

dose p.o., 41 d						
p.i.						
Thamavit et al. (1987)	100	12.5 ppm*	15	40	15(100)	14(93)
	100	6.25 ppm*	19	40	19(100)	16(84)
	100	3.25 ppm*	15	40	10(67)	3(20)
	50	12.5 ppm*	17	40	15(88)	10(50)
	50	6.25 ppm*	15	40	9(60)	8(53)
	25	12.5 ppm*	19	40	15(78)	13(68)
	25	6.25 ppm*	15	40	9(60)	9(60)
	12	12.5 ppm*	10	40	7(70)	7(70)
	12	6.25 ppm*	10	40	4(40)	4(40)
Thamavit et al. (1994)	80	20 mg/kg i.p. 19 d before infection	43**	45	40(93)	19(44)

NDMA = N-nitrosodimethylamine; NR = Not reported; p.i. = post infection; p.o. = per oral; i.p. = intraperitoneal injection

*NDMA in drinking water, 2 weeks p.i. for 10 weeks.

**15(34.9%) also developed mucinous cystadenoma and 2 (4.7%) developed hepatocellular carcinoma. Data modified from the original articles.

ตารางที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างมะเร็งท่อน้ำดีกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและสารก่อมะเร็งอื่นๆ ในสัตว์ทดลอง

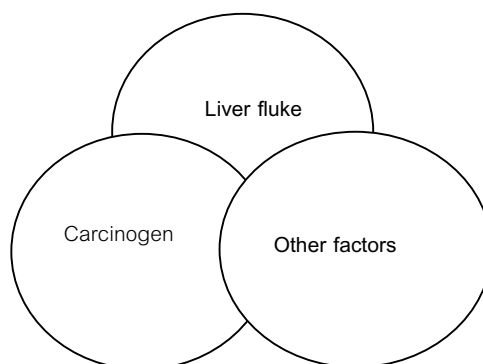
References	Dose of OV	Carcinogens	No. of animal	Duration (weeks)	Cholangio-fibrosis (%)	C C A (%)
Thamavit et al. (1988)	100	0.1% sodium nitrite +0.1% aminopyrine in	20	24	7(35)	3(15) HCD 2 (10)

			water, 30 d p.i.				
			for 8-10 wk				
Thamavit et al. (1987)	60	N D E A i n	20-30	32	presence	HCD	
		drinking water					
		for 12 wk				12/19	
		- 20 mg/L				23/25	
		- 40 mg/L					
Thamavit et al. (1992)	50 , 100	N D E A 150 mg/kg i.p., single	95	41	NR	H C D 4.3, 6.8	
Thamavit et al. (1988)	100	NDHDPA 1000 mg/kg body weight, i.p.	75	22	18/19	9/19 H C D (19/19)	
Moore et al. (1991)	80	NDHDPA 500 mg/kg body weight, 3 i.p. injection at wk 16,17,18	100	52	presence	8/16 H C D (16/16)	

NR = Not reported; p.i. = post infection; p.o. = per oral, NDEA = N-nitrosodiethylamine

NDHDPA = N-nitrosodihydroxy-n-propylamine, HCD = hepatocellular nodule

Data modified from the original articles.



รูปที่ 3.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย

จากหลักฐานทั้งรายงานในผู้ป่วย ระบาดวิทยาและการทดลองในสัตว์ทดลองดังกล่าว ประมวลเบื้องต้นว่า ปัจจัยสำคัญของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภาคอีสานน่าจะมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ และการได้รับสารก่อมะเร็ง อย่างไรก็ตาม การเกิดมะเร็งดังกล่าวอาจมีปัจจัยอื่นเกี่ยวข้องหรือที่ยังไม่ทราบอีกหลายปัจจัย ซึ่งสรุปความสัมพันธ์ได้ตามรูปที่ 3.1 ในบทวิเคราะห์นี้จะกล่าวถึงปัจจัยต่างๆ และกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในรายละเอียดโดยเฉพาะข้อมูลที่รวบรวมในช่วง 10 ปีย้อนหลัง รวมทั้งแนวทางการศึกษาต่อไปในอนาคตเพื่อนำไปสู่การควบคุม ป้องกัน และการรักษามะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย

ปัจจัยด้านตัวพยาธิ (Parasite factors)

การที่จะทำความเข้าใจในกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีจำเป็นต้องเข้าใจองค์ประกอบในการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องอย่างละเอียด ดังนั้นในส่วนปัจจัยของตัวพยาธิจึงควรทราบถึง 1) องค์ประกอบของตัวพยาธิ 2) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของhost และ 3) พยาธิสภาพและกลไกการเกิดพยาธิสภาพ ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในความสัมพันธ์ของพยาธิใบไม้ตับกับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

องค์ประกอบของตัวพยาธิ

พยาธิใบไม้ตับจัดอยู่ในกลุ่ม Trematode มีโครงสร้างซับซ้อนตั้งแต่ภายนอก คือ tegument และอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น gut, reproductive system เป็นต้น โครงสร้างทางกายภาพเหล่านี้มีการศึกษากันพอสมควรทั้งในระดับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาโครงสร้างของ tegument (Sobhon et al., 1986; Apinhasmit et al., 1993, 1994; Sobhon & Apinhasmit, 1995) พบว่าประกอบด้วย syncytium ซึ่งเป็นส่วนของ cell process ของ tegument cells ที่อยู่ได้ชั้นกล้ำมเนื้อลงไป Syncytium นี้ปกคลุมด้วย trilaminar

outer membrane ซึ่งก่อตัวเป็น microvilli และ glycocalyx บางๆ คลุมทับอีกชั้น ส่วนด้านล่างของ syncytium เป็น inner membrane และชั้นกล้ามเนื้อใน syncytium ประกอบด้วย secretory granules และ mitochondria จำนวนมาก ส่วน tegument cells ทั้งในระยะตัวอ่อน (immature fluke, 1 week) และพยาธิตัวแก่มีลักษณะที่ active มาก กล่าวคือ มี Nucleolus ใหญ่ RER มาก Golgi complexes พัฒนาดี และมี secretory granule หลากหลายชนิดจำนวนมาก เชื่อว่า granule เหล่านี้จะถูกขนถ่ายออกมาด้านนอกผ่านทาง microtubule มาที่ syncytium เพื่อสร้างเป็น outer membrane และ glycocalyx ต่อไป ในส่วนของ glycocalyx ซึ่งเป็นด้านนอกสุด ประกอบด้วยสารเคมีที่เป็น negative charges และเมื่อศึกษาทาง lectin cytochemistry แล้วพบว่า มีปฏิกิริยากับ lectin ชนิด Con A, WGA และ RCA แต่ไม่พบปฏิกิริยากับ DBA แสดงว่า glycocalyx ของพยาธิใบไม้ตับประกอบด้วย D-mannose/D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine/sialic acid, D-galactose และ D-mannose/D-galactosamine (Apinhasmit et al., 2000)

องค์ประกอบโปรตีนของพยาธิใบไม้ตับมีการศึกษาค่อนข้างน้อย Wongratanacheewin et al. (1988) และ Akai et al. (1992) ได้ศึกษาโปรตีนของพยาธินี้ทั้งตัว (somatic extract) โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กัน ตั้งแต่ 14–219 KDa และส่วนใหญ่อยู่ในรูป glycoprotein (Akai et al., 1992) ส่วน secretory products ของพยาธิส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 89 KDa (Wongratanacheewin et al., 1988) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนที่ดี และสามารถพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในการวินิจฉัย หรือการศึกษาทางอิมมูโนวิทยาได้ (Wongratanacheewin et al., 1988; Sirisinha et al., 1991, 1995) องค์ประกอบต่างๆ ของพยาธิที่กล่าวมาข้างต้นเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาสาเหตุของพยาธิสภาพที่เกิดจากพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งจะช่วยอธิบายการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและกลไกในการเกิดโรคต่อไป เนื่องจากหากมีองค์ประกอบเหล่านี้มาก โอกาสที่จะเกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของ host ก็เป็นไปได้สูง ข้อมูลการศึกษาในประชากรภาคอีสาน สนับสนุนสมมุติฐานนี้ กล่าวคือความรุนแรงของพยาธิสภาพในตับและท่อทางเดินน้ำดี/มะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับปริมาณหรือความรุนแรงของการติดเชื้อพยาธิ (worm burden/ egg per gram) (Elkins et al., 1990; Haswell-Elkins et al., 1991; Elkins et al., 1996) อย่างไรก็ตาม อาจมีองค์ประกอบอื่น ๆ ของพยาธิใบไม้ตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Enzyme หรือโมเลกุลอื่นที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพหรือมะเร็ง ซึ่งต้องการการศึกษารายละเอียดในระดับลึกอีกมาก

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ host ต่อพยาธิใบไม้ตับ

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งระบบ humoral และ cellular immune response ซึ่งมีการศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลอง

Humoral immune response

การศึกษาการตอบสนองของ host ต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับด้วยการสร้างแอนติบอดีมีการศึกษาครั้งแรกใน hamster โดย Janechaiwat et al. (1980) หลังจากนั้นได้มีรายงานทั้งจากการศึกษาในผู้ป่วยในโรงพยาบาล (Srivatanakul et al., 1985; Wongratanacheewin et al., 1988; Akai et al., 1995) การศึกษาในประชากรที่อยู่ในเขตระบาดของพยาธิใบไม้ตับ (Elkins et al., 1991; Haswell-Elkins et al., 1991) และในสัตว์ทดลอง (Sirisinha et al., 1983; Chawengkirttikul & Sirisinha, 1988; Sripa & Kaewkes, 2000a) การตอบสนองทางแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับมีทั้งชนิด IgG, IgA, IgM และ IgE การศึกษาทาง immunocytochemistry พบว่าแอนติบอดีที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่ตอบสนองต่อ tegument, reproductive organs, gut และ secretory products ของพยาธิ (Boonpucknavig et al., 1986; Wongratanacheewin & Sirisinha, 1987) ส่วนปริมาณของแอนติบอดีในซีรัมส่วนใหญ่แปรผันตามปริมาณของการติดเชื้อหรือปริมาณไข่พยาธิที่ตรวจพบ (Haswell-Elkins et al., 1991; Sripa & Kaewkes, 2000a) และระยะเวลาที่สามารถตรวจพบแอนติบอดี (latent period) ขึ้นกับปริมาณของการติดเชื้อ (Chawengkirttikul & Sirisinha, 1988; Sripa & Kaewkes, 2000a) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของแอนติบอดีโดยเฉพาะชนิด IgG มีความสัมพันธ์กับการเกิด periductal fibrosis ในระบบท่อน้ำดี (Haswell-Elkins et al., 1991) รายงานดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าผู้ที่สงสัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี (ประเมินจากการผลอัลตราซาวด์) (Haswell-Elkins et al., 1991) หรือผู้ที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดี (โดยมีผลวินิจฉัยทางพยาธิวิทยายืนยัน) มีระดับหรือปริมาณของแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับในซีรัมสูงกว่าผู้ป่วยที่เป็น benign hepatobiliary diseases อื่นๆ (Itoh et al., 1994; Sripa et al., unpublished) จากข้อมูลที่ประมวลได้ในขณะนี้เชื่อได้ว่าผู้ที่มีแอนติบอดีต่อพยาธิใบไม้ตับสูงหรือผู้ที่มีปริมาณการติดเชื้อมากมีโอกาสเสี่ยงที่จะมีพยาธิสภาพในตับและท่อน้ำดีสูงกว่าผู้ที่มีปัจจัยดังกล่าวน้อย

Cellular immune response

การศึกษาด้านการตอบสนองแบบฟั้งเซลล์ (cellular immune response) ต่อพยาธิใบไม้ตับมีค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาด้าน humoral immune response ที่กล่าวมาแล้ว Bhamarapravati et al. (1978) พบว่าใน hamster ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในระยะแรก มีการตอบสนองของเซลล์อักเสบโดยเฉพาะ eosinophil, neutrophil และ mononuclear cells รอบๆ ท่อน้ำดี

จำนวนมาก ทั้งในท่อขนาดเล็กซึ่งไม่มีตัวพยาธิและท่อน้ำดีขนาดใหญ่ รวมทั้ง periportal area หลังจากนั้นจะมี lymphocyte และ plasma cell เพิ่มมากขึ้น และอาจพบ granulomatous inflammation รอบๆ ไช้พยาธิ ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็นปฏิกิริยาของ cell-mediated immune response การศึกษาใน hamster โดย Sripa & Kaewkes (2000b) แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของเซลล์อักเสบต่างๆ เป็นการตอบสนองต่อแอนติเจนของพยาธิ โดยตัวพยาธิจะปล่อยแอนติเจน/โปรตีนผ่านเยื่อผิวท่อน้ำดีและกระตุ้นให้ host มีการตอบสนองแบบฟั้งเซลล์ (cellular immune response) การตอบสนองแบบฟั้งเซลล์หรือการอักเสบในระยะเฉียบพลัน (acute inflammation) มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีเป็นอย่างมากดังจะได้อธิบายในหัวข้อต่อไป อย่างไรก็ตามในการติดเชื้อเรื้อรัง (chronic infection) ในเดือนที่ 5-6 พบว่าพยาธิสภาพของตับมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น (Sripa & Kaewkes, 2000b) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wongratanacheewin et al. (1987) ซึ่งพบ immunodepression ใน hamster ที่ติดเชื้อเรื้อรัง

สำหรับการศึกษาการตอบสนองแบบฟั้งเซลล์ในผู้ป่วยโดย Sripa et al (1995) โดยศึกษาผนังของถุงน้ำดีจากผู้ป่วยที่พบไช้พยาธิใบไม้ตับในน้ำดีหรือในอุจจาระ พบว่าผู้ป่วยที่มีไช้พยาธิใบไม้ตับมีจำนวน T cell, T helper cells, macrophage และ mast cell ในชั้น lamina propria ของ mucosa มากกว่าของผู้ป่วยที่ไม่มีไช้พยาธิอย่างมีนัยสำคัญ และยังพบว่าปริมาณของเซลล์อักเสบดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับภาวะ fibrosis ของถุงน้ำดี (Sripa et al., unpublished) จากข้อมูลต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้าน cellular immune response ต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของตับและท่อน้ำดีเดินทางขึ้นลง ส่วนบทบาทหรือกลไกจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

พยาธิวิทยาโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

การศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลองแสดงว่าพยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับพบได้ทั้งในตับ ท่อน้ำดี และถุงน้ำดี (Tansurat, 1971; Bhamarapavati et al., 1978; Koompirochana et al., 1978; Harinasuta et al., 1984; Riganti et al., 1989) ความรุนแรงของพยาธิสภาพที่เกิด ขึ้นกับปริมาณการติดเชื้อและระยะเวลาของการติดเชื้อ (Bhamarapavati et al., 1978; Harinasuta et al., 1984; Sripa & Kaewkes, 2000b)

พยาธิวิทยาในคน

ตับที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจำนวนมากจะมีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักรวมมากขึ้น บางครั้งอาจมากถึงสองเท่าของน้ำหนักปกติ (3,000-3,500 กรัม หรือมากกว่า) (Tansurat, 1971) ท่อน้ำดีที่อยู่ใต้ชั้นเยื่อหุ้มตับมีการขยายตัวมากและมีผนังพังผืดหนา (Hitnant et al., 1987; Riganti et al., 1989) พยาธิสภาพของตับที่เห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ส่วนใหญ่พบในท่อน้ำดี โดย

เฉพาะท่อทางเดินน้ำดีขนาดใหญ่และขนาดกลางที่มีพยาธิอาศัยอยู่ (Riganti *et al.*, 1989) Tansurat (1971) ศึกษาจากการตรวจศพ 70 ราย ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในเยื่อและผนังท่อทางเดินน้ำดีในรายที่มีการติดเชื้อในระยะแรกหรือการติดเชื้อที่มีปริมาณน้อย อย่างไรก็ตามในรายที่มีการติดเชื้อเรื้อรังพบว่ามีจำนวนของเซลล์เยื่อต่อมเมือกและการหนาตัวของผนังท่อทางเดินน้ำดี Riganti *et al.* (1989) ได้รายงานลักษณะพยาธิสภาพที่พบบ่อย คือ desquamation of the biliary epithelium, epithelial hyperplasia, bile duct hyperplasia และ periductal fibrosis ส่วนเซลล์อักเสบที่แทรกเข้าไปส่วนใหญ่เป็นชนิด lymphocytes, monocytes, eosinophils และ plasma cells การอักเสบชนิดแกรนูโลมา (Granulomatous inflammation) พบได้น้อยและถ้าพบมักจะพบในบริเวณที่มีการหลุดของไขพยาธิเข้าไปในเนื้อเยื่อ (Viranuvatti & Stitnimankarn, 1972; Riganti *et al.*, 1989) พยาธิสภาพทั้งที่ดูด้วยตาเปล่าและจากกล้องจุลทรรศน์ไม่แตกต่างกันระหว่างเด็กและผู้ใหญ่ แต่การตรวจพบถุงน้ำดีโต ถุงน้ำดีอักเสบเรื้อรัง และมะเร็งท่อน้ำดี พบได้เฉพาะในผู้ใหญ่ (Riganti *et al.*, 1989)

พยาธิวิทยาในสัตว์ทดลอง

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในสัตว์ทดลองโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน hamster มีความคล้ายคลึงกับที่เกิดในคน Bhamarapravati *et al.* (1978) ได้อธิบายพยาธิสภาพใน hamster ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับไว้ดังนี้ ในระยะแรกของการติดเชื้อมีการอักเสบแบบเฉียบพลันใน second-order bile ducts และ portal connective tissue มีการตายของเนื้อเยื่อตับเป็นหย่อม ๆ (focal hemorrhagic and coagulation necrosis) เซลล์อักเสบที่แทรกเข้ามามีทั้ง eosinophils, neutrophils และ mononuclear cells การตอบสนองของเซลล์อักเสบเหล่านี้กระทำต่อแอนติเจนของพยาธิที่ปล่อยออกมาและกระจายผ่านเยื่อบุผิวท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อข้างเคียงโดยเฉพาะบริเวณที่อยู่ใกล้ตัวพยาธิ (Sripa & Kaewkes, 2000b) ส่วนท่อน้ำดีจะขยายใหญ่ขึ้นพร้อมกับมีการเพิ่มจำนวนของเยื่อบุผิว และ goblet cells

ในระยะที่สองของการติดเชื้อประมาณหนึ่งเดือนจะมี epithelial hyperplasia และ adenomatous formation ของท่อน้ำดี ส่วน granulomatous responses ต่อตัวพยาธิและไขก็พบได้บ่อยเช่นกันและเชื่อว่าการหาย (resolution) ของ granulomas นี้นำไปสู่การเกิด periductal และ periportal scarring

ในระยะติดเชื้อเรื้อรังเป็นเวลานาน พยาธิสภาพในระดับที่เด่นคือมี periportal และ periductal fibrosis ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบ type I และ type III collagen ในปริมาณมากขึ้นใน hamster ที่ติดเชื้อเรื้อรัง (Hutadilok & Ruenwongsa, 1983; Chotigeat & Ruenwongsa, 1986) ส่วนเซลล์อักเสบที่แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อรอบๆ ท่อน้ำดีประกอบด้วย lymphocytes, monocytes, macrophages, eosinophils และ plasma cells (Bhamarapravati

et al., 1978; Sripa & Kaewkes, 2000b) พยาธิสภาพของถุงน้ำดีในสัตว์ทดลองที่ติดเชื้อพบว่ามีการหนาตัวของผนังถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับ และเมื่อศึกษาทาง histopathology พบว่ามีเซลล์อักเสบจำนวนมาก ทั้งชนิด eosinophil, neutrophil, mononuclear cell และ mast cell นอกจากนี้ยังพบ fibrosis ในผนังของถุงน้ำดีและท่อน้ำดีนอกตับด้วยเช่นกัน (Sripa & Kaewkes, unpublished)

กลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับ

จากข้อมูลทั้งส่วนประกอบของตัวพยาธิ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ host และพยาธิสภาพที่พบ ทำให้สามารถประมวลกลไกการเกิดพยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ในระดับหนึ่ง โดยในส่วนของการทำงานลายเยื่อบุผิวท่อน้ำดี เช่น มี epithelial desquamation เชื่อว่าอาจเกิดจากการเสียดสีทางกายภาพ (mechanical irritation) ระหว่างตัวพยาธิกับเยื่อของท่อน้ำดี และการดูดกัดโดย sucker ของพยาธิ หรืออาจเกิดจาก metabolic products ที่พยาธิใบไม้ตับขับถ่ายออกมา (Tansurat, 1971; Viranuvatti & Stitnimankarn, 1972; Harinasuta *et al.*, 1984) อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ให้ความสำคัญกับบทบาทของภูมิคุ้มกันของ host ต่อพยาธิในการทำให้เกิดโรค (Bhamarapravati *et al.*, 1978; Flavell & Flavell, 1986; Haswell-Elkins *et al.*, 1991; Sripa & Kaewkes, 2000b) โดยมีหลักฐานสนับสนุนหลายประการ เช่น มี lymphocytes, mast cells, eosinophils และ macrophages infiltration รอบ ๆ periportal area บ่งบอกถึงการตอบสนองต่อแอนติเจนของพยาธิที่แพร่ผ่านเยื่อบุผิวท่อน้ำดี เชื่อว่าการทำลายเนื้อเยื่อในระยะเฉียบพลันเกิดจากกระบวนการอักเสบที่มีมากนั่นเอง ส่วนการเปลี่ยนแปลงเรื้อรังโดยเฉพาะในรายที่มีการติดเชื้อเป็นเวลานาน การอักเสบจะลดลง เนื่องจากมี immunodepression และ immunomodulation ซึ่งเป็น immunopathologic mechanisms (Bhamarapravati *et al.*, 1978; Sripa & Kaewkes, 2000b) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Haswell-Elkins *et al.* (1991) พบว่าความผิดปกติของถุงน้ำดี เช่น การหนาตัวของผนังถุงน้ำดีในผู้ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ มีความสัมพันธ์กับระดับของ parasite-specific IgG ในซีรัม และมีความสัมพันธ์มากกว่าความรุนแรงของการติดเชื้อ ส่วนพยาธิสภาพที่เกิดจากสาร (พิษ) ที่ปล่อยจากตัวพยาธิยังไม่มีรายงาน

5. ปัจจัยด้านสารก่อมะเร็ง (Carcinogens)

Exogenous carcinogens

มีรายงานในสัตว์ทดลองว่า สารก่อมะเร็งหรือสารก่อมะเร็งตั้งต้น (precursor) ชนิดต่าง ๆ ที่ได้รับจากภายนอกสู่ร่างกาย (exogenous carcinogens) โดยการกิน การสูดดม หรือการสัมผัส สามารถทำให้เกิดมะเร็งในส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ สำหรับมะเร็งท่อน้ำดี เชื่อว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการได้รับสารก่อมะเร็งจากอาหารหมักดองต่างๆ ซึ่งเป็นอาหารพื้นบ้านที่คนอีสานรับประทานเป็นประจำ เช่น ปลาร้า ปลาจ่อม หรือปลาเค็ม เป็นต้น สารก่อมะเร็งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษามาก คือ *N*-nitroso compounds เนื่องจากมีหลักฐานสนับสนุนชัดเจนในสัตว์ทดลองว่า สารก่อมะเร็งกลุ่มนี้สามารถเหนี่ยวนำให้ hamster เกิดมะเร็งท่อน้ำดีได้เมื่อให้ร่วมกับพยาธิใบไม้ตับ

สารก่อมะเร็งในกลุ่ม *N*-nitroso compounds หรือไนโตรซามีน อาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง nitrite และสารประกอบ amines ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดอ่อนๆ อาหารประเภทเนื้อที่มีการใส่สารถนอมอาหารในการหมักหรือเพิ่มสีสรร เช่น ดินประสิว (sodium nitrite) มีโอกาสที่จะเกิดสารก่อมะเร็งกลุ่มนี้ได้ นอกจากนี้สารเหล่านี้ในรูปสารประกอบตั้งต้น เช่น nitrite สามารถทำปฏิกิริยากับ amine ในกระเพาะอาหารเกิดเป็น dimethylnitrosamine ได้เช่นกัน ดังนั้นในหลายประเทศได้กำหนดปริมาณการปนเปื้อนของ sodium nitrite ในอาหารไว้ เช่น ประเทศญี่ปุ่น ไม่เกิน 50 ppm ส่วนประเทศสหรัฐอเมริกากำหนดไม่เกิน 200 ppm

ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบปริมาณ nitrate และ nitrite สูงในอาหารชนิดต่าง ๆ ในภาคอีสาน (Migasena et al., 1980) ดังแสดงในตารางที่ 3.5 แต่ตรวจไม่พบไนโตรซามีน ซึ่งอาจเนื่องจากเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ไม่มีความไวเพียงพอ (ใช้เทคนิค Thin layer chromatography) เนื่องจากไนโตรซามีนกว่าร้อยละ 80 เป็น volatile nitrosamine อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานการตรวจ volatile nitrosamine ในอาหารประเภทหมักดองและอาหารต่าง ๆ ในประเทศไทยกว่า 1,800 ตัวอย่าง ด้วยวิธี gas chromatography และ thermal energy analyzer พบว่ามีปริมาณ *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-nitrosopiperidine (NPIP) และ *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR) ค่อนข้างสูงในปลาสดตากแห้ง พบในปลาร้าและปลาแห้งอื่นๆ ตั้งแต่ปริมาณเล็กน้อยจนถึง 66.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง นอกจากนี้ยังตรวจพบ NDMA และ NPYR ในผักต่างๆ ตั้งแต่ 1-95.1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง (Mitacek et al., 1999b) และยังตรวจพบสาร nitrate ในแหล่งน้ำต่างๆ ด้วย เชื่อว่าเกิดจากการปนเปื้อนของสารเคมีโดยเฉพาะปุ๋ยทางการเกษตรซึ่งอาจปนเปื้อนมาในน้ำดื่ม ข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนสมมุติฐานเดิมที่เชื่อว่าการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีสูงในภาคอีสาน เนื่องจากประชากรในภูมิภาคนี้รับประทานอาหารทั้งอาหารปลาหมักและผักต่างๆ เป็นประจำ และอาจได้รับสารก่อมะเร็งหรือสารก่อมะเร็ง

ตั้งต้นสะสมเป็นจำนวนมากและนำไปสู่การเกิดมะเร็งในที่สุด อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างการได้รับสารก่อมะเร็งจากภายนอกและการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในคนภาคอีสานยังไม่มีรายงานหรือข้อมูลในคนที่แน่ชัด

ตารางที่ 3.5 ปริมาณ nitrates และ nitrites ในอาหารชนิดต่างๆ ของภาคอีสาน

Food	No. of species	No. of sample	Nitrate (ppm)	Nitrite (ppm)
Vegetables	77	235	0-30,999	0-33
Preserved vegetables	5	14	119-21,289	0.6-82
Fruit	9	12	0-177	0.2-2
Preserved protein food	14	165	0-27,078	0.03-194
Cooked food (food on plate)	79	156	0-25,861	0-86

Endogenous agents

ในปี ค.ศ.1994 Ohshima และ Bartsch ได้ตั้งสมมุติฐานเกี่ยวกับกลไกการเกิดมะเร็งที่เกิดจากภาวะติดเชื้อเรื้อรังหรือภาวะอักเสบเรื้อรังว่า สาร nitric oxide (NO) และอนุมูลอิสระของธาตุออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ที่ถูกสร้างขึ้นเนื่องจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายแบบพึ่งเซลล์นั้นสามารถทำลาย DNA ของเซลล์ได้ นอกจากนี้สารก่อมะเร็งซึ่งเป็น metabolites ที่เกิดจากสาร NO ที่ถูกสร้างขึ้นจากปฏิกิริยา nitrosation ในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบหรือติดเชื้อคือ *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งท่อน้ำดี

มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจัดว่าเป็นรูปแบบ (model) ที่สำคัญในการพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวในคนได้ดี เนื่องจากสามารถตรวจวัดระดับของการสร้าง NO ได้จากระดับสาร nitrate ในปัสสาวะหรือในปัสสาวะ และระดับ nitrite ในน้ำลาย นอกจากนี้ยังสามารถวัดปฏิกิริยา nitrosation ที่เกิดขึ้นในร่างกาย (endogenous nitrosation) ได้โดยให้ผู้ถูกทดลองรับประทานกรดอะมิโน proline ซึ่งเป็นตัวตรวจจับ (probe) ได้ และสามารถวัดปฏิกิริยาดังกล่าวใน

บุคคลคนเดียวกันทั้งในภาวะที่มีและไม่มี การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ เพราะสามารถถ่ายพยาธิออกได้ด้วยยา praziquantel

Srianujata (1987) และ Srivatanakul (1991) ได้เปรียบเทียบระดับ nitrate และระดับ ปฏิกริยา endogenous nitrosamine โดยทำ proline loading ในคนนิสานที่มีและไม่มี การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ พบว่าคนที่มีความผิดปกติระดับของสารเหล่านี้สูงกว่าคนที่ไม่มีพยาธิอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีข้อสังเกตว่าการศึกษาดังกล่าวไม่ได้ควบคุมปริมาณ nitrite และ nitrate ในอาหารของอาสาสมัคร ซึ่งเป็นตัวแปรที่สำคัญในการศึกษาปฏิกริยา endogenous nitrosation ต่อมา Haswell-Elkins และคณะ (1994) ได้ทำการวิจัยในรูปแบบดังกล่าวที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยใช้อาสาสมัครชายที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในระดับความรุนแรงต่างกัน และควบคุมปริมาณ nitrate ในอาหารให้มีปริมาณต่ำมาก พบว่าระดับ nitrite ในน้ำลาย และระดับ nitrate ในปัสสาวะและพลาสมาของอาสาสมัครในกลุ่มที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ ทั้งระดับปานกลาง (1000-6000 epg) และระดับสูง (> 6000 epg) มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มีพยาธิอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ระดับของสารต่างๆ ดังกล่าวในอาสาสมัครกลุ่มนี้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถ่ายพยาธิออกไปแล้วเป็นเวลา 4 เดือน ผลการวิจัยดังกล่าวแสดงชัดเจนว่าระดับ nitrate / nitrite ที่เพิ่มขึ้นในร่างกายเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อพยาธิและเกิดจากการสร้าง NO ในร่างกายขณะที่มีการติดเชือนั้นเอง

โดยปกติ ปฏิกริยา nitrosation เกิดขึ้นในร่างกายได้ 2 ตำแหน่ง คือที่กระเพาะอาหาร (gastric nitrosation) และที่เนื้อเยื่อที่มีการอักเสบ (tissue nitrosation) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นทั้งสองตำแหน่งถูกยับยั้งได้ด้วยวิตามินซี แต่เฉพาะ nitrosation ที่เกิดที่กระเพาะอาหารถูกกระตุ้นได้ด้วยสาร thiocyanate Satarug และคณะ (1996a) ได้รายงานต่อมาว่า NO ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกริยา nitrosation ในร่างกายมากขึ้น โดยพบว่ากลุ่มผู้ติดเชื้อมีระดับ N-nitrosoproline ในปัสสาวะมากกว่ากลุ่มควบคุมและสารดังกล่าวลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถ่ายพยาธิแล้ว 4 เดือน นอกจากนี้ระดับ N-nitrosoproline ในกลุ่มผู้ติดเชื้อลดลงเมื่ออาสาสมัครรับประทานวิตามินซีร่วมกับ proline ผลการทดสอบนี้แสดงว่า N-nitrosoproline เกิดจากปฏิกริยา endogenous nitrosation จริง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ multivariate statistical model ยังแสดงให้เห็นว่า thiocyanate ในน้ำลายมีความสัมพันธ์เฉพาะกับปฏิกริยา nitrosation ของกลุ่มควบคุมเท่านั้น ข้อมูลนี้ชี้แนะว่า nitrosating agent ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ติดเชือน่าจะเกิดจาก tissue nitrosation ของเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบไม่ใช่ gastric nitrosation

Satarug และคณะ (1998) ยังได้ศึกษาต่อถึงระดับของสารก่อมะเร็ง NDMA ซึ่งเป็น product ของปฏิกริยา endogenous nitrosation โดยวัดปริมาณ NDMA ในปัสสาวะของอาสา

สมัครกลุ่มเดิม ในภาพรวมไม่พบความแตกต่างของระดับ NDMA ในกลุ่มผู้ติดเชื่อและไม่ติดเชื่อ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเป็นเพราะในร่างกายมีปริมาณ NDMA ที่น้อยมาก และ NDMA ยังถูก metabolite ต่อเป็นสารอื่น อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าระดับ NDMA มีความสัมพันธ์อย่างมากกับระดับ nitrate ในกลุ่มผู้ติดเชื่อ เป็นการแสดงทางอ้อมว่า NDMA ที่พบมาจากปฏิกิริยา nitrosation ในร่างกาย

NDMA ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อจะถูก metabolite ด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ CYP2E1 และ 2A6 ที่ตับให้เป็น DNA methylating agent ซึ่งสามารถจับกับ DNA เป็น DNA adduct และมีผลต่อการแปลรหัสโปรตีนและนำไปสู่กระบวนการเกิดมะเร็ง ในที่สุด เอนไซม์ CYP2E1 และ 2A6 เป็น inducible enzyme ดังนั้นหลักฐานทางอ้อมที่จะช่วยยืนยันว่าผู้ที่ติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับมีการสร้าง NDMA สูงขึ้นจริงคือ มีการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP2E1 และ 2A6 เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ติดเชื่อพยาธิ

การศึกษาการทำงานของ CYP2A6 ในคน โดยให้อาสาสมัครทั้งชายและหญิงที่ติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับ และกลุ่มควบคุมรับประทานยา coumarin ซึ่งเป็น specific substrate ของเอนไซม์ CYP2A6 แล้วตรวจหา metabolite คือ 7-hydroxycoumarin (7-HC) ในปัสสาวะ พบว่ากลุ่มที่ติดเชื่อมีการขับ 7-HC ออกมามากกว่ากลุ่มไม่ติดเชื่อแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับของ 7-HC ของกลุ่มที่ติดเชื่อลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากถ่ายพยาธิแล้ว 2 เดือน (Satarug et al., 1996b) การศึกษานี้ชี้ว่าการติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับเหนี่ยวนำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 ข้อสังเกตนี้เห็นได้ชัดเจนขึ้นในอาสาสมัครที่ติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับที่มีภาวะ biliary fibrosis รวมด้วย ซึ่งบ่งบอกถึงภาวะการติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับแบบเรื้อรัง

Yongvanit และคณะ (1997) ได้ทดสอบสมมุติฐานนี้ใน hamster เพศผู้ที่ติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับ โดยดูการทำงานของเอนไซม์ 2A8/9 (CYP2A6 ในคน) และ CYP2E1 พบว่าการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่ติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับเป็นเวลา 6 เดือน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การศึกษากการทำงานของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2E1 ในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีระดับการทำงานที่สูงสุดในเนื้อเยื่อตับส่วนที่มีเซลล์อักเสบและมีการแสดงออกของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) (Yongvanit et al., 2000) การศึกษาเหล่านี้สอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ผ่านมา (Kirby et al., 1994; Ohshima et al., 1994)

จากหลักฐานดังกล่าวข้างต้นสนับสนุนว่าการติดเชื่อพยาธิใบไม้ตับเหนี่ยวนำให้มีการสร้างสาร nitrosamines *in situ* ในเนื้อเยื่อบริเวณที่มีการอักเสบ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการก่อมะเร็งท่อน้ำดี เนื่องจากเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2E1 ในเซลล์ตับที่ใกล้เคียงกับท่อน้ำดี

สามารถเปลี่ยนแปลง NDMA ให้เป็นสารพิษที่สามารถทำลาย DNA ของเซลล์โดยกระบวนการ DNA methylation ได้ โดยเฉพาะเยื่อบุท่อน้ำดีที่มีอัตราการแบ่งเซลล์สูง

นอกจากการทำลาย DNA โดยกระบวนการต่อเนื่องจาก endogenous nitrosation แล้ว NO ยังสามารถทำลาย DNA โดยตรง ด้วยกระบวนการ deamination, nitration และ oxidation (Tamir & Tannenbaum, 1996) การเกิด oxidative damage ของ DNA สามารถนำไปสู่การเกิด single-หรือ double-strand break point หรือ frameshift mutation ทำให้เกิดโครโมโซมที่ผิดปกติ และ genetic instability ของเซลล์ได้

Jaiswal และคณะ (2000, 2001) รายงานการตรวจพบ iNOS, nitrotyrosine (เป็น product ของปฏิกิริยาระหว่าง NO-derived ONOO⁻ และ tyrosine) และ 8-oxodG (เป็น marker ของ oxidative DNA damage) ในเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีที่มีการอักเสบในผู้ป่วย primary sclerosing cholangitis (PSC) ทุกราย แต่ไม่พบในเซลล์ท่อน้ำดีปกติ หรือเซลล์ท่อน้ำดีของผู้ป่วย alcoholic cirrhosis นอกจากนี้ยังพบว่า NO ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ iNOS สามารถยับยั้งการทำงานของ global DNA repair enzyme และ site-specific DNA repair enzyme (8-oxodG DNA glycosylase 1) ด้วย การทำลาย DNA เป็นปรากฏการณ์ที่พบได้บ่อยเมื่อมีการอักเสบรวมทั้งการอักเสบจากการติดเชื้อพยาธิ (Herrera & Ostrosky-Wegman, 2001)

จากการประมวลองค์ความรู้จากผลการศึกษาต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น สรุปได้ว่าในภาวะที่มีการอักเสบเรื้อรังและมีการชุมนุมของเซลล์อักเสบในบริเวณดังกล่าว Cytokines ที่สร้างและหลั่งจากเซลล์อักเสบเหล่านั้นจะกระตุ้นให้มีการสร้าง iNOS (ซึ่งมีความรุนแรงมากกว่า NOS isoform อื่นๆ) และทำให้มี NO ในบริเวณนั้นมากขึ้น NO ที่เกิดขึ้นทำให้เกิด DNA oxidative damage ของเซลล์ในบริเวณใกล้เคียง ตัวอย่างโรคที่พบบ่อยของ oxidative damage คือ 8-oxodG ซึ่งต้องใช้เอนไซม์ 8-oxodG DNA glycosylase ในการซ่อมแซม แต่เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งได้ด้วย NO ทำให้เกิดการสะสมของ genetic damage และนำไปสู่การเกิดมะเร็งในที่สุด

นอกจาก NO แล้ว ยังมี reactive oxygen intermediates (ROI) อื่นๆ อีกมากที่เป็นผลจากกระบวนการอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อจุลชีพหรือการได้รับสารกระตุ้น IFN- γ หรือ IL-8 เมื่อถูกกระตุ้น เซลล์อักเสบจะปล่อย superoxide anion (O₂⁻) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น H₂O₂ โดยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หรือเปลี่ยนเป็น OH⁻ โดย iron-catalyzed Haber-Weiss reaction หรือเป็น hypochlorous acid (HOCl) โดยเอนไซม์ myeloperoxidase (Bogdan et al., 2000) สาร ROI เหล่านี้สามารถทำลายจุลชีพโดยการทำให้เกิด oxidative DNA damage ในเซลล์ของจุลชีพ รวมทั้งเซลล์อื่นๆ ในบริเวณใกล้เคียงได้

กลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดร่วมกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับและท่อน้ำดี 2 ประการใหญ่ๆ คือ การทำลายเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี และการอักเสบของท่อน้ำดี

การทำลายเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีจากตัวพยาธิโดยตรง ทำให้มีการสร้างเซลล์เยื่อบุผิวขึ้นมาทดแทน หากมีการติดเชื้ออย่างเรื้อรัง กระบวนการทำลายและการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นทดแทนจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิด epithelial hyperplasia, goblet cell metaplasia และ adenomatous hyperplasia ตามลำดับ ในขณะเดียวกันการติดเชื้อพยาธิก็ทำให้เกิดการอักเสบขึ้นรอบๆ ท่อน้ำดี เซลล์อักเสบที่เข้ามาชุมนุมมีทั้ง macrophages, neutrophils, eosinophils, mast cells, lymphocyte และ plasma cells เซลล์อักเสบเหล่านี้สามารถสร้างสารเคมีต่างๆ โดยเฉพาะ nitric oxide ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายสารพันธุกรรมของเซลล์ได้โดยตรง หรือถูก metabolite ต่อเป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม *N*-nitroso compounds โดยกระบวนการ endogenous nitrosation และถูก metabolite ต่อเป็น ultimate carcinogen โดยเอ็นไซม์กลุ่ม cytochrome (CYP) P450 ในตับ โดยเฉพาะชนิด CYP2E1 และ CYP2A6 สารก่อมะเร็งเหล่านี้สามารถทำให้เกิด DNA adduct ในเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีที่กำลังแบ่งตัว และเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมจนกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด เชื่อกันว่าลำดับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีเป็นแบบ “normal-hyperplasia-metaplasia carcinoma” sequence (Holzinger, et al, 1999) เนื่องจากพบรอยโรคเช่นนี้ในบริเวณเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีบริเวณที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง

Molecular mechanism

กระบวนการก่อมะเร็งโดยทั่วไปเกิดจากความผิดปกติในการทำงานของยีนในกลุ่มยีนมะเร็ง (oncogenes), ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor genes) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม DNA (DNA repair genes)

ยีนมะเร็ง: การเปลี่ยนแปลงที่พบได้บ่อยคือ การผ่าเหล่า (mutation) โดยเฉพาะในยีนมะเร็งกลุ่ม *ras* family ซึ่งเป็นยีนมะเร็งที่มีการศึกษากันมากที่สุดและพบมีการผ่าเหล่ามากที่สุดในกลุ่มมะเร็งทางเดินอาหาร ยีนใน *ras* family ประกอบด้วย 3 functional genes คือ H-*ras*, K-*ras* และ N-*ras* ซึ่ง encode เป็นโปรตีน Guanosine triphosphatase ที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน คือ 21,000 kD โปรตีนนี้ทำงานเกี่ยวข้องกับ tyrosine kinase-mediated signal transduction ซึ่งควบคุมกระบวนการแบ่งเซลล์และ differentiation ของเซลล์ (Khosravi-Far & Der, 1994) หากเกิดการผ่าเหล่าของยีนกลุ่มนี้ (โดยเฉพาะยีน K-*ras* ซึ่งพบบ่อยที่สุด) จะทำให้เซลล์แบ่งตัวและเกิด differentiation ไม่มีที่สิ้นสุดและกลายเป็นมะเร็งได้ นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่เชื่อได้ว่าการ

เกิด K-ras mutation เป็นการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลที่เกิดขึ้นในระยะเริ่มแรก (early event) ของกระบวนการก่อมะเร็ง (Horio *et al.*, 1996; Ohnishi *et al.*, 1997)

อุบัติการณ์การเกิด K-ras mutation พบมากน้อยต่างกันตามชนิดของมะเร็ง เช่น พบร้อยละ 75-95 ในมะเร็งตับอ่อน, ร้อยละ 40-60 ในมะเร็งลำไส้ใหญ่, ร้อยละ 30 ในมะเร็งปอด เป็นต้น การผ่าเหล่าส่วนใหญ่อุบัติขึ้นที่ codon 12 ส่วนมะเร็งเต้านม มะเร็งท่อน้ำดี มะเร็งตับ พบมีการผ่าเหล่าของ K-ras น้อยมาก (Bos, 1989) สำหรับรายงานอุบัติการณ์การผ่าเหล่าของ K-ras oncogene ในมะเร็งท่อน้ำดี โดยเฉพาะที่ codon 12 แตกต่างกันอย่างกว้างขวางตั้งแต่ร้อยละ 0 จนถึง 100 (Tada *et al.*, 1990; Levi *et al.*, 1991; Tada *et al.*, 1992; Tsuda *et al.*, 1992; Kiba *et al.*, 1993; Ohashi *et al.*, 1995) อัตรานี้คล้ายกับอุบัติการณ์ที่พบในมะเร็งตับอ่อนซึ่งเป็นอวัยวะที่มีการพัฒนาทางกายวิภาคจากต้นกำเนิดเดียวกันกับท่อน้ำดี แต่ที่น่าสนใจคือ อุตบัติการณ์ของการเกิด K-ras mutation ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยต่ำกว่ามะเร็งท่อน้ำดีในต่างประเทศมากคือเพียงร้อยละ 0-8 เท่านั้น (Tsuda *et al.*, 1992; Kiba *et al.*, 1993) ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากสาเหตุและกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่แตกต่างกันระหว่างคนไทยซึ่งมีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับร่วมด้วยกับชาวต่างประเทศซึ่งมีสาเหตุส่วนใหญ่จากการอักเสบของท่อน้ำดีแบบเรื้อรัง (Tsuda *et al.*, 1992; Kiba *et al.*, 1993, Watanasirichaigoon *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับ K-ras mutation ในผู้ป่วยไทยจากรายงานทั้ง 3 ฉบับยังขาดรายละเอียดเกี่ยวกับตำแหน่งและลักษณะทาง gross morphology ของมะเร็งเนื่องจากมีรายงานว่ามะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดบริเวณ hilar region (central type) และ extrahepatic มักจะมีการผ่าเหล่าของ K-ras codon 12 สูง (Tada *et al.*, 1990; Levi *et al.*, 1991) และมะเร็งท่อน้ำดีที่มีลักษณะเป็น mass forming (peripheral type) จะมีร้อยละของการผ่าเหล่าต่ำกว่าชนิดที่เป็น periductal extension หรือ spicula-forming type (Ohashi *et al.*, 1995)

ยีนมะเร็งชนิดอื่นๆ ที่มีความสำคัญในการก่อมะเร็งแต่ยังมีการศึกษาน้อยมากหรือไม่มีเลยในมะเร็งท่อน้ำดี คือ c-myc, c-met, c-erbB-2, int-2, K-sam, mdm-2 เป็นต้น ในส่วนของ c-myc เป็นยีนมะเร็งที่เชื่อว่าทำหน้าที่ในการสร้าง nuclear protein / transcription factor เพื่อควบคุมการแบ่งเซลล์ การกระตุ้น c-myc เกิดได้ด้วยกลไกหลายอย่าง เช่น translocation และ gene amplification (Cooper, 1995) c-myc amplification พบได้ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งปอด เป็นต้น สำหรับในมะเร็งท่อน้ำดีมีเพียงรายงานการตรวจพบ c-myc expression ประมาณร้อยละ 95 (Voravud *et al.*, 1989) แต่ยังไม่มียีนการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน

c-met, c-erbB-2, int-2, K-sam เป็นยีนที่ encode ให้โปรตีน hepatocyte growth factor (HGF) receptor, epidermal growth factor (EGF) receptor, fibroblast growth factor (FGF), และ fibroblast growth factor receptor ตามลำดับ Amplification และ overexpression

ของยีนมะเร็งหรือผลผลิตของยีนเหล่านี้พบได้ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งหลอดอาหาร และมะเร็งเซลล์ตับ เป็นต้น (Tahara, 1993; Tahara, 1995; Tahara et al., 1996; Kiss et al., 1997) สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีมีการศึกษาน้อยมาก และมีเพียงรายงาน c-erbB-2 overexpression ร้อยละ 26.3-73 ในมะเร็งท่อน้ำดีของคนไทย (Voravud et al., 1989; Suzuki et al., 2000)

ยีนต้านมะเร็ง: การเปลี่ยนแปลงของยีนต้านมะเร็งมีความสำคัญและมีการศึกษากันมาก เพื่ออธิบายกลไกการก่อมะเร็งชนิดต่างๆ ในระดับโมเลกุล p53 เป็นยีนต้านมะเร็งที่มีการศึกษากันมากที่สุดและพบการเปลี่ยนแปลงบ่อยที่สุดในมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น พบ mutation/LOH มากกว่าร้อยละ 60 ในมะเร็งกระเพาะอาหาร (Tahara et al., 1996) และร้อยละ 80 ในมะเร็งเซลล์ตับ (Fujimoto et al., 1994) สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทยมีรายงาน mutation ของยีน p53 ร้อยละ 35 ซึ่งไม่แตกต่างกันมากนักกับมะเร็งท่อน้ำดีในคนญี่ปุ่น (Kiba et al., 1993) การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นส่วนมากเป็นแบบ G:C to A:T transition คล้ายกับที่พบในมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Hollstein et al., 1991) แต่ต่างจากมะเร็งเซลล์ตับที่เป็นแบบ G to T transversion (Hsu et al., 1991; Oda et al., 1992) ซึ่งน่าจะเกิดจากกลไกการก่อมะเร็งที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามรายงาน mutation ของยีน p53 ของมะเร็งท่อน้ำดีในคนไทย ยังขาดการเชื่อมโยงกับตำแหน่งและลักษณะทาง gross morphology ของมะเร็ง ส่วนรายงานเกี่ยวกับ p53 expression และ LOH มีน้อยมาก จึงน่าจะมีการศึกษาในรายละเอียดเพื่ออธิบายกระบวนการก่อมะเร็งได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านมะเร็ง p53 คือ mdm-2 และ p21^{WAF1/CP1} mdm-2 gene เป็นยีนที่ให้ผลผลิตเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 90 kD ซึ่งจะจับกับ p53 (wild type & mutant) และยับยั้งการทำงานของ p53 ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวมากขึ้น การเกิด Gene amplification และ overexpression ของยีน mdm-2 พบได้ในมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะใน soft tissue tumor (Cooper, 1995) ส่วน p21^{WAF1/CP1} เป็นยีนที่ให้ผลผลิตเป็นโปรตีน p21 ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้ง DNA replication ในระยะ S-phase ของ cell cycle โดยจับกับ Proliferating nuclear antigen (PCNA) และยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase (Waga et al., 1994) มีทั้งที่เป็น p53-inducible และ p53-independent การเปลี่ยนแปลงของยีน p53 จะนำไปสู่การสร้าง p21^{WAF1/CP1} ได้น้อยลงซึ่งมีผลทำให้การควบคุม cell cycle บกพร่องและนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ Mutation และ abnormal expression ของยีน p21^{WAF1/CP1} พบได้ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะอาหารและมะเร็งตับอ่อน (El-Deiry et al., 1995; Yasui et al., 1996; Mateo et al., 1997; Ruggeri et al., 1997) แต่ยังไม่เคยมีรายงานในมะเร็งท่อน้ำดีของคนไทย

ยีนต้านมะเร็งชนิดอื่นๆ ที่มีความสำคัญคือ retinoblastoma (Rb), p16 และ APC gene ยีน Rb เป็น tumor suppressor gene ตัวหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์

ในช่วง G1-S phase ใน cell cycle ยีนนี้อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 13q14.2 พบการขาดหาย (deletion) และ Loss of heterozygosity (LOH) ของยีนนี้ในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งเซลล์ตับ มะเร็งปอด และมะเร็งไต เป็นต้น (Zhang et al., 1994; Cooper, 1995; Lai et al., 1997; Tamura et al., 1997) ส่วนการศึกษาในมะเร็งท่อน้ำดียังไม่เคยมีรายงาน

สำหรับยีน p16 เป็นยีนที่ให้ผลผลิตเป็นโปรตีน 16 kD ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ cyclin-dependent kinase (CDK) ใน cell cycle โดยจะไปแย่งจับกับ CDK4 ทำให้ CDK4 ไม่สามารถจับกับ cyclin D1 (Sher, 1996) และทำให้การแบ่งเซลล์ถูกยับยั้ง มีรายงานการเปลี่ยนแปลงของยีน p16 ในมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิด mutation และ deletion ทำให้การควบคุมการแบ่งเซลล์ผิดปกติและเกิดเป็นมะเร็งในที่สุด มีรายงานความผิดปกติของยีนนี้ในมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะในมะเร็งตับอ่อน พบ somatic mutation & homozygous deletion สูงถึงร้อยละ 82 (Caldas et al., 1994; Rozenblum et al., 1997) สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีในต่างประเทศพบว่ามี point mutation ของยีน p16 สูงถึงร้อยละ 64 (Yoshida et al., 1995) แต่สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีในเมืองไทยยังไม่เคยมีรายงาน

ยีน APC เป็น tumor suppressor gene ที่ให้ผลผลิตเป็น 2843 amino acid protein ซึ่งสามารถจับกับ catenin และเกี่ยวข้องกับ signalling บริเวณ cell junction การเปลี่ยนแปลงของยีนนี้พบได้หลายแบบ เช่น frameshift, deletion, missense mutation เป็นต้น และพบได้ในทุกระยะของการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ตั้งแต่ aberration crypt foci, adenoma & carcinoma โดยเฉพาะใน Familial adenomatous polyposis coli (FAP) เชื่อว่ายีน APC เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะแรก (Cooper, 1995; Bishop & Weinberg, 1996) สำหรับในมะเร็งท่อน้ำดียังไม่เคยมีรายงาน

นอกเหนือจากการเปลี่ยนแปลงของยีนมะเร็งและยีนต้านมะเร็งแล้ว การเกิดมะเร็งและการพัฒนาการของก้อนมะเร็งยังต้องอาศัยปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น growth factors (ดังได้กล่าวมาแล้ว) สำหรับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการ adhesion และโปรตีน หรือยีนที่เกี่ยวกับการแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis) ที่มีความสำคัญและมีการศึกษากันมากคือ CD44, nm-23, matrix metalloproteinase (MMP) และ ตัวยับยั้ง (MMP inhibitors)

CD44 (HCAM) จัดอยู่ในกลุ่ม cell adhesion molecule (CAM) เป็น transmembrane glycoprotein มีหลาย isoforms พบได้ในเซลล์เยื่อและ mesenchymal cells หลายชนิด เชื่อว่ามีหน้าที่สำคัญใน lymphocyte homing และ adhesion, cell-cell และ cell-matrix interaction (Freemont & Hoyland, 1996) Upregulation และ aberrant expression ของยีน CD44 พบได้ในมะเร็งหลายชนิดและเชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจาย (metastasis) ของมะเร็ง (Albelda et al., 1993; Tarin et al., 1993; Freemont & Hoyland, 1996) ในมะเร็งเซลล์ตับมี

รายงานพบว่า CD44 expression มีความสัมพันธ์กับ vascular invasion (Mathew et al., 1996) สำหรับมะเร็งท่อน้ำดียังไม่เคยมีรายงาน ส่วน nm-23 เป็นยีนด้านการแพร่กระจาย พบว่ามี LOH ของ nm-23 ในมะเร็งกระเพาะอาหารร้อยละ 8 และการลดลงของ nm-23 expression มีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของมะเร็งด้วย (Tahara, 1996)

จากการประมวลเอกสารการศึกษาศึกษาพยาธิวิทยาในระดับโมเลกุลของมะเร็งท่อน้ำดีทั้งในระดับสากลและมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยพบว่ามีข้อมูลน้อยมาก ดังนั้นจึงควรศึกษารายละเอียดในเรื่องดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภาคอีสานที่เชื่อว่ามีสาเหตุและกลไกการเกิดแตกต่างจากมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศอื่น นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัย การพยากรณ์โรค และการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

ปัจจัยอื่น ๆ (Other factors)

การศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีน้อยมาก และขอสรุปปัจจัยที่น่าสนใจดังนี้

ปัจจัยด้านบุคคล (Host factors) ที่สำคัญคือ Host immune responses เช่น HLA type, susceptibility gene ต่อการติดเชื้อ, Xenobiotic metabolism เช่น Xenobiotic polymorphism และ Familial/genetic susceptibility

ปัจจัยอื่น ๆ (Miscellaneous) เช่น การสูบบุหรี่ (Mitacek et al., 1999a) และสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เป็นต้น

บทวิเคราะห์และหัวข้อวิจัย

มะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดในคนไทยอีสานมีสาเหตุการเกิดที่แตกต่างจากมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดในต่างประเทศ ผลการวิจัยทางระบาดวิทยา การทดสอบในคนและการทดลองในสัตว์ทดลองแสดงชัดเจนว่ามะเร็งท่อน้ำดีในภาคอีสานมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและการได้รับสารก่อมะเร็ง

การตรวจวัดว่ามีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหรือไม่ค่อนข้างชัดเจน แต่การตรวจวัดว่าได้รับสารก่อมะเร็งหรือไม่ยังไม่มีวิธีการที่แน่ชัด แม้ว่าจะมีรายงานการปนเปื้อนของสารกลุ่ม volatile nitrosamine ในอาหารหลายประเภท หลักฐานในปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสารก่อมะเร็งในอาหารมีบทบาทโดยตรงในการก่อมะเร็งท่อน้ำดี เนื่องจากการได้รับสารก่อมะเร็งต้องได้รับในปริมาณมากและอย่างต่อเนื่อง และต้องวัดปริมาณที่ได้รับจริง (exposure dose) ซึ่งในประเด็นนี้ยังขาดข้อมูลสนับสนุนที่แน่ชัด นอกจากนี้สารก่อมะเร็งในอาหารยังต้องผ่านกระบวนการดูดซึมของระบบทางเดินอาหารและการ metabolite ของร่างกายก่อนที่จะมาถึงท่อน้ำดี ซึ่งยังไม่แน่ชัดว่าสาร volatile nitrosamine ในอาหารซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตเพียงเสี้ยววินาทีจะมีความสามารถในการ

ทำความเข้าใจเกี่ยวกับเซลล์ที่น้ำดีได้หรือไม่ ดังนั้นบทบาทของ exogenous nitrosation ในการก่อมะเร็งที่น้ำดีจึงยังขาดข้อมูลที่น่าเชื่อถือ

ในอีกด้านหนึ่งรายงานการวิจัยทั้งในคนและสัตว์ทดลองแสดงว่า การอักเสบจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งระบบ HIR และ CMIR ที่ไม่เหมือนกันในแต่ละบุคคล และมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อไป ที่สำคัญคือทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจำนวนมากและมีปฏิกิริยาต่อเนื่องที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA ของเซลล์เยื่อบุที่น้ำดีจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง รวมทั้งก่อให้เกิด endogenous nitrosation เพิ่มขึ้นในบริเวณที่น้ำดีอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาโดยให้อาสาสมัครที่มีพยาธิใบไม้ตับรับประทานวิตามินซีเพื่อพิสูจน์การเกิด endogenous nitrosation พบว่ากระบวนการ endogenous nitrosation ลดลงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ เพราะการลด endogenous nitrosation เป็นการลดความเสียหายที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ได้ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าการให้วิตามินเสริมจะช่วยลดความเสียหายที่เกิดกับเซลล์ที่น้ำดีได้มากน้อยเพียงใด อย่างไรก็ตามในประเด็นนี้ยังต้องการการศึกษาในรายละเอียดอีกหลายประการโดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณที่เหมาะสมของวิตามินซีซึ่งมีบทบาททั้งเป็น anti-oxidant และ pro-oxidant ได้ การเสริมวิตามินซีควรให้เฉพาะกลุ่มเสี่ยงที่มีพยาธิในระดับที่รุนแรงหรือควรให้ทั่วไป

ปัจจัยด้านตัวบุคคลที่ทำให้แต่ละคนมีความไวในการก่อมะเร็งแตกต่างกันเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัจจัยด้านภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับของแต่ละบุคคลซึ่งมีความแตกต่างกัน มีผลให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งที่น้ำดีแตกต่างกันหรือไม่ นอกจากนี้ polymorphism ของเอนไซม์กลุ่ม cytochrome P450 ซึ่งมีบทบาทในการเปลี่ยน nitrosating agent ให้เป็น ultimate carcinogen ขึ้นกับความสามารถและ isoform ของเอนไซม์ที่ตอบสนอง การศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลในเรื่องนี้นอกจากช่วยเติมองค์ความรู้ที่ขาดหายแล้วยังช่วยให้เราสามารถหากกลุ่มคนที่แท้จริงที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นมะเร็งที่น้ำดี เพื่อให้การเฝ้าระวังที่ถูกต้องต่อไป

การศึกษารายงานโดยตรงของตัวพยาธิต่อการก่อมะเร็ง และกลไกการก่อมะเร็งในระดับโมเลกุลที่ยังไม่มีคำตอบควรได้รับการศึกษาอย่างเป็นระบบเพื่อประโยชน์ในการป้องกัน และการรักษาอย่างเจาะจงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Akai-PS; Pungpak-S; Chaicumpa-W; Kitikoon-V; Ruangkunaporn-Y; Bunnag-D; Befus-AD (1995) Serum antibody responses in opisthorchiasis. *Int J Parasitol* **25**(8): 971-973.
- Akai-PS; Pungpak-S; Kitikoon-V; Chaicumpa-W; Bunnag-D; Befus-AD (1992) Separation and characterization of adult worm proteins and glycoproteins from the liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *J Parasitol* **78**: 672-680.
- Albelda, S.M. (1993) Biology of disease. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumour progression and metastasis (review). *La. Invest* **68**: 4-17.
- Anderson BB, Ukah F, Tette A, Villafior SG, Koh D, Seton P. (1992) Primary tumors of the liver. *J Natl Med Assoc* **84**:129-135.
- Apinhasmit W, Sobhon P, Tarasub C, Mothong W, Saitongdee P, Sretarugsa P, Wanichanon C, Upatham ES. (2000) *Opisthorchis viverrini*: ultrastructure and cytochemistry of the glycocalyx of the tegument. *J Helminthol* **2**: 23-29.
- Apinhasmit-W; Sobhon-P; Saitongdee-P; Menayotin-S; Upatham-ES (1994)*Opisthorchis viverrini*: ultrastructure of the tegument of the first-week juveniles and adult flukes. *Int J Parasitol* **24**: 613-621
- Apinhasmit-W; Sobhon-P; Saitongdee-P; Upatham-ES (1993) *Opisthorchis viverrini*: changes of the tegumental surface in newly excysted juvenile, first-week and adult flukes. *Int J Parasitol* **23**: 829-839
- Bhamarapravati N, Thamavit W and Vajrasthira S. (1978) Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. *Am J Med Hyg.* **27**: 787-794.
- Bhamarapravati N, Viranuvatti W. (1966) Liver diseases in Thailand. Analysis of liver biopsies. *Am J Gastroenterol* **45**: 267-276.
- Bishop, J.M. and Weinberg, R.A. Scientific American Molecular Oncology. Scientific American, Inc., New York, 1996, 255 p.
- Bogdan C, RollingM, Diefenbach A. (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opinion Immunol.* **12**: 64-76.
- Boonpucknavig, S., Kurathong, S. and Thamavit, W. (1986) Detection of antibodies in sera from patients with opisthorchiasis. *J Clin Lab Immunol* **19**: 135-137.
- Bos, J.L.(1989) *ras* oncogene in human cancer: A review. *Cancer Res.* **49**:4682-4689.
- Caldas, C., Hahn, S.A., da Costa, L.T. et al.(1994) Frequent somatic mutations and heterozygous deletion of p16 (*MTS1*) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature Genet* **8**: 27-32.
- Chainuvati, T., Paosawadhi, A., Sripranoth, M., Manasatith, S. and Viranuvatti, V. (1976) Carcinoma of the cystic duct associated with opisthorchiasis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* **7**: 482-486.
- Chapman RW. (1999) Risk factors for biliary tract carcinogenesis. *Ann Oncol* **10** (Suppl 4):308-311.
- Chawengkirttikul-R; Sirisinha-S.(1988) Antibodies in serum and bile of hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. *Int J Parasitol* **18**(6): 721-727.
- Chotigeat W and Ruenwongsa P. (1986) Types of collagen in *Opisthorchis viverrini* infected hamster liver. *Mol Biochem Parasitol* **18**: 377-387.
- Cooper, G.M. (1995) *Oncogenes*. 2nd ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston. 384 p.

- El-Deiry, W.S.; Tokino, T.; Waldman, T. et al. (1995) Topological control of p21^{WAF1/CP1} expression in normal neoplastic tissues. *Cancer Res* **55**: 2910-2919.
- Elkins DB; Haswell-Elkins MR; Mairiang E; Mairiang P; Sithithaworn P; Kaewkes S; Bhudhisawasdi V; Uttaravichien T. (1990) A high frequency of hepatobiliary disease and suspected cholangiocarcinoma associated with heavy *Opisthorchis viverrini* infection in a small community in north-east Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**(5): 715-719.
- Elkins DB; Mairiang E; Sithithaworn P; Mairiang P; Chaiyakum J; Chamadol N; Loapaiboon V; Haswell-Elkins MR. (1996) Cross-sectional patterns of hepatobiliary abnormalities and possible precursor conditions of cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis viverrini* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg* **55**(3): 295-301.
- Elkins DB; Sithithaworn P; Haswell-Elkins M; Kaewkes S; Awacharagan P; Wongratanacheewin S. (1991) *Opisthorchis viverrini*: relationships between egg counts, worms recovered and antibody levels within an endemic community in northeast Thailand. *Parasitology* **102** Pt 2: 283-288.
- Flavell DJ and Flavell SU. (1986) *Opisthorchis viverrini*: pathogenesis of infection in immunodeprived hamsters. *Parasit Immunol* **8**: 455-466.
- Flavell DJ and Lucas SB. (1982) Potentiation by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, of the carcinogenic action of N-nitrosodimethylamine upon the biliary epithelium of the hamster. *Br J Cancer* **46**: 985-989.
- Flavell DJ and Lucas SB. (1983) Promotion of N-nitrosodimethylamine-initiated bile duct carcinogenesis in the hamster by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Carcinogenesis* **4**: 927-930.
- Freemont, A.J. (1998) Cell adhesion molecules. *J Clin Pathol Mol Pathol* **51**:175-184.
- Freemont, A.J.; Hoyland, J.A. (1996) Cell adhesion molecules. *J Clin Pathol Mol Pathol* **49**: M321-330.
- Harinasuta T, Riganti M, and Bunnag D. (1984) *Opisthorchis viverrini* infection: pathogenesis and clinical features. *Arzneimittelforschung* **34**: 1167-1169.
- Haswell Elkins MR, Mairiang E, Mairiang P et al. (1994) Cross-sectional study of *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma in communities within a high-risk area in northeast Thailand. *Int J Cancer* **59**: 505-509.
- Haswell Elkins MR, Sithithaworn P, Mairiang E et al. (1991) Immune responsiveness and parasite-specific antibody levels in human hepatobiliary disease associated with *Opisthorchis viverrini* infection. *Clin Exp Immunol* **84**: 213-218.
- Haswell-Elkins MR, Satarug S, Tsuda M et al. (1994) Liver fluke infection and CCA: model of endogenous nitric oxide and extragastric nitrosation in human carcinogenesis. *Mut Res* **305**: 241-252.
- Herrera LA, Ostrosky-Wegman P. (2001) Do helminths play a role in carcinogenesis? *Trends Parasitol* **17**:172-175.
- Herrold KM. (1967) Histogenesis of malignant liver tumors induced by dimethylnitrosamine. An experimental study in Syrian hamsters. *J Natl Cancer Inst* **39**:1099-1111.
- Hitanant S, Trong DT, Damrongsak C et al. (1987) Peritoneoscopic findings in 203 patients with *Opisthorchis viverrini* infection. *Gastrointestl Endos* **33**: 18-20.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53.

- Holzinger F, Zraggen K, Buchler MW. (1999) Mechanisms of biliary carcinogenesis: a pathogenetic multi-stage cascade towards cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* **10** (Suppl 4):122-126.
- Horio, Y.; Chen, A.; Rice, P. *et al.* (1996) Ki-ras and p53 mutations are early events, respectively, in urethane-induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Mol Carcinogenesis* **17**: 217-223.
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welch JA, Wang NJ and Harris CC. (1991) Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* **350**: 427-428.
- Hutadilok N and Ruenwongsa P. (1983) Liver collagen turnover in hamsters during infection by the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Mol Biochem Parasitol* **8**: 71-77.
- IARC. (1994) Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **61**: 121-175.
- Itoh-M; Pairajkul-C; Thamawit-W; Sithithaworn-P; Tiwawech-D; Uttaravicien-T; Shirai-T; Ito-N. (1994) Association of antibodies to *Opisthorchis viverrini* with hepatobiliary disease in northeastern Thailand. *Am J Trop Med Hyg* **51**: 424-429.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. (2000) Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res* **60**:184-190.
- Jaiswal M, LaRusso NF, Shapiro RA, Billiar TR, Gores GJ. (2001) Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. *Gastroenterology* **120**:190-199.
- Janechaiwat, J., Tharavanij, S., Vajrasthira, S. and Chaicumpa, W.(1980) The immunological diagnosis of human opisthorchiasis and the humoral immune response to *Opisthorchis* infection in the hamster. *J Med Assoc Thailand* **63**: 439-447.
- Khosrvi-Far, R.; Der, C.J. (1994) The *ras* signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev* **13**: 67-89.
- Kiba T, Tsuda H, Pairajkul C, Inoue S, Sugimura T and Hirohashi S. (1993) Mutations of the p53 tumour suppressor gene and the *ras* gene family in intrahepatic cholangiocellular carcinomas in Japan and Thailand. *Mol Carcinogenesis* **8**: 312-318.
- Kirby GM, Pelkonen P, Vatanasapt V, Camus AM, Wild CP and Lang MA. (1994) Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. *Mol Carcinogenesis* **11**: 81-89.
- Kiss, A.; Wang, N.J.; Xie, J.P. *et al.* (1997) Analysis of transforming growth factor (TGF)- α /epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth factor/c-met, TGF- β receptor type II, and p53 expression in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **3**: 1059-1066.
- Koompaichana V, Sonakul S, Chinda K and Stitnimankarn T. (1978) Opisthorchiasis: a clinicopathologic study of 154 cases. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **9**: 60-64.
- Kurathong-S; Lerdverasirikul-P; Wongpaitoon-V; Pramoolsinsap-C; Kanjanapitak-A; Varavithya-W; Phuapradit-P; Bunyaratvej-S; Upatham-ES; Brockelman-WY. (1985) *Opisthorchis viverrini* infection and cholangiocarcinoma. A prospective, case-controlled study. *Gastroenterology* **89**: 151-156.

- Lai, S.; Benedict, W.F.; Silver, S.A. et al. (1997) Loss of retinoblastoma gene function and heterozygosity at the RB locus in renal cortical neoplasms. *Hum Pathol* **28**: 693-697.
- Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R et al. (1991) Multiple K-ras mutations in CCA demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res* **51**: 3497-3502.
- Mateo, M.S.; Saez, A.I.; Sanchez-Beato, M. et al. (1997) Expression of p21^{WAF1/CP1} in fetal and adult tissues: simultaneous analysis with Ki67 and p53. *J Clin Pathol* **50**: 645-653.
- Mathew, J.; Hines, J.E.; Obafunwa, J.O. et al. (1996) CD44 is expressed in hepatocellular carcinomas showing vascular invasion. *J Pathol* **179**: 74-79.
- Migasena P and Changbumrung S. (1974) The role of nitrosamines in the cause of primary carcinoma. *J Med Assoc Thai* **57**: 175-178.
- Migasena P, Reaunsuwan W and Changbumrung S. (1980) Nitrates and nitrites in local Thai preserved protein foods. *J Med Asso Thai* **63**: 500-505.
- Mitacek EJ, Brunnemann KD, Hoffmann D, Limsila T, Suttajit M, Martin N, Caplan LS. (1999a) Volatile nitrosamines and tobacco-specific nitrosamines in the smoke of Thai cigarettes: a risk factor for lung cancer and a suspected risk factor for liver cancer in Thailand. *Carcinogenesis* **20**:133-137.
- Mitacek EJ, Brunnemann KD, Suttajit M, Martin N, Limsila T, Ohshima H, Caplan LS. (1999b) Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. *Food Chem Toxicol* **37**:297-305.
- Moore MA, Thamavit W, Tiwawech D, Ito N. Cell death and proliferation in *Opisthorchis viverrini*-DHPN induced carcinogenesis in the Syrian hamster hepatopancreatic axis. In: Columbano et al. (eds) Chemical Carcinogenesis 2. Preum Press, New York, pp. 503-510.
- Oda T, Tsuda H, Scarpa A, Sakamoto M and Hirohashi S. (1992) p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **52**: 6358-6364.
- Ohashi K, Nakajima Y, Kanehiro H et al. (1995) Ki-ras mutations and p53 protein expression in intrahepatic cholangiocarcinoma: Relation to gross tumour morphology. *Gastroenterology* **109**: 1612-1617.
- Ohnishi, T.; Tomita, N.; Monden, T. et al. (1997) A detailed analysis of the role of K-ras gene mutation in the progression of colorectal adenoma. *Br J Cancer* **75**: 341-347.
- Ohshima H, Bandaletova TY, Brouet I et al. (1994) Increased nitrosamine and nitrate biosynthesis mediated by nitric oxide synthase induced in hamsters infected with liver fluke (*Opisthorchis viverrini*). *Carcinogenesis* **15**: 271-275.
- Parkin-DM; Srivatanakul-P; Khlai-M; Chenvidhya-D; Chotiwan-P; Insiripong-S; L'Abbe-KA; Wild-CP. (1991) Liver cancer in Thailand. I. A case-control study of cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* **48**(3): 323-328.
- Parkin DM, Whelan J, Ferlay J, Raymond L, Young J. (1997) *Cancer Incidence in Five Continents*, Vol. VII, Scientific Publications No. 143. International Agency of Research on Cancer, Lyon.
- Riganti, M., Pungpak, S., Punpoowong, B., Bunnag, D. and Harinasuta, T. (1989) Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection: a comparison of adults and children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **20**: 95-100.

- Rozenblum, E.; Schutte, M.; Goggins, M. et al. (1997) Tumor suppressive pathway in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* **57**: 1731-1734.
- Ruggeri, B.A.; Huang, L.; Berger, D. et al. (1997) Molecular pathology of primary and metastatic ductal pancreatic lesions. Analysis of mutations and expression of the p53, mdm-2, and p21^{WAF1/CP1} genes in sporadic and familial lesions. *Cancer* **79**: 700-716.
- Satarug S, Haswell-Elkins MR, Sithithaworn P, et al. (1998) Relationships between the synthesis of N-nitrosodimethylamine and immune responses to chronic infection with the carcinogenic parasite, *Opisthorchis viverrini*, in men. *Carcinogenesis* **19**: 485-491.
- Satarug S, Haswell-Elkins MR, Tsuda M et al. (1996a) Thiocyanate-independent nitrosation in humans with carcinogenic parasite infection. *Carcinogenesis* **17**: 1075-1081.
- Satarug S, Lang MA, Yongvanit P et al. (1996b) Induction of cytochrome P450 2A6 expression in humans by the carcinogenic parasite infection, opisthorchiasis viverrini. *Cancer Epid Biomarkers Prev* **5**: 795-800.
- Sher, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science* (Washington DC) **274**: 1672-1677.
- Sirisinha-S; Chawengkirtikul-R; Haswell-Elkins-MR; Elkins-DB; Kaewkes-S; Sithithaworn-P. (1995) Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Opisthorchis viverrini* infection in an endemic area. *Am J Trop Med Hyg* **52**: 521-524.
- Sirisinha-S; Tuti-S; Vichasri-S; Tawatsin-A. (1983) Humoral immune responses in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **14**(2): 243-251.
- Sobhon P, Apinhasmit W. (1995) *Opisthorchis viverrini*: the tegumental cytoskeleton. *Int J Parasitol* **25**:787-796.
- Sobhon-P; Wanichanond-C; Saitongdee-P; Koonchornboon-T; Bubphaniroj-P; Upatham-ES; Puengtornwatanakul-S; Sirisinha-S. (1986) Scanning electron microscopic study of *Opisthorchis viverrini* tegument and its alterations induced by amoscanate. *Int J Parasitol* **16**(1): 19-26.
- Sonakul D, Koornpirochana C, Chinda K, Stitnimankarn T. (1978) Hepatic carcinoma with opisthorchiasis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* **9**: 215-219.
- Sripa B, Haswell-Elkins MR, Sinawat P, Elkins DB. (1995) Quantitative analysis of inflammatory cell infiltration in *Opisthorchis*-associated cholecystitis. Abstract in the Proceeding of the 11th Conference of the Faculty of Medicine. Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. October 11-13, p.315.
- Sripa B, Kaewkes S. (2000a) Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. *Parasite Immunol* **22**:139-145.
- Sripa B, Kaewkes S. (2000b) Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. *Int J Parasitol* **30**:735-740.
- Srivatanakul-P; Viyanant-V; Kurathong-S; Tiwawech-D. (1985) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Opisthorchis viverrini* infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **16**(2): 234-239.
- Stitnimankarn T, Thagerngpol K, Damrongsak C, Chinapak O, Sindhvananda K. (1978) Ultrastructure of cholangiocarcinoma associated with opisthorchiasis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* **9**: 558-567.

- Suzuki H, Isaji S, Pairojkul C, Uttaravichien T. (2000) Comparative clinicopathological study of resected intrahepatic cholangiocarcinoma in northeast Thailand and Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **7**:206-211.
- Tada M, Omata M and Ohto M. (1992) Incidence of *ras* gene mutation in intrahepatic CCA. *Cancer* **69**: 1115-1118.
- Tada M, Yokosuka O and Omata M. (1990) Analysis of *ras* gene mutations in human intrahepatic malignant tumour by polymerase reaction and direct sequencing. *Cancer Research* **50**: 1121-1124.
- Tahara, E. (1993) Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* **119**: 265-272.
- Tahara, E. (1995) Genetic alterations in human gastrointestinal cancers: The application in molecular diagnosis. *Cancer* **75** (Suppl.): 1410-1417.
- Tahara, E.; Semba, S.; Tahara, H. (1996) Molecular biological observations in gastric cancer. *Sem Oncol* **23**: 307-315.
- Tamir S, Tannenbaum SR. (1996) The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* **1288**:F31-36.
- Tamura, K.; Zhang, X.; Murakami, Y. et al. (1997) Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* (Pred. Oncol.) **74**: 45-49.
- Tansurat P. (1971) Opisthorchiasis In: Marcial-Rojas, R.A. (ed). *Pathology of protozoal and helminthic diseases*, Williams and Wilkins, Baltimore. pp 536-545.
- Tarin, D.; Matsumara, Y. (1993) Deranged activity of the CD44 genes and other loci as biomarkers for progression to metastatic malignancy. *J Cell Biochem* **17G**(Suppl.) : 173-185.
- Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S. (1978) Effects of dimethylnitrosamine on induction of CCA in *Opisthorchis viverrini* infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res* **38**: 4634-4639.
- Thamavit W, Pairojkul C, Tiwawech D, Shirai T, Ito N. (1994) Strong promoting effect of *Opisthorchis viverrini* infection on dimethylnitrosamine-initiated hamster liver. *Cancer Lett* **78**: 121-125.
- Thamavit-W; Kongkanuntn-R; Tiwawech-D; Moore-MA. (1987) Level of *Opisthorchis* infestation and carcinogen dose-dependence of cholangiocarcinoma induction in Syrian golden hamsters. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **54**(1): 52-58.
- Thamavit-W; Moore-MA; Hiasa-Y; Ito-N. (1988) Generation of high yields of Syrian hamster cholangiocellular carcinomas and hepatocellular nodules by combined nitrite and aminopyrine administration and *Opisthorchis viverrini* infection. *Jpn J Cancer Res* **79**(8): 909-916.
- Thamavit-W; Moore-MA; Ruchirawat-S; Ito-N. (1992) Repeated exposure to *Opisthorchis viverrini* and treatment with the antihelminthic Praziquantel lacks carcinogenic potential. *Carcinogenesis* **13**(2): 309-311.
- Thamavit W, Boonpucknavig V, Boonpucknavig S, Moore MA, Ito N. (1992) Secondary enhancing effect of *Opisthorchis viverrini* infection on the development of hepatocellular nodules in Syrian golden hamsters initiated with diethylnitrosamine. *Thai J Toxicol* **8**: 35-40.
- Tsuda H, Satarug S, Bhudhisawasdi V, Kihana T, Sugimura T and Hirohashi S. (1992) Cholangiocarcinoma in Japanese and Thai patients: difference in etiology and

- incidence of point mutation of the c-K-ras proto-oncogene. *Mol Carcinogenesis* **6**: 266-269.
- Vatanasapt V, Sripa B, Sithithaworn P, Mairiang P. (1999) Liver flukes and liver cancer. *Cancer Surv* **33**: 313-343.
- Viranuvatti V, Mettiyawongse S. (1953) Observations on two cases of opisthorchiasis in Thailand. *Ann trop Med Parasitol* **47**: 291-293.
- Viranuvatti V and Stitnimankarn T. (1972) Liver fluke infection and infestation in Southeast Asia. In: Popper H and Schaffner F (eds). *Progress in Liver Diseases*, Grune and Stratton, New York. pp 537-547.
- Voravud, N.; Foster, C.S.; Gilbertson, J.A. et al. (1989) Oncogene expression in cholangiocarcinoma and in normal hepatic development. *Hum Pathol* **20**: 1163-1168.
- Waga, S.; Hannon, G.J.; Beach, D. et al. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinase controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**: 574-576.
- Wattanasirichaigoon S, Tasanakhajorn U, Jesadapatarakul S. (1998) The incidence of K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinoma detected by polymerase chain reaction technique. *J Med Assoc Thai* **81**: 316-323.
- Wongratanacheewin-S; Bunnag-D; Vaeusorn-N; Sirisinha-S. (1988) Characterization of humoral immune response in the serum and bile of patients with opisthorchiasis and its application in immunodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg* **38**: 356-362
- Wongratanacheewin-S; Chawengkirttikul-R; Bunnag-D; Sirisinha-S. (1988) Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens by immunoprecipitation and polyacrylamide gel electrophoresis. *Parasitology* **96** (Pt 1): 119-128.
- Wongratanacheewin-S; Rattanasiriwilai-W; Priwan-R; Sirisinha-S. (1987) Immunodepression in hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. *J Helminthol* **61**: 151-156.
- Wongratanacheewin-S; Sirisinha-S. (1987) Analysis of *Opisthorchis viverrini* antigens: physicochemical characterization and antigen localization. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **18**(4): 511-520.
- Yasui, W.; Akama, Y.; Kuniyasu, H. et al. (1996) Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21^{WAF1/CP1} in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol* **180**: 122-128.
- Yeo CJ, Pitt HA, Cameron JL. (1990) Cholangiocarcinoma. *Surg Clin North Am* **70**:1429-1447.
- Yongvanit P, Cha-on U, Sithithaworn P. (1997) Effect of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infection on CYP2A8/9 and CYP2E1 activities in hamsters. *FASEB Journal* **11**: A1436.
- Yongvanit P, Puangpornpitak D, Kampan J, Sripa B, Tassaneeyakul W, Seow O. (2000) Induction of nitric oxide synthase and activities of cytochrome P450 2E1, 2A6 in cholangiocarcinoma liver tissue. A poster abstract presented in 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 16-20 July, Birmingham, UK.
- Yoshida S, Todoroki T, Ichikawa Y et al. (1995) Mutations of p16^{Ink4}/CDNK2 and p15^{Ink4B}/MTS2 genes in biliary tract cancers. *Cancer Res* **55**: 2756-2760.
- Zhang, X.; Xu, H.J.; Murakami, Y. et al. (1994) Deletion of chromosome 13q, mutations in Retinoblastoma 1 and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **54**: 4177-4182.

บทที่ 4

การสืบค้นเพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระยะต้น

การสืบค้นเพื่อการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มต้นถือว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการลดอัตราการเสียชีวิตเนื่องจากโรคมะเร็งท่อน้ำดี สำหรับการวินิจฉัยนี้ ต้องประกอบด้วย 2 องค์ประกอบที่สำคัญคือ

การตรวจพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บุผนังท่อน้ำดีเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจตรวจได้โดยการตรวจในกระแสเลือดหรือในน้ำดี

การตรวจหาตำแหน่งที่เกิดมีการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งในระบบท่อน้ำดี

การตรวจหาการเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บุผนังท่อน้ำดีเป็นเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาในหนู Hamster (Prempracha et al., 1994) พบว่ามี Antigen ชนิดหนึ่งซึ่งสัมพันธ์กับการเริ่มเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในหนูที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ Antigen นี้เป็นสาร glycoprotein ที่มีขนาด 200 kDa และมีความแตกต่างในการทดสอบทาง Immunology จาก tumour marker ชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน ปริมาณสาร antigen นี้ตรวจพบทั้งใน serum และในน้ำดี และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามขนาดของก้อนมะเร็ง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการใช้ Antigen นี้ในการตรวจหาการเริ่มเกิดเป็นมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วย

การตรวจหาตำแหน่งที่เกิดมีการเปลี่ยนแปลงเป็นมะเร็งในระบบท่อน้ำดี

ในปัจจุบัน แม้ว่าการตรวจหามะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้เอกซเรย์คอมพิวเตอร์หรือการตรวจด้วยคลื่นแม่เหล็ก (Magnetic resonance imaging – MRI) จะมีอัตราความถูกต้องในการตรวจหามะเร็งสูงถึง 90% (Maetani et al., 2001, Park et al., 2001) แต่การตรวจหามะเร็งท่อน้ำดีที่เพิ่งเริ่มเกิดซึ่งจะมีขนาดเล็กมากๆ นั้น ยังไม่สามารถตรวจหาได้ด้วยวิธีดังกล่าว นอกจากนี้ จากการที่ระบบท่อน้ำดีภายในตับมีความซับซ้อนและแตกออกเป็นถึง 8 แขนง ทำให้การตรวจหาตำแหน่งของมะเร็งจำต้องอาศัยการตรวจที่ให้ภาพเป็น 3 มิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หากจะมีการผ่าตัดเอามะเร็งเริ่มต้นนั้นๆ ออก ยังอาจต้องอาศัยการตรวจที่สามารถทำได้ในห้องผ่าตัดช่วยเสริม

แม้ว่าในปัจจุบัน ผลงานวิจัยเกี่ยวกับการสืบค้นหามะเร็งท่อน้ำดีในระยะแรกเริ่มในผู้ป่วยที่มีพยาธิใบไม้ตับยังมีน้อยมากและยังไม่มีงานวิจัยใดๆ ที่สามารถนำมาใช้ในผู้ป่วยได้ชัดเจน การตรวจหา Antigen ดังกล่าวข้างต้น และการที่สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma cell line) ย่อมทำให้มีโอกาสที่จะวิจัยเพื่อหาทางค้นหามะเร็งท่อน้ำดีในระยะเริ่มแรกได้ (Sirisinha et al., 1991, Tengchaisri et al., 1995)

เอกสารอ้างอิง

Maetani Y, Itoh K, Watanabe C, Shibata T, Ametani F, Yamabe H, Konishi J (2001). MR imaging of intrahepatic cholangiocarcinoma with pathologic correlation. *Am J Roentgenol* **176**: 1499-1507.

Park SJ, Han JK, Kim TK, Choi BI (2001). Three-dimensional spiral CT cholangiography with minimal intensity projection in patients with suspected obstructive biliary disease: comparison with percutaneous transhepatic cholangiography. *Abd Imaging* **26**: 281-286.

Prempracha N, Tengchaisri T, Chawengkirttikul R, Boonpucknavig S, Thamavit W, Duongchawee G, Siririshinha S. (1994) Identification and potential use of a soluble tumor antigen for the detection of liver-fluke associated cholangiocarcinoma induced in a hamster model. *Int J Cancer* **57**: 691-695.

Siririshinha S, Tengchaisri T, Boonpucknavig S, Prempracha N, Ratanarapee S, Pausawasdi A. (1991) Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line from a Thai patient with intrahepatic bile duct cancer. *Asian Pacific J Allergy Immunol* **9**: 153-157.

Tengchaisri T, Prempracha N, Thamavit W, Boonpucknavig S, Sriurairatana S, Siririshinha S. (1995) Establishment and characterization of cell lines from liver fluke-associated cholangiocarcinoma induced in a hamster model. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **26**: 231-239.

บทที่ 5

การรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดี

การรักษาโรคมะเร็งโดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทหลักคือ การรักษาเพื่อให้หายขาดจากโรค (Curative treatment) และการรักษาเพื่อประทุ้งอาการหรือประคับประคอง (Palliative treatment) ในปัจจุบัน การรักษาเพื่อให้หายขาดจากโรคมะเร็งนั้น สามารถกระทำได้โดยการผ่าตัดเท่านั้น และเมื่อได้รับการผ่าตัดรักษาแล้ว ผู้ป่วยอาจจำเป็นต้องได้รับการรักษาเสริม (Adjuvant treatment) เพื่อให้ผลการผ่าตัดดีขึ้น ส่วนการรักษาแบบประคับประคอง มีตั้งแต่การฉายยา การใช้รังสีรักษา หรือการใช้วิธีการอื่นๆ รวมทั้งการผ่าตัดที่ไม่สามารถเอาก้อนมะเร็งออกได้หมด เพื่อความสะดวกในการอธิบาย การรักษาในบทนี้ จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือการรักษาโดยการผ่าตัดและการรักษาโดยวิธีอื่นที่ไม่ใช่การผ่าตัด

การผ่าตัดรักษา

การรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีโดยการผ่าตัดเป็นวิธีการเดียวที่อาจทำให้ผู้ป่วยหายขาดจากโรคหรือมีผลให้ผู้ป่วยมีอายุยืนยาว อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่มีเกี่ยวกับการผ่าตัดรักษาในปัจจุบันซึ่งทำให้ผลการผ่าตัดไม่ดีเท่าที่ควร ได้แก่

พยาธิวิทยาของมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยที่มีพยาธิใบไม้ตับ

พยาธิสภาพที่พบในตับของสัตว์ทดลอง (โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหนู Hamster) และในผู้ป่วยมีความคล้ายคลึงกันคือ ตัวพยาธิก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบของท่อน้ำดีเล็กๆ ภายในตับ (Second-order bile duct) และรอบๆ หลอดเลือด Portal vein ภายในเนื้อตับ ผลจากการอักเสบดังกล่าวทำให้เซลล์บุผนังท่อน้ำดี มีการตายและตามด้วยการแบ่งตัว (Hyperplasia) จนเริ่มเกิดการกลายเป็นเนื้องอกขึ้น (Adenomatous formation) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นหลายๆ จุดในเนื้อตับ (Thamavit et al., 1978) เซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ มีโอกาสที่จะกลายเป็นมะเร็งท่อน้ำดีสูง จึงอธิบายถึงการพบมะเร็งหลายๆ ตำแหน่งในผู้ป่วยเหล่านี้ได้ รวมทั้งอธิบายถึงการที่พบผู้ป่วยจำนวนหนึ่งซึ่งแม้ได้รับการผ่าตัดเอาตับและก้อนมะเร็งออก มีอุบัติการณ์การเกิดใหม่ของมะเร็งท่อน้ำดีสูง

ระยะของโรคขณะที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษา

รายงานการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีพยาธิใบไม้ตับร่วมด้วย ทั้งจากคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่นและคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (Uttaravichien & Buddhisawasdi, 1990; Watanapa, 1996) พบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีโรคมะเร็งที่อยู่ในระยะที่ไม่สามารถทำให้หายขาดจากโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่มีมะเร็งของท่อน้ำดีภายนอกตับ (Central type of cholangiocarcinoma) การผ่าตัดที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เป็น Non-curative resection ซึ่งเมื่อ

พิจารณาจากความจริงที่ว่า ผู้ป่วยแทบทั้งหมดเป็นชาวนาหรือผู้ที่อยู่ในฐานะทางเศรษฐกิจไม่ดี จะมาพบแพทย์ต่อเมื่อมีอาการจนไม่สามารถปฏิบัติงานได้ ส่วนใหญ่มาพบเมื่อมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง หรือก้อนมะเร็งในตับมีขนาดใหญ่โตมาก

การระบุตำแหน่งของมะเร็งท่อน้ำดีในตับ

ในปัจจุบัน เทคนิคการตรวจหาตำแหน่งมะเร็งท่อน้ำดีในตับ ยังขาดความแม่นยำที่ดีพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีก้อนมะเร็งมีขนาดเล็ก หรืออยู่ภายในบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากกระบวนการอักเสบที่เกิดจากตัวพยาธิใบไม้ตับ ศัลยแพทย์จำต้องผ่าตัดเอาเนื้อตับออกจำนวนมากเพื่อให้แน่ใจว่าสามารถเอามะเร็งออกหมด นอกจากนี้ บางตำแหน่งที่พบมีมะเร็งหากอยู่ด้านหลังของตับ เช่น บริเวณ Segment VII หรือ VIII โดยเหตุผลทางเทคนิค ศัลยแพทย์ก็ยังจำเป็นต้องตัดเนื้อตับออกปริมาณมาก ยังไม่มีเทคโนโลยีที่สามารถตัดเอาเนื้อตับส่วนนั้นๆ ออกเป็นการเฉพาะ

วัฒนธรรมและความเชื่อของประชาชนกลุ่มเสี่ยง

ในปัจจุบัน ประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวนหนึ่ง ยังมีความเชื่อว่า การผ่าตัดทำให้โรคเป็นรุนแรงมากขึ้น หรือทำให้มะเร็งกระจายเร็วขึ้น ดังนั้น จึงมักไม่มาพบแพทย์ หรือแม้กระทั่งปฏิเสธการผ่าตัดในช่วงที่การผ่าตัดอาจสามารถกำจัดมะเร็งออกได้หมด รอจนกระทั่งมีอาการถึงขนาดทนไม่ได้ จึงค่อยเข้ารับการรักษา ยิ่งเมื่อเกิดภาวะแทรกซ้อนจากการผ่าตัดตับ (ซึ่งอัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนย่อมแปรตามขนาดของก้อนมะเร็งและสภาพการทำงานของตับ) ชาวคราวดังกล่าวก็จะกระจายออกไป ทำให้ผู้ป่วยรายอื่นๆ ยิ่งไม่กล้าเข้ารับการรักษา

การรักษาเสริม

เป็นที่ยอมรับกันว่า การผ่าตัดในโรคมะเร็งหลายประเภทไม่สามารถกำจัดเซลล์มะเร็งออกได้หมด จำต้องมีการรักษาเสริม เช่น การให้เคมีบำบัด การฉายรังสี เป็นต้น การรักษาเสริมเหล่านี้ ล้วนมีค่าใช้จ่ายสูง และจำเป็นต้องติดตามผู้ป่วยอย่างใกล้ชิด รวมทั้งคอยเฝ้าสังเกตภาวะแทรกซ้อนจากการรักษา สำหรับโรคมะเร็งท่อน้ำดีนี้ การรักษาเสริม ยังขาดวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพ รายงานการศึกษาในวารสารการแพทย์ต่างๆ ยังสรุปตรงกันว่า ผลการรักษาเสริมไม่ดี ประกอบกับผู้ป่วยแทบทั้งหมด ไม่สามารถเข้ารับการรักษาเสริมได้ ดังนั้น ผู้ป่วยแทบทั้งหมดจึงไม่ได้รับการให้การรักษาเสริมในปัจจุบัน

(Uttaravichien & Buddhisawasdi, 1990; Watanapa, 1996)

ผลการผ่าตัดรักษา

ในปัจจุบัน มีเพียง 2 รายงานที่สรุปผลการผ่าตัดรักษาทั้งระยะสั้นและผลระยะยาวในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีโรคพยาธิใบไม้ตับร่วมด้วย รายงานจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในผู้ป่วย 29 รายที่มีมะเร็งในตับ (Peripheral type of cholangiocarcinoma) และไม่มีอาการดีซ่าน พบว่าผู้ป่วย 21 รายมีมะเร็งอยู่เฉพาะในตับกลีบขวา ผู้ป่วย 7 รายมีมะเร็งอยู่เฉพาะในตับกลีบซ้าย มีผู้ป่วย 1 รายที่มีมะเร็งอยู่ในตับทั้ง 2 กลีบ ภายหลังการผ่าตัดเอามะเร็งพร้อมตับออกบางส่วน ผู้ป่วย 14 รายเสียชีวิต

ชีวิตภายใน 1 ปี ผู้ป่วย 5 รายเสียชีวิตภายในปีที่ 2 และอีก 5 รายเสียชีวิตภายในปีที่ 3 หลังการผ่าตัด มีผู้ป่วย 5 รายที่มีชีวิตจนถึงปลายปีที่ 5 หลังการผ่าตัด สรุปได้ว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี (5-year survival rate) คือ 17% (Uttaravichien & Buddhisawasdi, 1990) รายงานจากคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในผู้ป่วย 30 รายที่มีมะเร็งท่อน้ำดีบริเวณขั้วตับ (Central type of cholangiocarcinoma) โดยกำหนดเงื่อนไขที่ระบุว่าเป็นมะเร็งที่สัมพันธ์กับโรคพยาธิใบไม้ตับคือ 1) มีประวัติเคยตรวจพบพยาธิใบไม้ตับหรือไข่ของพยาธิใบไม้ตับมาก่อน; 2) ตรวจพบมีตัวหรือไข่ของพยาธิใบไม้ตับในอุจจาระหรือในน้ำดีของผู้ป่วยขณะรับการรักษา; 3) จากการฉีดสีเข้าไปในระบบทางเดินน้ำดีในตับ พบมีลักษณะเป็นลูกปัด (Bead-like appearance) ที่เฉพาะเจาะจงกับโรคมะเร็งท่อน้ำดีในตับในผู้ป่วยที่มีโรคพยาธิใบไม้ตับ; 4) ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาพบมีตัวหรือไข่พยาธิใบไม้ตับในมะเร็งหรือเนื้อตับที่ตัดไป ในรายงานนี้ ผู้ป่วย 7 รายได้รับการผ่าตัดเอามะเร็งออก โดย 4 รายได้รับการผ่าตัดเอาตับออกบางส่วนด้วย (อัตราการตัดมะเร็งออกได้ – Resectability rate – คือ 23%) ผู้ป่วย 22 รายได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนทางเดินน้ำดีโดยนำลำไส้ไปต่อกับทางเดินน้ำดี ผู้ป่วยที่ได้รับการตัดเอามะเร็งออก มีอัตราการรอดชีวิตที่ 1 ปีหลังผ่าตัดคือ 86% และที่ 2 ปีหลังผ่าตัดคือ 43% ผู้ป่วยทั้งหมดเสียชีวิตภายใน 3 ปี สำหรับผู้ที่ได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนทางเดินน้ำดี (ไม่ได้ตัดมะเร็งออก) มีอัตราการรอดชีวิตที่ 1 ปีหลังผ่าตัดคือ 26% และไม่มีผู้ที่ยูรอดเกิน 2 ปีเลย โดยเฉลี่ยผู้ป่วยกลุ่มนี้มีชีวิตนาน 8 เดือนหลังผ่าตัด (Watanapa, 1996)

พิจารณาจากข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบัน สามารถสรุปได้ว่า การผ่าตัดอย่างเดียว ไม่น่าจะสามารถแก้ปัญหาผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีที่มีพยาธิใบไม้ตับร่วมด้วย การแก้ไขแนวความคิดหรือวัฒนธรรมของประชาชนกลุ่มเสี่ยงย่อมมีความสำคัญต่อผลการผ่าตัดรักษา ในด้านปัญหาเกี่ยวกับการผ่าตัด ยังคงต้องหาเทคโนโลยีที่สามารถระบุตำแหน่งมะเร็งที่มีขนาดเล็กให้ได้อย่างแม่นยำและมีวิธีการตัดเฉพาะส่วนนั้นๆ ออก นอกจากนี้การคิดค้นการรักษาเสริมที่เหมาะสมกับสภาพของโรคและสภาพของผู้ป่วยมีความจำเป็นต่อการเพิ่มประสิทธิผลการผ่าตัดรักษา

การพัฒนาสมุนไพรเพื่อการรักษาและป้องกันมะเร็งท่อน้ำดี

โรคมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคอีสานมีอุบัติการณ์ค่อนข้างสูง (Vatanasapt et al., 1995) ปัจจัยเสริมของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในภาคอีสานของประเทศไทยที่สำคัญคือ การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* ร่วมกับการได้รับสารก่อมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *N-nitroso* compounds ซึ่งปะปนอยู่ในอาหารที่เป็นอาหารพื้นเมืองที่คนอีสานรับประทานเป็นประจำ หรือถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มขึ้นในร่างกายในขณะที่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น (Kiba et al., 1993; IARC, 1994) สมมติฐานของกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีดังแสดงในรูปที่ 1 (Vatanasapt et al., 1999)

พอสรุปได้ว่าการทำลายเยื่อหุ้มท่อทางเดินน้ำดี และกระบวนการอักเสบเกิดขึ้นเนื่องจากตัวพยาธิและ/หรือสารคัดหลั่งจากพยาธิ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันทำให้มีการหลั่งสาร cytokines และอนุมูลอิสระเป็นผลให้มีสารก่อมะเร็งเกิดขึ้นในร่างกายซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลาย DNA ในขณะเดียวกันอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถยับยั้งกระบวนการซ่อมแซม DNA ทำให้เกิดความผิดปกติอย่างถาวรและนำไปสู่การเกิดมะเร็งในที่สุด

การรักษาแผนปัจจุบัน

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าการผ่าตัดเป็นการรักษาที่เป็นทางเลือกสำหรับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งในระยะ III, IV (Terblance, 1994) การรักษาด้วยยาเคมีบำบัด (chemotherapy) เช่น 5-fluorouracil, mitomycin C หรือ cisplatin ได้ผลค่อนข้างต่ำและเป็น partial response (Falkson *et al.*, 1984; Okada *et al.*, 1994) การรักษาด้วยยาอาจได้ผลดีขึ้นในกรณีที่ให้ยาาร่วมกัน (Sanz-Altamira *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดมักมีข้อจำกัดเนื่องจากอาการพิษของยา จึงได้มีความพยายามที่จะหาสาร/ยาที่มีผลต่อมะเร็งท่อน้ำดีมากขึ้นและมีอาการพิษต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้ในด้าน การป้องกัน/บรรเทา มะเร็งในระยะแรก ๆ (ระยะ I, II ซึ่งเป็นระยะที่รักษาให้หายขาดได้) การใช้สมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจและศึกษามากขึ้น

การใช้สมุนไพรในการป้องกัน/รักษามะเร็งท่อน้ำดี

เป็นที่ทราบกันดีว่าสมุนไพรเป็นแหล่งของยาที่สำคัญ และจากการที่พบว่าสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรมีหลากหลายชนิดและบางชนิดมีฤทธิ์อย่างกว้างขวาง ทำให้มีการนำสมุนไพรมาใช้ในการป้องกัน/รักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเรื้อรัง ซึ่งรวมถึงโรคมะเร็ง (Pezzuto, 1997) ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานที่แสดงว่าสามารถใช้สมุนไพรรักษามะเร็งท่อน้ำดีอย่างได้ผล

การศึกษาเพื่อหาสมุนไพรในการป้องกัน/บรรเทา/รักษามะเร็งท่อน้ำดี ควรให้ความสนใจสมุนไพรที่มีสารที่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ที่สัมพันธ์กับกลไกการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี เช่น ฤทธิ์ด้านการอักเสบ (antiinflammatory), antioxidant, immunomodulator และ cytotoxicity สมุนไพรที่มีฤทธิ์ใน 3 กลุ่มแรกจะมีผลต่อการป้องกันการเกิดมะเร็ง ในขณะที่สมุนไพรที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์จะมีผลต่อการรักษา สารจากธรรมชาติ/สมุนไพรหลายกลุ่มมีฤทธิ์ดังกล่าว เช่น phenolic compounds, alkaloids, terpenoids, carotenoids เป็นต้น ดังนั้นการนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษามะเร็งท่อน้ำดีย่อมมีโอกาสเป็นไปได้สูง ในที่นี้จะขอทบทวนหลักการและตัวอย่างสมุนไพรที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการป้องกัน/

รักษามะเร็ง เพื่อเป็นแนวทางในการนำมาศึกษาหายา/สารที่มีผลในการป้องกัน/รักษามะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

สมุนไพรที่ศักยภาพในการป้องกันและรักษามะเร็งท่อน้ำดี

Phenolic compounds

Phenolic compounds คือสารที่มีสูตรโครงสร้างมี OH group บน aromatic ring ตั้งแต่ 1 กลุ่มขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผักและผลไม้ทั่วไป อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ (1) simple phenols/phenolic acid และอนุพันธ์ เช่น gallic acid, ellagic acid, tannic acid, vanillin, catechol, resorcinol, salicylic acid เป็นต้น สารกลุ่มนี้พบได้ในผลไม้หลายชนิด เช่น raspberry, blackberry เป็นต้น (2) phenylpropanoids ได้แก่ phenolic compounds ที่ aromatic ring มี three-carbon side chain เกาะอยู่ แยกย่อยออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ hydroxycinnamic acids (เช่น ferulic acid, caffeic acid, coumaric acid), coumarins (เช่น umbelliferone, scopoletin, aesculetin, psoralen), lignans (เช่น pinoresinol, eugenol, myristicin) พบได้ใน apples, pears, coffee เป็นต้น และ (3) flavonoids เป็นกลุ่มสำคัญของ phenolic compounds ได้แก่สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น C6-C3-C6 แยกย่อยออกได้เป็นหลายกลุ่ม ได้แก่ catechins, proanthocyanins, anthocyanidins, flavones, flavonols, flavonones และ isoflavones

Flavonoids พบได้อย่างกว้างขวางทั้งพืช ผัก ผลไม้รวมทั้งเครื่องดื่มที่เตรียมจากพืช เช่น ชา (ตารางที่ 1) (Hertog and Katan, 1998) ซึ่งมี catechins อยู่ถึงร้อยละ 30 ของน้ำหนักแห้งและเชื่อว่าเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์เป็น antioxidant และ cancer chemoprevention กลุ่ม anthocyanins เป็นสารที่มีสีในพืช ส่วนกลุ่ม flavones, flavonols และอื่นๆ เช่น isoflavones พบได้ทั่วไปและเชื่อว่าเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (Agarwal and Mulkhtar, 1996; Newmark, 1996; Hertog and Katan, 1998)

ตารางที่ 1. Classes of flavonoids and their dietary sources

Class	Typical sources	Representative (aglycone)
Flavonols	Tea, onions, red wine, fruit	Quercetin
Flavones	Vegetables, citrus fruits	Apigenin
Flavanones	Citrus fruit	Hesperitin
Anthocyanidins	Berries, colored fruit	Cyanidin
Catechins	Tea, wine	Epigallocatechin

Isoflavonoids	Legumes	Genistein
---------------	---------	-----------

มีรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ของ phenolic compounds อย่างมากมาย รวมทั้งฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Hertog and Katan, 1998) ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากผลรวมของหลายๆ ปฏิกริยา (multifunctional activities) ดังตัวอย่างของ quercetin ใน ตารางที่ 2 (Newmark, 1996)

ตารางที่ 2. Multifunctional activity of phenolics: quercetin

Antioxidant	Lipids, membranes
Anti-mutagen	Electrophilic trapping (PAH, heterocyclic amines)
Anti-eicosanoids	Inhibition of lipoxygenase and cyclooxygenase
Anti-protein kinases	Inhibitor of tyrosine, protein and other kinases
Anti-nitrosation	Inhibitor of nitrosation of amines, amides

กลไกต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 ล้วนมีบทบาทในการต้านกระบวนการก่อมะเร็ง ซึ่งในการทบทวนวรรณกรรมนี้จะขอกล่าวถึงเพียงคร่าว ๆ ได้แก่

Antioxidant activity

จากที่ทราบว่าอนุมูลอิสระ (free radicals) ไม่ว่าจะเป็นชนิด reactive oxygen species (ROS: O_2^- , OH^- , H_2O_2 , $HOCl$) หรือ reactive nitrogen species (RNS: NO , $OONO_2^-$) เป็นสารที่ไม่คงตัวและสามารถทำลายเซลล์ได้ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งจะก่อให้เกิดความผิดปกติของเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีน และดีเอ็นเอ (Pacifci and Davies, 1991) เชื่อว่าคุณสมบัติเหล่านี้เป็นกลไกที่สำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง (initiation process) ปัจจุบันมีรายงานการทดลองยืนยันว่าสาร phenolic compounds หลายตัวที่มีฤทธิ์ antioxidant และมีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วย (Middleton, 1998; Premalantha and Sachdanandam, 1999; Owen et al, 2000) ในกรณี caffeic, ferulic acid หรือสารที่มีความสามารถในการแย่ง (compete) กับ electrophile ในการจับกับดีเอ็นเอ ซึ่งถือเป็นขั้นตอนที่สำคัญของกระบวนการเกิดมะเร็ง จะเรียกสารเหล่านี้ว่า antimutagen (Kim *et al.*, 1999)

Arachidonic metabolism modulation

สารที่มีฤทธิ์ต้าน arachidonic metabolism นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการต้านกระบวนการอักเสบแล้ว ปัจจุบันยังได้รับความสนใจในการนำมาใช้เพื่อป้องกันการเกิดมะเร็ง (chemo-prevention) (Newmark, 1996) มีรายงานว่า non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) หลายตัว เช่น sulindac, piroxicam, indomethacin และ aspirin มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดมะเร็งในสัตว์

ทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมี โดยเชื่อว่าอาจจะเป็นผลจากการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ซึ่งเป็นกลไกหลักในการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่ม NSAIDs (Newmark, 1996)

สารกลุ่ม phenolic compounds หลายตัว เช่น quercetin, eugenol, curcumin และ green tea มีฤทธิ์ยับยั้ง arachidonic metabolism ได้เช่นกันและมีฤทธิ์ยับยั้งทั้ง cyclooxygenase และ lipoxigenase pathways (Dewhirst, 1980; Rao *et al.*, 1995) ในปี 1991, Deschner และคณะ ได้รายงานฤทธิ์ของ quercetin และ rutin ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย azoxymethanol (Deschner *et al.*, 1991) และในปี 1994 Huang และคณะ ได้รายงานถึงฤทธิ์ของ curcumin ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งในทางเดินอาหาร (forestomach, duodenum และ colon) (Huang *et al.*, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับข้อสังเกตที่พบว่าประชากรที่บริโภคอาหารที่มี phenolic compounds เป็นประจำมีอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งต่ำ (Hertog and Katan, 1998)

Enzyme activity modulation

โดยธรรมชาติเซลล์ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดในกระบวนการเจริญ (growth) และแบ่งตัวของเซลล์ (cell division) Phenolic compounds หลายชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ได้ ส่งผลให้ลดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ ลดความเสี่ยงของการก่อมะเร็ง (cancer risk) ตัวอย่างเช่น quercetin สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protein kinase C (Schwartz *et al.*, 1988), genistein สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ protein tyrosine kinase (Akiyama *et al.*, 1987), psammaplin A ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerasase (Kim *et al.*, 1999) และ green tea ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด (ตารางที่ 3) (Ho *et al.*, 1994)

ตารางที่ 3 Some enzyme activities that are associated with cellular proliferation and carcinogenesis and are modulated by green tea and its constituents

1. protein kinase C	7. Cytochrome P450
2. DNA polymerase	8. Induction of phase II enzyme activity
3. RNA polymerase	9. Salivary alpha-amylase
4. lipoxigenase	10. intestinal sucrase
5. cyclooxygenase	11. intestinal maltase
6. ornithine decarboxylase	

Inhibition of carcinogen formation

การได้รับสารก่อมะเร็ง (carcinogens) เป็นปัจจัยหนึ่งที่เร่งให้เกิดมะเร็ง มนุษย์ได้รับสารก่อมะเร็งทั้งจากแหล่งภายนอก (exogenous source) และที่เกิดขึ้นในร่างกาย (endogenous source)

การหลีกเลี่ยงหรือลดการได้รับสารก่อมะเร็งทั้งจากแหล่งภายนอกและที่เกิดขึ้นในร่างกาย จะช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งได้ พบว่า phenolic compounds หลายตัวมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารก่อมะเร็งในร่างกายได้ เช่น caffeic และ ferulic acid มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ nitrosation (Kuenzig *et al.*, 1984), green tea สามารถยับยั้งการเกิด nitrosation ในหนู และสามารถลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งหลายชนิด เช่น ลดการสร้าง *N*-nitrosodiethylamine (carcinogen ที่กระตุ้นให้เกิด forestomachs, lung cancer), 4-(methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (carcinogen ในการกระตุ้น lung tumor) หรือ *N*-nitrosomethylamine (carcinogen ที่กระตุ้น esophageal tumor) (Wang *et al.*, 1992)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาใน *in vivo* อีกมากที่แสดงถึงผลของ phenolic compound ในการยับยั้งการเกิดมะเร็ง ซึ่งจะกล่าวถึงเฉพาะสารที่พบได้บ่อย ได้แก่

Quercetin และ **rutin** เป็น phenolic compound ที่พบได้บ่อยในอาหารของคน หนูที่ได้รับ quercetin/rutin ด้วยการทา สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งที่ผิวหนังที่กระตุ้นด้วย phorbol ester (TPA) ได้ (Kato *et al.*, 1983) การให้หนูรับประทานอาหารที่ผสมด้วย quercetin สามารถลดการเกิดมะเร็งเต้านมในหนูที่กระตุ้นด้วย DMBA และ NMU (Verma *et al.*, 1988) และลดมะเร็งลำไส้ที่กระตุ้นด้วย AOM (Deschner *et al.*, 1993)

Curcumin สารสีเหลืองที่พบได้ในพืชหลายชนิด เช่น เหง้าของขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเมื่อทดลองโดย mouse ear test และมีฤทธิ์สูงในการต้านการก่อมะเร็งในสัตว์ทดลองที่กระตุ้นด้วย DMBA หรือ TPA ทำให้ลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร duodenum และ colon (Huang *et al.*, 1992)

Caffeic และ **Ferulic acid** เป็นสารที่พบได้ในผักและผลไม้หลายชนิด ทั้ง caffeic และ ferulic acid มีผลยับยั้งการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารในหนูถีบจักรที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของสารเคมี (Wattenberg *et al.*, 1990) นอกจากนี้ caffeic ยังมีฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งการสร้างสารก่อมะเร็งในกลุ่ม nitrosamines (Kuenzig *et al.*, 1984)

Ellegic acid พบได้ใน walnuts, raspberries และผลไม้ชนิดอื่น ๆ มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อมะเร็งต่ออาหาร ปอด และตับ ในสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำด้วยสารเคมี (Lesca, 1983)

Lignans เป็น phenylpropanoids ซึ่งเป็นกลุ่มหนึ่งของ phenolic compound มีฤทธิ์ทำลายเซลล์ของ lignan ทั้ง *in vitro* (Middel *et al.*, 1995) และ *in vivo* (Thompson *et al.*, 1997) ต่อมา มีการค้นพบ podophyllotoxins สารที่แยกสกัดได้จากต้น Mayapple (*Podophyllum peltatum*) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ microtubule และจากการทดลองต่อๆ มาพบว่าสารกึ่งสังเคราะห์ของ podophyllotoxin เช่น etoposide หรือ teniposide มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่สำคัญ ปัจจุบัน etoposide ใช้

เป็นยารักษามะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะมะเร็งที่ดื้อยา เช่น testicular carcinoma, small-cell lung carcinoma, nonlymphocytic leukemic และ non-Hodgkin's lymphomas (Imbert, 1998)

Alkaloids

Alkaloids เป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่พบมากในพืช เป็นสารที่มักจะมีพิษและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา กว้างขวาง สารในกลุ่มนี้มีสูตรโครงสร้างที่แตกต่างกันมากทำให้ยากที่จะให้คำจำกัดความ อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้ว alkaloids มักเป็นสารที่ไม่มีสี มีฤทธิ์เป็นด่าง และมี nitrogen atom เป็นส่วนประกอบของ cyclic part

มีรายงานถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารในกลุ่ม alkaloids มากมาย (Ye *et al.*, 1996) และหลายตัวอยู่ระหว่างการศึกษาระดับคลินิก (Zhang *et al.*, 1998; Barret *et al.*, 2000) มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ alkaloids อย่างกว้างขวางทั้ง antioxidant (Shi *et al.*, 1995) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Goss *et al.*, 1995; Blaghen *et al.*, 1999; Minuzzo *et al.*, 2000) และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เช่น เป็นตัวยับยั้งที่ดีของเอนไซม์ protein kinase C (Caponigro *et al.*, 1997), และเอนไซม์ topoisomerase (Zhang *et al.*, 1998) และฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ (Caponigro *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2000)

Alkaloids หลายตัวนอกจากจะมีฤทธิ์ทำลายเซลล์โดยตรงแล้ว (Pauwels *et al.*, 1995; Fridborg *et al.*, 1996; Barret *et al.*, 2000) ยังช่วยลดอาการพิษของยาเมื่อให้ร่วมกับยาต้านมะเร็ง (conventional anticancer) ได้ เช่น swainsonine ช่วยลดอาการพิษของ methotrexate, 5-fluorouracil, cyclophosphamide, และ doxorubicin ต่อไขกระดูกได้ (Oredipe *et al.*, 1991) ในทางตรงกันข้าม alkaloids บางชนิดออกฤทธิ์เสริมยาต้านมะเร็ง เช่น การให้ vinflunine หรือ vinorelbine (กลุ่ม vinka alkaloid) ร่วมกับ cisplatin, mitomycin C, doxorubicin หรือ 5-fluorouracil (Barret *et al.*, 2000) นอกจากนี้การให้ alkaloids บางชนิด เช่น cepharanthin หรือ tetrandrine จะช่วยลดอาการต่อยาบางชนิดที่ใช้รักษามะเร็งได้ โดยมีผลด้านการขับยาออกจากเซลล์โดยการออกฤทธิ์ที่ p-glycoprotein (Hirai *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1998)

จะขอกล่าวเพิ่มเติมถึง alkaloids บางตัวโดยเฉพาะที่กำลังศึกษาในระดับคลินิก เช่น

Vinorelbine เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ของ vinka alkaloid มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ โดยมีผลต่อการทำงานของ microtubule (ยับยั้ง microtubule organization) (Pauwels *et al.*, 1995) มีฤทธิ์ต้านมะเร็งอย่างกว้างขวาง (broad spectrum) ในขณะที่อาการพิษจะน้อยกว่าเมื่อเทียบกับยาในกลุ่ม vinka alkaloid ตัวเก่า (เช่น vincristine และ vinblasine) (Burris and Fields, 1994) ปัจจุบันมีการศึกษาในระดับคลินิกเพื่อรักษา non-small cell lung cancer (Bengtson and Rigas, 1999) การศึกษาถึงเภสัช

จุลศาสตร์ของยาพบว่ามีความครึ่งชีวิต (half-life) ยาว (35.8 h/rats, 34.5 h/dogs) volume of distribution กว้าง (12.7, 41.9 และ 49.6 l/kg ใน mouse, rat และ dog ตามลำดับ) การทดลองในหนูพบว่า ระดับของยาในเนื้อเยื่อต่าง ๆ สูงกว่าในเลือดโดยเฉพาะที่ปอด ยาส่วนใหญ่ (61-73%) ถูกขับออกทางอุจจาระ และพบว่าร้อยละ 42.6 ของยาถูกขับออกทางน้ำดีใน 48 ชั่วโมง (Kobayashi *et al.*, 1993)

Vinflunine (อนุพันธ์ของ vinorelbine) จากการทดลองใน *in vivo* พบว่ามีฤทธิ์สูงในการยับยั้งมะเร็ง ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 2 นอกจากฤทธิ์โดยตรงแล้ว vinflunine ยังมีฤทธิ์เสริมด้าน cytotoxicity เมื่อใช้ร่วมกับ cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, และ 5-fluorouracil (Barret *et al.*, 2000)

10-Hydroxycamptothecin (HCPT) เป็น indole alkaloid ที่แยกได้จากต้น *Camptotheca acuminata* มีรายงานถึงฤทธิ์ต้านมะเร็งอย่างกว้างขวางทั้ง *in vitro* & *in vivo* โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ topoisomerase I HCPT จะมีข้อดีกว่า parent compound (camptothecin) คือมีฤทธิ์ที่แรงกว่าในขณะที่อาการพิษจะต่ำกว่า (Zhang *et al.*, 1998)

Ecteinascidin เป็น tetrahydroisoquinoline alkaloid ที่แยกสกัดจากต้น *Ecteinascidia turbinata* ปัจจุบันกำลังทำการศึกษาด้านคลินิกระยะ 2 เชื่อว่ากลไกการออกฤทธิ์ของยาคือการจับกับ DNA (covalent adduct) และยับยั้งกระบวนการ transcription (Minuzzo *et al.*, 2000)

Diterpenoids

Diterpenoids เป็นกลุ่มหนึ่งของ terpenoids ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่พบในพืช สร้างมาจากการรวมตัวของ isoprene molecule $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (C_5 unit) ตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป ในกรณีของ diterpenoids เกิดจากการรวมกลุ่มของ isoprene 4 units (C_{20})

Taxol (paclitaxel) เป็น diterpenoid ที่แยกได้จากเปลือกของต้น yew tree (*Taxus brevifolia*) มีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิด เช่น ovarian และ breast cancer, malignant melanoma และ acute myelogenous leukemia มีการศึกษาทางคลินิกระยะ 2 โดยให้ Taxol ร่วมกับ dexamethasone, diphenhydramine (เพื่อลด allergic reaction) ในการรักษา ovarian cancer โดยเฉพาะกลุ่มที่ดื้อยา (Murphy *et al.*, 1993)

บทวิเคราะห์และข้อเสนอแนะในการวิจัย

จากการทบทวนวรรณกรรมดังกล่าวข้างต้น จะเห็นว่าการรักษามะเร็งท่อน้ำดีด้วยยาเคมีบำบัด ยังไม่มีแบบแผนที่ชัดเจนและไม่มีประสิทธิภาพในระดับที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากอาการพิษของยา ความพยายามที่จะหาสาร/ยาที่มีผลต่อมะเร็งท่อน้ำดีมากขึ้นและมีอาการพิษต่ำ โดย

เฉพาะการนำมาใช้ในด้าน การป้องกัน/บรรเทา มะเร็งในระยะแรก ๆ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ และควรได้รับความสนใจศึกษา มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพรที่สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างกว้างขวาง และมีฤทธิ์ยับยั้งกลไกการเกิด มะเร็งท่อน้ำดี เช่น ฤทธิ์ด้านการอักเสบ (antiinflammatory), antioxidant, immunomodulator และ cytotoxicity ควรมีการทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity, immunomodulator, antioxidant และ antiinflammatory ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) โดยคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์สูงสุดแต่มีพิษต่ำสุด 1-2 ชนิด เพื่อทำการทดสอบผลโดยตรงต่อเซลล์เพาะเลี้ยง มะเร็งท่อน้ำดี และสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำให้เป็น มะเร็งท่อน้ำดี

ข้อได้เปรียบของการทดสอบฤทธิ์สมุนไพรต่อ มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อเทียบกับการศึกษาใน มะเร็งชนิดอื่นคือ ขณะนี้ได้มีการพัฒนาเซลล์ มะเร็งท่อน้ำดีเพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยไทยสำเร็จแล้ว หลายสายพันธุ์ และมีระบบสัตว์ทดลองที่สามารถเหนี่ยวนำให้เป็น มะเร็งท่อน้ำดีที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับเช่นเดียวกับที่เกิดในคนได้ ทั้งสองระบบเป็นระบบที่เหมาะสมและใกล้เคียงกับมนุษย์มากที่สุดในการทดสอบสมุนไพรที่มีฤทธิ์ป้องกันหรือรักษามะเร็งท่อน้ำดี

นอกจากฤทธิ์โดยตรงต่อ มะเร็งแล้ว การคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์เสริมการรักษาหรือลดพิษของ ยาเคมีบำบัดก็เป็นอีกประเด็นหนึ่งที่ไม่ควรมองข้าม อย่างไรก็ตามการใช้สมุนไพรทางคลินิกต้องคำนึงถึงการบริหารยา เนื่องจากปัญหาความคงสภาพและปริมาณของสารออกฤทธิ์หากยังไม่ทราบเคมีของ สารออกฤทธิ์ที่แท้จริง การวิเคราะห์เพื่อให้ทราบธรรมชาติของสารที่ออกฤทธิ์จึงมีความจำเป็นในการ ศึกษาลำดับต่อมา และเป็นแนวทางในการทำ finger print เพื่อควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร ในธรรมชาติต่อไป

ข้อเสนอแนะในการวิจัย

1. ศึกษาข้อมูลการใช้สมุนไพร พืช ผัก และผลไม้ท้องถิ่น ในการป้องกัน บรรเทา หรือรักษามะเร็งท่อน้ำดี ในชุมชนหรือแพทย์แผนไทย เพื่อจัดลำดับศักยภาพของสมุนไพร
2. ทำการทดสอบฤทธิ์ immunomodulator, antioxidant, anti-inflammatory และ cytotoxicity ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)
3. คัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์สูงสุดแต่มีพิษต่ำสุด 1-2 ชนิด เพื่อทำการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง มะเร็งท่อน้ำดี และสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำให้เป็น มะเร็งท่อน้ำดี
4. ศึกษาถึงผลการใช้สมุนไพรร่วมกับยาต้าน มะเร็งในการเสริมฤทธิ์การรักษา (synergistic effect) หรือลดอาการพิษของยาเคมีบำบัด
5. ศึกษาถึงผลการใช้สมุนไพรในการเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยหลังผ่าตัด

6. หากได้สมุนไพรมีประสิทธิภาพสูงควรทำการศึกษาแนวลึกเพื่อสกัดสารออกฤทธิ์ที่บริสุทธิ์
ศึกษาทางเคมีและพัฒนาเป็นยาแผนปัจจุบันต่อไป

เอกสารอ้างอิง:

- Agarwal R and Mulkhtar H (1996) *Cancer chemoprevention by polyphenols in green tea and artichoke*. Plenum Press, New York.
- Akiyama T, Isida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**:5592-5595.
- Barret J, Etievant C and Hill B (2000) In vitro synergistic effects of vinflunine, a novel fluorinated vinca alkaloid, in combination with other anticancer drugs. *Cancer-chemother-Pharmacol* **45**:471-476.
- Bengtson E and Rigas J (1999) New oral chemotherapeutic agents for lung cancer. *Drugs* **58**:57-69.
- Blaghen N, Lahlou N, Dzairi F, Moutaouakkil A and Talbi M (1999) Complexation and ionophoric properties of taxol and colchicine: complex formation and transport of sodium, potassium, magnesium and calcium ions across a liquid membrane. *Nat-Toxins*. **7**:179-185.
- Burris H-r and Fields S (1994) Summary of data from in vitro and phase I vinorelbine (Navelbine) studies. *Semin-Oncol*. **21**:14-19:discussion 19-20.
- Caponigro F, French R and Kaye S (1997) protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? *Anticancer-Drugs*. **8**:26-33.
- Choi S, Park S, Kim K, Choi E, Kim S, Park W, Zhang Y, Kim H, Jung N and Lee C (1998) The bisbenzylisoquinoline alkaloids, tetrandine and fangchinoline, enhance the cytotoxicity of multidrug resistance-related drugs via modulation of P-glycoprotein. *Anticancer-Drugs*. **9**:255-261.
- Deschner E, Ruperto J, Wang Z and Newmark H (1993) The effect of dietary quercetin and rutin on AOM-induced acute colonic epithelial abnormalities in mice fed a high-fat diet. *Nutrition and Cancer* **20**:199-204.
- Deschner E, Ruperto J, Wong G and Newmark H (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* **12**:1193-1196.
- Dewhirst F (1980) Structure-activity relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. *Prostaglandins* **20**:209-222.
- Falkson G, MacIntyre J and Moertel C (1984) Eastern cooperative oncology group experience with chemotherapy for inoperable gallbladder and bile duct cancer. *Cancer*:135.131.
- Fridborg H, Nygren P, Dhar S, Csoka K, Kristensen J and Larsson R (1996) In vitro evaluation of new anticancer drugs, exemplified by vinorelbine, using the fluorometric microculture cytotoxicity assay on human tumor cell lines and patient biopsy cells. *J-Exp-Ther-Oncol* **1**:286-295.
- Goss P, Baker M, Carver J and Dennis J (1995) Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents. *Clin-Cancer-Res*. 1995 Sep **1**:935-944.
- Hertog MGL and Katan MB (1998) *Quercetin in foods, cardiovascular disease, and cancer*. Marcel Dekker, New York.
- Hirai M, Tanaka K, Shimizu T, Tanigawara Y, Yasuhara M, Hori R, Takechi Y, Yoshida O, Ueda K, Komano T and et-al (1995) Cepharanthin, a multidrug resistant modifier, is a substrate for P-glycoprotein. *J--Pharmacol-Exp-Ther*. **275**:73-78.

- Ho CT, Ferraro T, Chen Q, Rosen RT and Huang MT (1994) *Phytochemicals in teas and rosemary and their cancer-preventive properties*. American Chemical Society, Washington, DC.
- Huang M, Lou Y, Ma W, Newmark H, Reuhl K and Conney A (1994) Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Research* **54**:5841-5847.
- Huang M, Robertson F, Lysz T, Ferraro T, Wang Z, Georgiadis C, Laskin J and Conney A (1992) Inhibitory effects of curcumin on carcinogenesis in mouse epidermis. *Antioxidants and Cancer Prevention Society*:339-349.
- IARC (1994) *Infection with liver flukes (opisthorchis viverrini, opisthorchis felinus and clonorchis sinensis)*.
- Imbert T (1998) Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* **80**:207-222.
- Kang T, Pae H, Yoo J, Kim N, Kim Y, Ko G and Chung H (2000) Antiproliferative effects of alka;oids from Sedum sarmentosum on murine and human hepatoma cell lines. *J-Ethnopharmacol* **70**:177-182.
- Kato R, Nakadate T, Yamamoto S and Sugimura T (1983) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement by lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis* **4**:1301-1305.
- Kiba T, Tsuda H, Pairojkul C, Inoue S, Sugimura T and Hirohashi S (1993) Mutations of the p53 tumour suppressor gene and the ras gene family in intrahepatic cholangiocellular carcinomas in Japan and Thailand. *Mol Carcinogenesis* **8**:312-318.
- Kim D, Lee I, Jung J, Lee C and Choi S (1999) Psammaplin A, a natural phenolic compound, has inhibitory effect on human topoisomerase II and is cytotoxic to cancer cells. *Anticancer-Res* **19**:4085-4090.
- Kobayashi S, Sakai T, Dalrymple P, Wood S and Chasseaud L (1993) Disposition of the novel anticancer agent vinorelbine ditartrate following intravenous asministration in mice, rats and dogs. *Arzeneimittelforschung*. **43**:1367-1377.
- Kuenzig W, Chang J, Norkus E, Holowaschenko H, Newmark H, Mergens W and Conney A (1984) Caffeic and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis* **5**:309-313.
- Lesca P (1983) Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo(a)pyrene-induced neoplasia in mice. *Carcinogenesis* **6**:1651-1653.
- Middel O, Woerdenbag H, van-Uden W, van-Oeveren A, Jansen J, Feringa B, Konings A, Pras N and Kellogg R (1995) Synthesis and cytotoxicity of novel lignans. *J-Med-Chem* **38**:2112-2118.
- Middleton EJ (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv-EXP-Med-Biol*. **439**:175-182.
- Minuzzo M, Marchini S, Broggini M, Faircloth G, D'Incalci M and Mantovani R (2000) Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* **97**:6780-6784.
- Murphy W, Fossella F, Winn R, Shin D, Hynes H, Groos H, Davilla E, Leimert J, Dhingra H, Raber M and et-al (1993) Phase II study of taxol in patients with untreated asvanced non-small-cell lung cancer [see comments]. *J-Natl-Cancer-Inst*. **85**:384-388.

- Newmark HL (1996) *Plants phenolics as potential cancer prevention agents*. Plenum Press, New York.
- Okada S, Ischii H, Nose H and al e (1994) A phase II study of Cisplatin in patients with biliary tract carcinoma. *Oncology* **51**:515-517.
- Oredipe O, White S, Grzegorzewski K, Gause B, Cha J, Miles V and Olden K (1991) Protective effects of swainsonine in murine survival and bone marrow proliferation during cytotoxic chemotherapy. *J-Natl-Cancer-Inst.* **83**:1149-1156.
- Owen R, Giacosa A, Hull W, Haubnwe R, Spiegelhalder B and Bartsch H (2000) The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur-J-Cancer* **36**:1235-1247.
- Pacifici R and Davies J (1991) Protein, lipid, and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* **37**:166-180.
- Pauwels O, Kiss R, Pasreels J and Atassi G (1995) Cytotoxicity, cell cycle kinetics and morphonuclear-induced effects of Vinca alkaloid anticancer agents. *J-Pharm-Pharmacol.* **47**:870-875.
- Pezzuto J (1997) Plant-derive anticancer agents. *Biochem-Pharmacol* **53**:121-133.
- Premalantha B and Sachdanandam P (1999) Semecarpus anacardium L. nut extract administration induces the in vivo antioxidant defence system in aflatoxin B1 mediated hepatocellular carcinoma. *J-Ethnopharmacol* **66**:131-139.
- Rao C, Rivenson A, Simi B and Reddy B (1995) Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer-Res* **55**:259-266.
- Sanz-Altamira P, Ferrante K, Jenkins R, Lewis W, Huberman M and Stuart K (1998) A phase II trial of 5-fluorouracil, leucovorin, and carboplatin in patients with unresectable biliary tree carcinoma. *Cancer* **82**:2321-2325.
- Schwartz B, Fraser G, Levy J, Sharoni Y, Guberman R, Krawiec J and Lamprecht S (1988) Differential distribution of protein kinase along the crypt-to-lumen regions of rat colonic epithelium. *Gut* **29**:1213-1221.
- Shi X, Mao Y, Saffiotti U, Wang L, Rojanasakul Y, Leonard S and Vallyyathan V (1995) Antioxidant activity of tetrandrine and its inhibition of quartz-induced lipid peroxidation. *J-Toxicol-Environ-Health* **46**:233-248.
- Terblance J (1994) Biliary tract carcinoma: editorial overview. In: J Terblance (ed). *Hepatobiliary AMalignancy*:468.
- Thamavit W, Bhamarapravati N, Sahaphong S, Vajrasthira S, Angsubhakorn S. (1978) Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters. *Cancer Res* **38**: 4634-4639.
- Thompson L, Rickard S, Cheung F, Kenaschuk E and Obermeyer W (1997) Variability in anticancer lignan levels in flaxseed. *Nutr-Cancer* **28**:26-30.
- Uttaravichien T, Buddhisawasdi V.(1990) Experienceof non-jaundiced cholangiocarcinoma. *Hepato-gastroenterol* **37**: 608-11.
- Vatanasapt V, Martin N, Sriplung H and al. e (1995) Cancer incidence in Thailand, 1988-1991. *Cancer epidemiol biomarkers prev* **4**:475-483.
- Vatanasapt V, Sripa B, Sithithaworn P and Mairiang P (1999) Liver flukes and liver cancer. *Cancer Surv* **33**.

- Verma A, Johnson J, Gould M and Tanner M (1988) Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Res* **20**:199-204.
- Wang ZY, Hong JY, Huang MT, Reuhl KR, Conney A and Yang CS (1992) *Cancer Res* **52**:1943-1947.
- Watanapa P (1996). Cholangiocarcinoma in patients with opisthorchiasis. *Br J Surg* **83**: 1062-4.
- Wattenberg L, Cocciaa J and Lam L (1990) Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo(a)pyrene induced neoplasia. *Cancer Res* **40**:2820-2823.
- Ye Z, Sun A, Li L, Cao X and Ye W (1996) Reversal of adriamycin or vincristine resistance by tetrandrine in human cancer cells in vitro. *Chung-Kuo-Chung-Yao-Tsa-Chih* **21**:369-371,384.
- Zhang R, Li Y, Cai Q, Liu T, Sun H and Chambliss B (1998) Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent 10-hydroxycamptothecin, an inhibitor of topoisomerase I. *Cancer-chemother-Pharmacol* **41**:257-267.

บทที่ 6

แนวทางการวิจัยเพื่อแก้ปัญหาโรคมะเร็งท่อน้ำดี ในผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ

บทนี้เป็นบทสรุปแนวทางการวิจัยเพื่อแก้ปัญหาโรคมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยที่มีพยาธิใบไม้ตับ โดยสรุปจากข้อมูลที่มีจนถึงปัจจุบันและแนวคิดของผู้เขียนที่นำเสนอและแลกเปลี่ยนความคิดกับนักวิจัยอาวุโสหลายท่าน ตลอดจนนักวิจัยที่ยังคงสนใจทำการศึกษาปัญหาดังกล่าวอยู่ จัดแบ่งการวิจัยออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

1. การวิจัยที่มุ่งศึกษาการลดอุบัติการณ์การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ การวิจัยกลุ่มนี้ แบ่งออกเป็น
 - 1.1 การวิจัยเกี่ยวกับปลาน้ำจืด โดยมีจุดประสงค์ค้นหาปลาที่ไม่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (พร้อมศึกษาสาเหตุ) หากสามารถค้นหาปลาเหล่านี้ได้ ก็จะสามารถร่วมมือกับหน่วยราชการต่างๆ ที่จะเพิ่มปริมาณปลาเหล่านี้ให้เป็นแหล่งโปรตีนของประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือต่อไป รวมทั้งแนะนำให้ประชาชนหลีกเลี่ยงการทานปลาที่มีอุบัติการณ์ติดเชื้อสูง
 - 1.2 การวิจัยเกี่ยวกับตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ตับที่มีผนังหุ้ม (Encysted fluke) ที่ผู้ป่วยได้จากการทานปลาดิบที่มีพยาธิใบไม้ตับอยู่ มีจุดมุ่งหมายคือหาส่วนประกอบของผนังของตัวอ่อน เพื่อหาวิธีไม่ให้ตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ตับฟักตัวออกจากผนังแล้วไชเข้าสู่ทางเดินน้ำดีในตับ ผลการศึกษารู้ส่วนประกอบของผนังของตัวอ่อนดังกล่าว ส่งผลให้สามารถค้นหาสารเคมีหรือสารอาหารที่มีผลกระทบต่อการสลายตัวของผนังตัวอ่อนในลำไส้เล็กส่วนต้น
 - 1.3 การวิจัยเกี่ยวกับวิธีการป้องกันไม่ให้ไข่พยาธิใบไม้ตับลงสู่แหล่งน้ำ มีจุดมุ่งหมายคือค้นหาวิธีที่เหมาะสมเกี่ยวกับสุขอนามัยในการถ่ายอุจจาระ และต้องเป็นวิธีที่คล่องจองกับวัฒนธรรมของประชาชนกลุ่มเสี่ยง มากกว่าวิธีที่ถูกต้องทางทฤษฎีเพียงอย่างเดียว
2. การวิจัยเกี่ยวกับกลไกการเกิดมะเร็ง งานวิจัยกลุ่มนี้ที่น่าจะต่อยอดจากผลงานวิจัยที่มีในปัจจุบันคือ
 - 2.1 การศึกษา Genetic change ในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี รวมทั้งการศึกษา Signaling pathway ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ Gene ต่างๆ นั้น และส่งผลให้เกิดการกลายเป็นเซลล์มะเร็ง

2.2 การศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของ Nitric oxide ในกระบวนการเกิดเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีให้มากขึ้น รวมทั้งความเป็นไปได้ในการขัดขวางกระบวนการต่างๆ นั้น

2.3 การศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบในน้ำดีที่อาจเปลี่ยนแปลงไปจากผลของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ และส่งผลให้เกิดการกลายเป็นเซลล์มะเร็งของเซลล์บุผนังท่อน้ำดี

2.4 การศึกษาเกี่ยวกับ Drug-metabolizing enzyme โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของ Cytochrome P450 isoenzymes ตลอดจนกลไกที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการทำงานของ Enzymes ต่างๆ นี้ ที่ส่งผลให้เซลล์บุผนังท่อน้ำดีกลายเป็นเซลล์มะเร็ง

2.5 การศึกษาเกี่ยวกับกลไกที่การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับส่งผลให้เกิดการสร้าง Endogenous nitrosamine โดยละเอียด และแนวทางการป้องกันกระบวนการของกลไกดังกล่าว

3. การวิจัยเกี่ยวกับการค้นหาเครื่องหมายในระยะเริ่มต้น

งานวิจัยในกลุ่มนี้ในปัจจุบันยังคงมีน้อยมาก แนวทางวิจัยคือการค้นหาคำตอบจากงานวิจัยกลุ่ม 2 คือการวิจัยหากลไกการเกิดมะเร็ง จากนั้น วิจัยหา Marker ของการเกิดมะเร็งนั้นๆ

4. การวิจัยเกี่ยวกับวิธีการรักษา

4.1 การวิจัยเกี่ยวกับการผ่าตัดรักษา งานวิจัยกลุ่มนี้ แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

4.1.1 การวิจัยเกี่ยวกับการสืบค้นหาตำแหน่งที่เกิดมีมะเร็งในระยะเริ่มแรกเพื่อบอกตำแหน่งของมะเร็งสำหรับการวางแผนการผ่าตัด แบ่งออกได้เป็น

การใช้การสืบค้นทางรังสีวิทยา ได้แก่การศึกษารูปภาพของใช้ spiral CT scan หรือ Magnetic Resonance Cholangiography ค้นหาตำแหน่งมะเร็งที่มีขนาดเล็ก อาจวิจัยหาความเป็นไปได้ที่จะใช้ Radioactive substance เช่น Tc99m จับกับ specific antigen ของมะเร็งท่อน้ำดี แล้วใช้ Radionuclide scan จับหาตำแหน่งของมะเร็ง

4.1.2 การวิจัยเกี่ยวกับวิธีการผ่าตัดรักษา มุ่งเน้นศึกษารูปภาพของการทำ Radical หรือ Extended surgery เปรียบเทียบกับการทำ Conventional surgery

4.1.3 การวิจัยเกี่ยวกับการให้การรักษาพร้อมวิธีต่างๆ รวมทั้งการวิจัยศึกษาผลของการผ่าตัดต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีขึ้นในตับส่วนที่เหลือ

4.2 การวิจัยเกี่ยวกับการรักษาอื่นๆ ที่ไม่ใช่การผ่าตัดรักษา ได้แก่การวิจัยหาวิธีการรักษาในผู้ป่วยที่มีโรคอยู่ในระยะลุกลามซึ่งไม่สามารถทำการผ่าตัดรักษาได้ แบ่งออกได้เป็น

4.2.1 การวิจัยเกี่ยวกับการใส่ท่อระบายน้ำดี (Biliary stent) โดยทำการเปรียบเทียบกับการทำ Surgical biliary-enteric bypass

4.2.2 การวิจัยเกี่ยวกับการให้ยาหรือสารเคมีที่หวังผลเป็น Chemoprevention ต่างๆ เพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยที่มีโรคพยาธิใบไม้ตับอยู่แล้ว

- 4.2.3 การวิจัยหา**สมุนไพร**ที่ใช้เป็น Chemotherapeutic agent ในผู้ป่วยที่มีโรคในระยะลุกลาม เพื่อประทุ้งอาการหรือเพิ่มคุณภาพชีวิตในส่วนที่เหลือ
- 4.2.4 การวิจัยเกี่ยวกับการติดตามดูแลผู้ป่วยและครอบครัวให้สอดคล้องกับแนวคิดเรื่องเวชศาสตร์ครอบครัวของการสาธารณสุขไทย

กรอบแนวทางวิจัยดังกล่าว เป็นเพียงกรอบแนวคิดที่ได้จากการทบทวนวรรณกรรมที่มีรายงานมา คาดว่ายังอาจไม่ครอบคลุมทุกมุมมองของการวิจัย อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาจากแนวคิดในองค์รวม คงจะเห็นภาพการวิจัยที่ต่อเนื่อง และส่งผลกระทบต่อการสร้างองค์ความรู้ระหว่างกลุ่มงานวิจัยต่างๆ ซึ่งจะสามารถส่งผลให้ชุดโครงการวิจัยมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ บรรลุวัตถุประสงค์ คือ การลดอัตราการเสียชีวิตของโรคมะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทย

ขอขอบคุณผู้ร่วมทบทวนวรรณกรรมเรื่องมะเร็งท่อน้ำดีในผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับครั้งนี้ หากยังไม่ได้ครอบคลุมบทความทางวิชาการอื่นๆ ผู้เขียนต้องขอภัยและต้องขอออกตัวว่า การทบทวนวรรณกรรมครั้งนี้ มุ่งเน้นเฉพาะข้อมูลที่มีแนวโน้มที่ชัดเจนพอควรที่จะเป็นฐานต่อการวิจัยเรื่องนี้ต่อไป