรคที่แย่ง⁽⁶⁸⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาพบว่า

กระบวนการเมทิลเลชันของ m6A มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการการเปลี่ยนแปลงของ เซลล์เยื่อไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในมะเร็ง (epithelial to mesenchymal transition; EMT)⁽⁷⁸⁾ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า FTO และ ALKBH5 อาจมีบทบาทในกระบวนการ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในมะเร็ง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการ แพร่กระจายของมะเร็งของปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาและการดำเนินโรคของรอยโรค อีพิทีเลียลดิสเพลเซีย แต่ยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป

สำหรับการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย ระดับน้อยและรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรงยังไม่พบรายงานในการศึกษาอื่น แต่จาก ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นแนวโน้มว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มข้น ของการย้อมติดสี และค่าเฉลี่ยคะแนนฮีสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียล ดิสเพลเซียระดับรุนแรงมีค่ามากกว่าในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับน้อย แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำผลของชิ้นเนื้ออีพิทีเลียลดิสเพลเซียทั้ง 2 กลุ่มมาเปรียบเทียบกัน พบว่าไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ต้องการเปรียบเทียบ การแสดงออกในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย มะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา และ ชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ดังนั้นหากจะหาความแตกต่างของการแสดงออกในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย ระดับน้อยและรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซียระดับรุนแรง ควรออกแบบการศึกษาในกลุ่มชิ้นเนื้อ อีพิทีเลียลดิสเพลเซียให้เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ใน มะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาที่มีลักษณะแบบ poorly differentiated เปรียบเทียบ กับมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาที่มีลักษณะแบบ well differentiated และ moderately differentiated ก็ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อนเช่นกัน มีเพียงการศึกษาในมะเร็ง อื่น ๆ ได้แก่ การศึกษาในมะเร็งเต้านมที่พบระดับการแสดงออกของ FTO เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อ มะเร็งเต้านมชนิด double negative breast cancer (DNBC : ER-/PR-/Her2+) เมื่อเปรียบเทียบกับ เนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ และพบว่ายีนระยะของโรคมะเร็งที่รุนแรง ยิ่งพบระดับการแสดงออกของ FTO ที่เพิ่มขึ้น และยังสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตที่สั้นลงด้วย⁽²²⁾ และการศึกษาใน มะเร็งกระเพาะอาหารที่พบระดับการแสดงออกของ FTO เพิ่มขึ้นในชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะอาหาร เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ โดยการแสดงออกของ FTO ที่เพิ่มขึ้นนั้นสัมพันธ์กับ การแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง ระยะของโรคมะเร็งที่รุนแรง อัตราการรอดชีวิตที่สั้นลงและ พยากรณ์โรคที่แย่ลง⁽⁵³⁾ สำหรับรายงานการศึกษาในมะเร็งชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาพบว่า ในเนื้อเยื่อมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมาที่ยังมีการแสดงออกของ FTO ในระดับสูง

จะสัมพันธ์กับอัตราการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำคอในอัตราที่สูงขึ้นเช่นกัน⁽²⁷⁾ และการศึกษาในมะเร็งสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาที่หลอดอาหารพบว่ายังมีการแสดงออกของ ALKBH5 ในระดับสูงจะสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังต่อมน้ำเหลือง และมีพยากรณ์โรคที่แย่ลง⁽⁶⁸⁾ แต่ในการศึกษานี้ชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาส่วนใหญ่เป็นมะเร็งที่มีลักษณะแบบ well differentiated จึงไม่สามารถเปรียบเทียบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาที่มีลักษณะแบบ poorly differentiated กับมะเร็งที่มีลักษณะแบบ well differentiated และ moderately differentiated ได้

FTO และ ALKBH5 จัดเป็นเอนไซม์ RNA demethylase ทั้งคู่ ซึ่งมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ศึกษาการแสดงออกของทั้ง FTO และ ALKBH5 ในมะเร็งในการศึกษาเดียวกัน โดยศึกษาในมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาพบว่าการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อข้างเคียงที่ปกติ⁽²⁷⁾ และการศึกษาในมะเร็งไตชนิดเซลล์ใสพบว่าการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ลดลงในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งไตชนิดเซลล์ใสเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อปกติ โดยการศึกษาของทั้ง FTO และ ALKBH5 มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)⁽⁶⁹⁾ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในชิ้นเนื้อมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาที่มีความสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมานั้นมีความผิดปกติของการทำงานของ FTO และ ALKBH5

การศึกษานี้มีข้อจำกัดที่เป็นการศึกษาจากข้อมูลย้อนหลัง (retrospective study) ดังนั้นข้อมูลของชิ้นเนื้อรวมถึงประวัติที่เกี่ยวข้องทางคลินิกของผู้ป่วยบางอย่างไม่สามารถสืบค้นได้ เช่น ขนาดของมะเร็ง ระยะของโรคมะเร็ง ประวัติที่เคยมีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะอื่นๆ เป็นต้น ทำให้ไม่สามารถนำข้อมูลทางคลินิكدังกล่าวมาสัมพันธ์กับผลการศึกษาที่ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคก่อนมะเร็ง (อีพิทีเลียลดิสเพลเซีย) เปรียบเทียบกับมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาและเนื้อเยื่อปกติด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ น่าจะช่วยให้เข้าใจถึงบทบาทของ FTO และ ALKBH5 ที่มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์ คาร์ซิโนมาตั้งแต่ระยะเริ่มต้นและการดำเนินของโรคได้

ข้อเสนอแนะ

ผลจากการศึกษานี้พบการแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียล ดิสเพลเซียและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา มากกว่าในเนื้อเยื่อปกติ ซึ่งบ่งชี้ถึงบทบาทของ FTO และ ALKBH5 ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินไปเป็นโรคมะเร็ง ขั้นตอนต่อไปควรมีการศึกษาถึงกลไก (mechanism) ของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียล ดิสเพลเซียและรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทของ FTO และ ALKBH5 ที่มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา ซึ่งอาจนำไปสู่การสร้างตัวบ่งชี้ทางชีวภาพชนิดใหม่ เพื่อใช้วินิจฉัยรอยโรคได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้น ประเมินความเสี่ยง และการพยากรณ์ของโรคในผู้ป่วยมะเร็งช่องปาก หรืออาจนำไปสู่การค้นพบเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา (target of drug action) เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งในช่องปากได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of Salivary Biomarkers in Oral Cancer Detection. *Adv Clin Chem.* 2018;86:23-70.
2. Hospital-based cancer registry 2019. New Thammada Press(thailand) Co., Ltd: National Cancer Institute; 2020.
3. Tangjaturonrasme N, Vatanasapt P, Bychkov A. Epidemiology of head and neck cancer in Thailand. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2018;14(1):16-22.
4. El-Naggar AK, Chan J, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO classification of head and neck tumours. 4th edition ed. Lyon: IARC; 2017.
5. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(5):401-21.
6. Brad W. Neville DDD, Carl M. Allen, Angela C. Chi Oral and Maxillofacial Pathology. 4th ed2015.
7. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer.* 2007;110(7):1429-35.
8. Zhao H, Chu M, Huang Z, Yang X, Ran S, Hu B, et al. Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):11773.
9. Yang SF, Huang HD, Fan WL, Jong YJ, Chen MK, Huang CN, et al. Compositional and functional variations of oral microbiota associated with the mutational changes in oral cancer. *Oral Oncol.* 2018;77:1-8.
10. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):575-80.
11. Xu Y, Xu J, Feng J, Li J, Jiang C, Li X, et al. Expression of CLIC1 as a potential biomarker for oral squamous cell carcinoma: a preliminary study. *Onco Targets Ther.* 2018;11:8073-81.
12. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-94.

13. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):27-36.
14. Li Z, Zhao P, Xia Q. Epigenetic Methylations on N6-Adenine and N6-Adenosine with the same Input but Different Output. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12).
15. Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, et al. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*. 2012;485(7397):201-6.
16. Niu Y, Zhao X, Wu YS, Li MM, Wang XJ, Yang YG. N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2013;11(1):8-17.
17. Ianniello Z, Paiardini A, Fatica A. N(6)-Methyladenosine (m(6)A): A Promising New Molecular Target in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2019;9:251.
18. Wang H, Xu B, Shi J. N6-methyladenosine METTL3 promotes the breast cancer progression via targeting Bcl-2. *Gene*. 2020;722:144076.
19. Yang DD, Chen ZH, Yu K, Lu JH, Wu QN, Wang Y, et al. METTL3 Promotes the Progression of Gastric Cancer via Targeting the MYC Pathway. *Front Oncol*. 2020;10:115.
20. Sun T, Wu R, Ming L. The role of m6A RNA methylation in cancer. *Biomed Pharmacother*. 2019;112:108613.
21. Li Z, Weng H, Su R, Weng X, Zuo Z, Li C, et al. FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N(6)-Methyladenosine RNA Demethylase. *Cancer Cell*. 2017;31(1):127-41.
22. Niu Y, Lin Z, Wan A, Chen H, Liang H, Sun L, et al. RNA N6-methyladenosine demethylase FTO promotes breast tumor progression through inhibiting BNIP3. *Mol Cancer*. 2019;18(1):46.
23. Cui Q, Shi H, Ye P, Li L, Qu Q, Sun G, et al. m(6)A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep*. 2017;18(11):2622-34.
24. Zhang C, Zhi W, Lu H, Samanta D, Chen I, Gabrielson E, et al. Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217- and ALKBH5-mediated

- modulation of RNA methylation in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(40):64527-42.
25. Zhang S, Zhao BS, Zhou A, Lin K, Zheng S, Lu Z, et al. m(6)A Demethylase ALKBH5 Maintains Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells by Sustaining FOXM1 Expression and Cell Proliferation Program. *Cancer Cell*. 2017;31(4):591-606 e6.
 26. Zhang J, Guo S, Piao HY, Wang Y, Wu Y, Meng XY, et al. ALKBH5 promotes invasion and metastasis of gastric cancer by decreasing methylation of the lncRNA NEAT1. *J Physiol Biochem*. 2019;75(3):379-89.
 27. Wang F, Liao Y, Zhang M, Zhu Y, Wang W, Cai H, et al. N6-methyladenosine demethyltransferase FTO-mediated autophagy in malignant development of oral squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2021;40(22):3885-98.
 28. Shriwas O, Priyadarshini M, Samal SK, Rath R, Panda S, Das Majumdar SK, et al. DDX3 modulates cisplatin resistance in OSCC through ALKBH5-mediated m(6)A-demethylation of FOXM1 and NANOG. *Apoptosis*. 2020;25(3-4):233-46.
 29. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. WHO classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours.: IARC: Lyon; 2005.
 30. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):379-96.
 31. Al-Hebshi NN, Nasher AT, Maryoud MY, Homeida HE, Chen T, Idris AM, et al. Inflammatory bacteriome featuring *Fusobacterium nucleatum* and *Pseudomonas aeruginosa* identified in association with oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2017;7(1):1834.
 32. Lindemann A, Takahashi H, Patel AA, Osman AA, Myers JN. Targeting the DNA Damage Response in OSCC with TP53 Mutations. *J Dent Res*. 2018;97(6):635-44.
 33. Shah S, Jajal D, Mishra G, Kalia K. Genetic profile of PTEN gene in Indian oral squamous cell carcinoma primary tumors. *J Oral Pathol Med*. 2017;46(2):106-11.
 34. Chang YS, Hsu HT, Ko YC, Yeh KT, Chang SJ, Lin CY, et al. Combined mutational analysis of RAS, BRAF, PIK3CA, and TP53 genes in Taiwanese patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;118(1):110-6 e1.

35. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(3):155-66.
36. Ranganathan K, Kavitha L. Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23(1):19-27.
37. Lakshminarasimhan R, Liang G. The Role of DNA Methylation in Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2016;945:151-72.
38. Chantkran W. The basic concepts of carcinogenesis. *Asian Archives of Pathology*. 2019;1(1):29-39.
39. Chen T, Hao YJ, Zhang Y, Li MM, Wang M, Han W, et al. m(6)A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2015;16(3):289-301.
40. Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, Mansour AA, Kol N, Salmon-Divon M, et al. Stem cells. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*. 2015;347(6225):1002-6.
41. Deng X, Su R, Weng H, Huang H, Li Z, Chen J. RNA N(6)-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives. *Cell Res*. 2018;28(5):507-17.
42. Lan Q, Liu PY, Haase J, Bell JL, Huttelmaier S, Liu T. The Critical Role of RNA m(6)A Methylation in Cancer. *Cancer Res*. 2019;79(7):1285-92.
43. Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol*. 2011;7(12):885-7.
44. Deng X, Su R, Stanford S, Chen J. Critical Enzymatic Functions of FTO in Obesity and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:396.
45. Wang J, Wang J, Gu Q, Ma Y, Yang Y, Zhu J, et al. The biological function of m6A demethylase ALKBH5 and its role in human disease. *Cancer Cell Int*. 2020;20:347.
46. Peng W, Li J, Chen R, Gu Q, Yang P, Qian W, et al. Upregulated METTL3 promotes metastasis of colorectal Cancer via miR-1246/SPRED2/MAPK signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):393.
47. Liu J, Eckert MA, Harada BT, Liu SM, Lu Z, Yu K, et al. m(6)A mRNA methylation

regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer. *Nat Cell Biol.* 2018;20(9):1074-83.

48. Zhao W, Cui Y, Liu L, Ma X, Qi X, Wang Y, et al. METTL3 Facilitates Oral Squamous Cell Carcinoma Tumorigenesis by Enhancing c-Myc Stability via YTHDF1-Mediated m(6)A Modification. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020;20:1-12.

49. Liu L, Wu Y, Li Q, Liang J, He Q, Zhao L, et al. METTL3 promotes tumorigenesis and metastasis through BMI1 m6A methylation in oral squamous cell carcinoma. *Mol Ther* 2020.

50. Xu T, Zhang W, Chai L, Liu C, Zhang S, Xu T. Methyltransferase-like 3-induced N6-methyladenosine upregulation promotes oral squamous cell carcinoma by through p38. *Oral Dis.* 2021.

51. Zhu F, Yang T, Yao M, Shen T, Fang C. HNRNPA2B1, as a m(6)A Reader, Promotes Tumorigenesis and Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2021;11:716921.

52. Tao L, Mu X, Chen H, Jin D, Zhang R, Zhao Y, et al. FTO modifies the m6A level of MALAT and promotes bladder cancer progression. *Clin Transl Med.* 2021;11(2):e310.

53. Xu D, Shao W, Jiang Y, Wang X, Liu Y, Liu X. FTO expression is associated with the occurrence of gastric cancer and prognosis. *Oncol Rep.* 2017;38(4):2285-92.

54. Zhuang C, Zhuang C, Luo X, Huang X, Yao L, Li J, et al. N6-methyladenosine demethylase FTO suppresses clear cell renal cell carcinoma through a novel FTO-PGC-1alpha signalling axis. *J Cell Mol Med.* 2019;23(3):2163-73.

55. Rong ZX, Li Z, He JJ, Liu LY, Ren XX, Gao J, et al. Downregulation of Fat Mass and Obesity Associated (FTO) Promotes the Progression of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Front Oncol.* 2019;9:369.

56. Zhao Y, You S, Yu YQ, Zhang S, Li PT, Ye YH, et al. Decreased nuclear expression of FTO in human primary hepatocellular carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(9):3376-83.

57. Liu J, Ren D, Du Z, Wang H, Zhang H, Jin Y. m(6)A demethylase FTO facilitates tumor progression in lung squamous cell carcinoma by regulating MZF1 expression.

Biochem Biophys Res Commun. 2018;502(4):456-64.

58. Zhou S, Bai ZL, Xia D, Zhao ZJ, Zhao R, Wang YY, et al. FTO regulates the chemotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting β -catenin through mRNA demethylation. *Mol Carcinog*. 2018;57(5):590-7.

59. Liu S, Huang M, Chen Z, Chen J, Chao Q, Yin X, et al. FTO promotes cell proliferation and migration in esophageal squamous cell carcinoma through up-regulation of MMP13. *Exp Cell Res*. 2020;389(1):111894.

60. Shen C, Sheng Y, Zhu AC, Robinson S, Jiang X, Dong L, et al. RNA Demethylase ALKBH5 Selectively Promotes Tumorigenesis and Cancer Stem Cell Self-Renewal in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Stem Cell*. 2020;27(1):64-80 e9.

61. Zhang C, Samanta D, Lu H, Bullen JW, Zhang H, Chen I, et al. Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m(6)A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(14):E2047-56.

62. Zhu H, Gan X, Jiang X, Diao S, Wu H, Hu J. ALKBH5 inhibited autophagy of epithelial ovarian cancer through miR-7 and BCL-2. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):163.

63. Zhu Z, Qian Q, Zhao X, Ma L, Chen P. N(6)-methyladenosine ALKBH5 promotes non-small cell lung cancer progress by regulating TIMP3 stability. *Gene*. 2020;731:144348.

64. Zhang X, Wang F, Wang Z, Yang X, Yu H, Si S, et al. ALKBH5 promotes the proliferation of renal cell carcinoma by regulating AURKB expression in an m(6)A-dependent manner. *Ann Transl Med*. 2020;8(10):646.

65. Guo X, Li K, Jiang W, Hu Y, Xiao W, Huang Y, et al. RNA demethylase ALKBH5 prevents pancreatic cancer progression by posttranscriptional activation of PER1 in an m6A-YTHDF2-dependent manner. *Mol Cancer*. 2020;19(1):91.

66. Chen Y, Zhao Y, Chen J, Peng C, Zhang Y, Tong R, et al. ALKBH5 suppresses malignancy of hepatocellular carcinoma via m(6)A-guided epigenetic inhibition of LYPD1. *Mol Cancer*. 2020;19(1):123.

67. Yu H, Yang X, Tang J, Si S, Zhou Z, Lu J, et al. ALKBH5 Inhibited Cell Proliferation and Sensitized Bladder Cancer Cells to Cisplatin by m6A-CK2alpha-Mediated Glycolysis.

Mol Ther Nucleic Acids. 2021;23:27-41.

68. Nagaki Y, Motoyama S, Yamaguchi T, Hoshizaki M, Sato Y, Sato T, et al. m(6) A demethylase ALKBH5 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma associated with poor prognosis. *Genes Cells*. 2020;25(8):547-61.
69. Strick A, von Hagen F, Gundert L, Klumper N, Tolkach Y, Schmidt D, et al. The N(6)-methyladenosine (m(6) A) erasers alkylation repair homologue 5 (ALKBH5) and fat mass and obesity-associated protein (FTO) are prognostic biomarkers in patients with clear cell renal carcinoma. *BJU Int*. 2020;125(4):617-24.
70. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*. 2007;39(2):175-91.
71. Cohen J. Statistical power for the behavioral sciences. New York: Academic Press; 1977.
72. Lekshmy MS, Sivakumar TT, Joseph AP, Varun BR, Mony V, Reshmi A. Expression of transmembrane protein aquaporin-3 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2021;131(2):202-8.
73. Evans J. Straightforward statistics for the behavioral sciences: Thomson Brooks/Cole Publishing Co; 1996.
74. Jin S, Li M, Chang H, Wang R, Zhang Z, Zhang J, et al. The m6A demethylase ALKBH5 promotes tumor progression by inhibiting RIG-I expression and interferon alpha production through the IKKepsilon/TBK1/IRF3 pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2022;21(1):97.
75. Li DQ, Huang CC, Zhang G, Zhou LL. FTO demethylates YAP mRNA promoting oral squamous cell carcinoma tumorigenesis. *Neoplasia*. 2022;69(1):71-9.
76. Omori H, Nishio M, Masuda M, Miyachi Y, Ueda F, Nakano T, et al. YAP1 is a potent driver of the onset and progression of oral squamous cell carcinoma. *Sci Adv*. 2020;6(12):eaay3324.
77. Jing Y, Zhou Q, Zhu H, Zhang Y, Song Y, Zhang X, et al. Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. *Oncol*

Lett. 2019;17(1):974-80.

78. Lin X, Chai G, Wu Y, Li J, Chen F, Liu J, et al. RNA m(6)A methylation regulates the epithelial mesenchymal transition of cancer cells and translation of Snail. Nat Commun. 2019;10(1):2065.

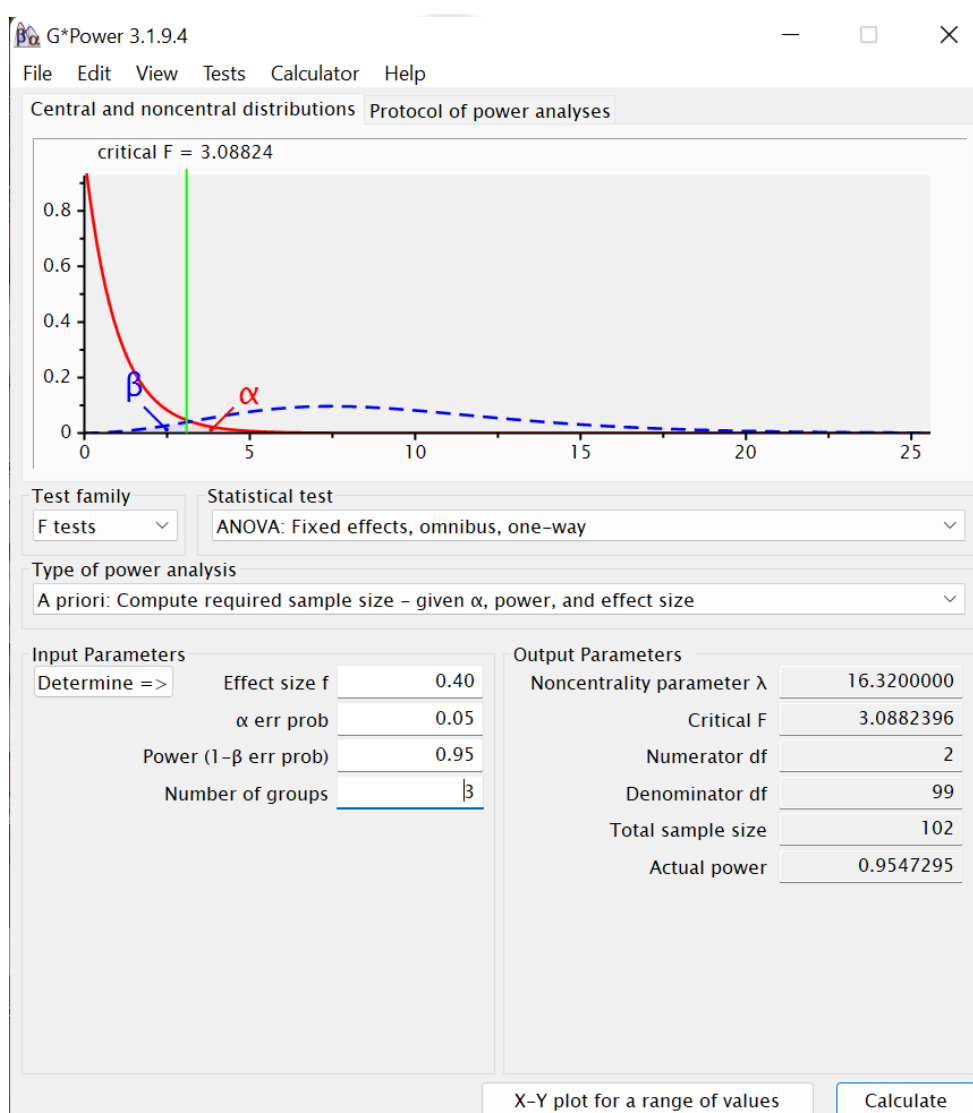
79. Koo TK, Li MY. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. J Chiropr Med. 2016;15(2):155-63.





การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง

จากการคำนวณจำนวนกลุ่มตัวอย่างโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป G*Power เวอร์ชัน 3.1.9.4⁽⁷⁰⁾ กำหนดค่าระดับนัยสำคัญ (α) เท่ากับ 0.05 และค่าขนาดอิทธิพล (effect size) ตามการประมาณค่าขนาดอิทธิพลของ Cohen ที่ได้กำหนดไว้เป็น 0.40⁽⁷¹⁾ เมื่อคำนวณด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป G*Power แล้ว ได้ค่าจำนวนประชากรทั้งหมดเป็น 102 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มตัวอย่าง จึงได้จำนวนกลุ่มตัวอย่างเป็นกลุ่มละ 34 ตัวอย่าง (ภาพประกอบ ก)



ภาพประกอบ ก แสดงผลการคำนวณจำนวนกลุ่มตัวอย่าง จากโปรแกรม G*Power

การปรับมาตรฐานการประเมินผล

ในการศึกษานี้มีการปรับมาตรฐานการประเมินของทันตแพทย์ผู้ทำวิจัยก่อนการแปลผลข้อมูล โดยใช้สหสัมพันธ์ภายในชั้น (Intraclass Correlation) และค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา (Cohen's Kappa Coefficient) เพื่อประเมินผลความน่าเชื่อถือระหว่างผู้สังเกต (Inter-rater Reliability) ที่ใช้ผู้ประเมินทั้งหมด 3 คน คือ ทันตแพทย์ผู้ทำวิจัยนี้และทันตแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านทันตพยาธิวิทยาจำนวน 2 ท่าน โดยทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีแสดงออก และพิจารณาระดับความเข้มของการติดสีของ FTO และ ALKBH5 แล้วนำค่าร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกและค่าคะแนนฮีสโตเคมี จากการสุมภาพถ่ายสไลด์ขึ้นเนื้อที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ของชิ้นเนื้อเยื่อปกติ ชิ้นเนื้อรอยโรคอีพิทีเลียลดีสเพลเซียและชิ้นเนื้อรอยโรคมะเร็งช่องปาก ชนิดสควamous เซลล์ คาร์ซิโนมา ซึ่งผ่านกระบวนการย้อมด้วยวิธีทางอิมมูโนฮีสโตเคมี จำนวน 5 ภาพ แล้วทำการคำนวณความน่าเชื่อถือระหว่างผู้ประเมินทั้ง 3 คน โดยการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ภายในชั้น สำหรับค่าคะแนนร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก (ค่า A) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 และค่าคะแนนฮีสโตเคมี (ค่า B) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 300 โดยได้มาจากการสังเกตของผู้ประเมินทั้ง 3 คน ได้ผลดังตาราง ก ส่วนความเข้มของการย้อมติดสีของ FTO และ ALKBH5 ทำการให้คะแนนระดับความเข้มสีที่พบ จากการสุมภาพถ่ายสไลด์ขึ้นเนื้อที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์ของชิ้นเนื้อตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม ซึ่งผ่านกระบวนการย้อมด้วยวิธีทางอิมมูโนฮีสโตเคมี จำนวน 10 ภาพ โดยคะแนนระดับความเข้มของการย้อมติดสี (ค่า C) มีค่าเป็น 0, 1, 2 และ 3 ได้ผลดังตาราง ข แล้ววิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 25 และทำการแปลผลค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในชั้น และค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา ตามตาราง ค และ ง ตามลำดับ⁽⁷⁹⁾

ตาราง ก แสดงข้อมูลค่าคะแนน A และ B ของทันตแพทย์ผู้ประเมินทั้ง 3 คน

ภาพสไลด์	ค่าคะแนนร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก (ค่า A)			ค่าคะแนนฮีสโตเคมี (ค่า B)		
	ผู้ประเมินคนที่ 1	ผู้ประเมินคนที่ 2	ผู้ประเมินคนที่ 3	ผู้ประเมินคนที่ 1	ผู้ประเมินคนที่ 2	ผู้ประเมินคนที่ 3
1	23.9	18.3	20.9	34.3	26.1	30.7
2	18.3	26.0	18.3	24.5	26.4	26.2
3	63.0	66.6	55.9	149.6	159.0	130.2
4	100.0	98.3	98.0	293.6	237.4	229.3
5	100.0	75.0	76.5	147.7	138.5	139.6

ตาราง ข แสดงข้อมูลค่าคะแนน C ของทันตแพทย์ผู้ประเมินทั้ง 3 คน

ภาพสไลด์	ค่าคะแนนระดับความเข้มของการย้อมติดสี (ค่า C)		
	ผู้ประเมินคนที่ 1	ผู้ประเมินคนที่ 2	ผู้ประเมินคนที่ 3
1	3	3	3
2	0	0	0
3	2	3	2
4	3	3	2
5	3	3	3
6	2	2	2
7	1	2	2
8	1	1	1
9	1	2	1
10	3	3	3

ตาราง ค แสดงการแปลผลค่าคะแนนสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายใน

คะแนนสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายใน	ความน่าเชื่อถือของผู้ประเมิน
0.00 – 0.50	ความสอดคล้องกันในระดับต่ำ
0.50 – 0.74	ความสอดคล้องกันในระดับพอใช้
0.75 – 0.90	ความสอดคล้องกันในระดับดี
0.90 - 1.00	ความสอดคล้องกันในระดับดีมาก

ตาราง ง แสดงการแปลผลค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา Fleiss Levin and Paik (2003)

ค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปา	แปลผล
0.75 – 1.00	ความสอดคล้องกันในระดับดีมาก
0.40 - 0.74	ความสอดคล้องกันในระดับดี
0.00 – 0.39	ความสอดคล้องกันในระดับต่ำ

เมื่อใช้โปรแกรม SPSS คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในของค่าคะแนนร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีแสดงออก ระหว่างผู้ทำวิจัยและผู้เชี่ยวชาญ พบว่าได้ค่าเป็น 0.987 (ภาพประกอบ ข) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในของค่าคะแนนฮีสโตเคมี ระหว่างผู้ทำวิจัยและผู้เชี่ยวชาญ พบว่าได้ค่าเป็น 0.990 (ภาพประกอบ ค) ซึ่งแปลผลได้ว่าความน่าเชื่อถือของผู้ประเมินมีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์โคเฮนแคปปาของค่าคะแนนระดับความเข้มของการย้อมติดสี ระหว่างผู้ทำวิจัยและผู้เชี่ยวชาญ ได้ค่าเป็น 0.725 (ภาพประกอบ ง) ซึ่งแปลผลได้ว่าความน่าเชื่อถือของผู้ประเมินมีความสอดคล้องกันในระดับดี

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	.963 ^a	.832	.996	79.914	4	8	.000
Average Measures	.987 ^c	.937	.999	79.914	4	8	.000

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

- The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.
- Type C intraclass correlation coefficients using a consistency definition. The between-measure variance is excluded from the denominator variance.
- This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

ภาพประกอบ ข แสดงผลการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในของค่าคะแนนร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออก จากโปรแกรม SPSS

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation ^b	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
		Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig
Single Measures	.972 ^a	.868	.997	104.521	4	8	.000
Average Measures	.990 ^c	.952	.999	104.521	4	8	.000

Two-way mixed effects model where people effects are random and measures effects are fixed.

- The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.
- Type C intraclass correlation coefficients using a consistency definition. The between-measure variance is excluded from the denominator variance.
- This estimate is computed assuming the interaction effect is absent, because it is not estimable otherwise.

ภาพประกอบ ค แสดงผลการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ภายในของค่าคะแนนฮีตโตเคมี จากโปรแกรม SPSS

Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standard Error ^a	Approximate T ^b	Approximate Significance
Measure of Agreement	Kappa	.726	.169	3.963	.000
N of Valid Cases		10			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

ภาพประกอบ ง แสดงผลการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ไคเอนแคปของค่าคะแนน
ระดับความเข้มของการยอมรับที่ดี จากโปรแกรม SPSS



ตารางผลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนน
ฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในเนื้อเยื่อปกติ

เนื้อเยื่อ ปกติ	FTO			ALKBH5		
	ร้อยละของเซลล์ ที่มีการแสดงออก	ความเข้ม ของการย้อม ติดสี	คะแนน ฮิสโตเคมี	ร้อยละของ เซลล์ ที่มีการแสดงออก	ความเข้ม ของการย้อม ติดสี	คะแนน ฮิสโตเคมี
1	0	0	0	12.1	2	20.1
2	36.4	2	59.6	13.5	1	21.7
3	0	0	0	0	0	0
4	16.7	1	20.9	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	2.2	1	3.1
7	2.5	2	5	0.5	2	1
8	0	0	0	0	0	0
9	9.6	1	9.6	12.6	2	20
10	20.9	2	30.7	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	2.7	1	3.2
13	0.9	1	1.8	5.8	2	10.6
14	6.4	2	14.1	0	0	0
15	10.8	1	16.8	8.9	1	12.3
16	5.5	1	7.1	14.5	3	34.4
17	2.6	1	3.9	0	0	0
18	0	0	0	7.8	1	12.8
19	12.6	2	22.5	0	0	0
20	1.8	1	2.5	0	0	0

ตารางผลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนน
ฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคอีพิทีเลียลดิสเพลเซีย

OED	FTO			ALKBH5		
	ร้อยละของเซลล์ ที่มี การแสดงออก	ความเข้ม ของ การย้อม ติดสี	คะแนน ฮิสโตเคมี	ร้อยละของเซลล์ ที่มี การแสดงออก	ความเข้ม ของ การย้อม ติดสี	คะแนน ฮิสโตเคมี
1	28.3	1	52.3	27.3	2	45.3
2	33.8	2	60.2	18.3	1	26.2
3	33.8	2	61	24.1	1	35.1
4	49.7	3	121.5	35.9	2	65.4
5	17.1	2	34.2	12.6	2	22
6	20.3	3	53.5	35.2	1	62.8
7	56	2	125.8	40.1	2	67.9
8	32.2	3	86.8	4.9	1	6.1
9	28.7	3	58.3	54.3	2	99.4
10	23.4	2	48.4	44.3	2	86.2
11	28	2	49.7	31.3	2	46.9
12	32.1	1	48.6	47.3	2	74.6
13	61.9	2	107.8	17.3	1	17.3
14	45.7	3	91.7	11.8	1	18.6
15	55.9	3	130.2	53.8	3	118
16	77.9	3	150.8	21	2	37.3
17	19.8	2	43.8	23.7	2	39.9
18	22.5	1	27	37.8	2	67.2
19	87.8	3	242.4	66.7	2	169.1
20	68.8	2	113	52	3	115.5

ตารางผลร้อยละของเซลล์ที่มีการแสดงออก ความเข้มของการย้อมติดสี และคะแนน
ฮิสโตเคมีของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสควamousเซลล์
คาร์ซิโนมา

OSCC	FTO			ALKBH5		
	ร้อยละของเซลล์ ที่มี การแสดงออก	ความเข้ม ของ การย้อม ติดสี	คะแนน ฮิสโตเคมี	ร้อยละของเซลล์ ที่มี การแสดงออก	ความเข้ม ของ การย้อม ติดสี	คะแนน ฮิสโตเคมี
1	95.4	2	184.5	94.3	3	207.6
2	93.8	3	233.7	89.9	2	177.2
3	94.3	2	205.1	96	2	204.8
4	92	3	258.5	91.3	3	203.7
5	96.2	3	266	100	3	285.5
6	98	3	229.3	78.7	3	179.5
7	100	2	200.3	56.1	2	154.7
8	76.2	1	112.8	0.5	1	1.2
9	94.4	3	215.1	98.2	3	241.1
10	93.1	3	242.7	84	3	232.3
11	70	3	152.8	30.1	2	54.8
12	81.4	3	221.7	79	3	204.6
13	63.4	2	110.6	34.2	2	60.3
14	30.9	2	56.1	95.7	2	188.4
15	53.1	3	150.8	73.6	2	162.9
16	92.9	2	167.4	90.9	2	174.8
17	93.2	3	255.4	76.5	3	139.6
18	66.4	2	145.3	41.5	2	80
19	84.5	2	145.5	58.6	2	100.4
20	86.4	3	214	79.8	2	194.2

หนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัย

MF-04-version-2.0

วันที่ 18 ต.ค. 61



หนังสือยืนยันการยกเว้นการรับรอง
คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(เอกสารนี้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ ได้พิจารณาโครงการวิจัยนี้)

ชื่อโครงการวิจัย : การแสดงออกของ METTL3, FTO และ N6-methyladenosine ในรอยโรคก่อนมะเร็ง
และรอยโรคมะเร็งช่องปากชนิดสความัสเซลล์ คาร์ซิโนมา
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย : อาจารย์ ดร.ทันตแพทย์ชัชพันธ์ อุดมพัฒนากกร
หน่วยงานต้นสังกัด : คณะทันตแพทยศาสตร์
รหัสโครงการวิจัย : SWUEC-463/2563X

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่เข้าข่ายยกเว้น (Research with Exemption from SWUEC)

วันที่ยืนยัน : 4 พฤศจิกายน 2563
ยืนยันโดย : คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดำเนินการ
รับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the
Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical
Practice (ICH-GCP)

ออกให้ ณ วันที่ 18 มกราคม 2564

(ลงชื่อ).....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์หญิงณัฏฐา เอี่ยมจิตรกุล)
กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

หมายเลขรับรอง : SWUEC/X-463/2563

(ลงชื่อ).....
(แพทย์หญิงสุรีพร ภัทรสุวรรณ)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

ภาพประกอบ ค เอกสารรับรองจริยธรรมโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

หมายเลขรับรอง SWUEC/X-463/2563

หนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัย

MF-04-version-2.0
วันที่ 18 ต.ค. 61



**หนังสือยืนยันการยกเว้นการรับรอง
คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ**

(เอกสารนี้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ ได้พิจารณาโครงการวิจัยนี้)

ชื่อโครงการวิจัย	: การแสดงออกของ FTO และ ALKBH5 ในรอยโรคก่อนมะเร็งและรอยโรคมะเร็งช่องปาก ชนิดสความัสเซลล์คาร์ซิโนมา
ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย	: อาจารย์ ดร.ทันตแพทย์ชัชพันธุ์ อุดมพัฒนากร
หน่วยงานต้นสังกัด	: คณะทันตแพทยศาสตร์
รหัสโครงการวิจัย	: SWUEC-031/2565X

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่เข้าข่ายยกเว้น (Research with Exemption from SWUEC)

วันที่ยืนยัน	: 24 กุมภาพันธ์ 2565
ยืนยันโดย	: คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ดำเนินการ
รับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นสากล ได้แก่ Declaration of Helsinki, the
Belmont Report, CIOMS Guidelines และ the International Conference on Harmonization in Good Clinical
Practice (ICH-GCP)

ออกให้ ณ วันที่ 14 มีนาคม 2565

(ลงชื่อ).....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทันตแพทย์หญิงณปภา เอี่ยมจิตรกุล)
กรรมการและเลขานุการคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

(ลงชื่อ).....
(แพทย์หญิงสุริพร ภัทรสุวรรณ)
ประธานคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์

หมายเลขรับรอง : SWUEC/X-031/2565

ภาพประกอบ ง เอกสารรับรองจริยธรรมโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรม
สำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
หมายเลขรับรอง SWUEC/X-031/2565

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พิชามญช์ ศรีวิริกุล
วัน เดือน ปี เกิด	16 มิถุนายน 2535
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2560 ท้นตแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล

