ผลงานทางวิชาการ

เรื่อง

ความสัมพันธ์ของการตรวจพบ HPV E6/E7 mRNA ในเซลขูดปากมดลูกกับพยาธิสภาพที่สัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกของเซลขูดปากมดลูกในหญิงบริการในเขตเมือง จังหวัดเชียงใหม่

โดย

นางเจียรนัย ขันติพงศ์

นพ.สุรเชษฐ์ อรุโณทอง

ดร.โกวิทย์ นามบุญมี

นางนิลวรรณ กิตยานุรัษ์

รศ.นพ.นิรัชร์ เลิศประเสริฐกุล

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณสำนักงานป้องกันควบคุมโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขที่ให้โอกาสและให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวิชัย วิทุรวงศ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำและจัดหาชุดตรวจและประสานทีมงานเชี่ยวชาญเฉพาะด้านจากประเทศสหรัฐอเมริกามาร่วมการตรวจวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูกด้วยเครื่อง Flow Cytometer

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำ central lab คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและร่วมดำเนินงานวิจัยโดยใช้เครื่อง Flow Cytometer

ขอบคุณอาสาสมัครที่เสียสละและให้เก็บตัวอย่างเซลขูดปากมดลูกเพื่อตรวจวิเคราะห์หาเซลมะเร็งทางห้องปฏิบัติการ

และท้ายสุดข้าพเจ้าขอขอบคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่ให้ความรัก ความอบอุ่นและความเข้าใจในการดำเนินงานวิจัยและช่วยสนับสนุนนเป็นกำลังใจให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เจียรนัย ขันติพงศ์

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the relationship between the result of HPV E6/E7 mRNA test and Pap smear test in target group sex workers. The subjects were 175 sex workers. Cervical cells were collected using liquid base media. HPV E6/E7 mRNA level in collected cervical cell was tested using Flow cytometer and the cervical cancer cell forming was determined microscopically by pap smear. Among 175 sex workers in the study, there were 54 subjects (30.86%) with HPV E6/E7 mRNA test positive and 8 subjects (5.14%) with pap smear test positive. The relation between HPV E6/E7 and pap smear did not show in our study (Fisher exact p-value >0.05). It caused by the sensitivity difference between HPV E6/E7 test and Pap smear test. The sensitivity of HPV E6/E7 mRNA test and pap smear test should be further determined. In in order to evaluate the sensitivity of HPV E6/E7 mRNA test, the cervical cancer incidence among 54 subjects with HPV E6/E7 mRNA positive result should be followed using pap smear.

Keywords: HPV E6/E7 mRNA test Pap smear cervical cancer female sex workers

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงคเพื่อประเมินความสัมพันธของ HPV E6/E7 mRNA test กับพยาธิสภาพที่สัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกของเซลขูดปากมดลูกในกลุมเปาหมาย กลุมตัวอย่างคือ หญิงอาชีพบริการ จำนวน 175 ราย เก็บเซลขูดปากมดลูกโดยใช liquid base media นำมาตรวจหาปริมาณ HPV E6/E7 mRNA ด่วยเครื่อง flow cytometer และตรวจหาพยาธิสภาพที่สัมพันธกับมะเร็งปากมดลูก (pap smear) ผลการวิจัยพบวาในกลุมตัวอยาง 175 ราย ใหผล pap smear ผิดปกติ 8 ราย (ร่อยละ 5.14) ผลจาก HPV E6/E7 mRNA test ผิดปกติ 54 ราย (ร่อยละ 30.86) โดยไมพบความสัมพันธทางสถิติระหวางผลทดสอบด่วย E6/E7 และผล pap smear เมื่อทดสอบโดยใช Fisher exact test (p>0.05) ซึ่งอาจจะเกิดจากความไวของทั้ง 2 วิธีแตกตางกันมาก ดังนั้นควรมีการประเมินประสิทธิภาพของ HPV E6/E7 mRNA test ตอไปโดยติดตามการเกิดมะเร็งปากมดลูกในอาสาสมัครที่ใหผล HPV E6/E7 mRNA test ผิดปกติ จำนวน 54 ราย ดวยวิธี pap smear เพื่อประเมินความเสี่ยงของเซลที่จะพัฒนาไปเปนมะเร็งปากมดลูกในสตรีที่มี HPV E6/E7 mRNA สูงกวาปกติ

คำรหัส : HPV E6/E7 mRNA test Pap smear มะเร็งปากมดลูก หญิงอาชีพขายบริการ

สารบัญ

	Page
ACKNOWLEDGMENTS	I
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	II
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	III
สารบัญ	IV
สารบัญรูปภาพ	V
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วัตถุประสงค์	1
บทที่ 3 แนวคิด ทฤษฎี และเอกสารการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 4 วัสดุอุปกรณ์ วิธีดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 5 ผลการวิจัย	8
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	10
เอกสารอ้างอิง	12

สารบัญรูปภาพ

Page

รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจหา HPV E6/E7 mRNA ด้วยเครื่อง flowcytometer ที่ให้ผล positive (E6E7 Cells % of vis = 2.6%) 8

รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจหา HPV E6/E7 mRNA ด้วยเครื่อง flowcytometer ที่ให้ผล negative (E6E7 Cells % of vis = 0.7%) 8

รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงการสรุปผลการดำเนินการวิจัย 9

บทที่ 1 บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปากมดลูกเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย เป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดของสตรี โดยมีอุบัติการณ์ปรับมาตรฐานตามอายุ (age standardized rate) 19.8 ต่อประชากร 100,000 คนต่อปี The International Agency for Research on Cancer (IARC) รายงานว่าประเทศไทยมีผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกใหม่ปีละ 6,243 รายและเสียชีวิต 2,620 ราย อุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกทั่วโลก พบสูงถึงเกือบ 500,000 รายต่อปี และมีผู้ป่วยเสียชีวิตมากกว่า 270,000 รายต่อปี [1]

พบว่าการติดเชื้อ oncogenic Human papillomaviruses (HPV) เป็นสาเหตุเริ่มต้นที่สำคัญที่สุด เซลติดเชื้อค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลมะเร็ง โดยมีปัจจัยร่วมที่เหมาะสม เช่นปัจจัยภายในโฮสต์เองและสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นระยะเวลานาน อาจถึง 10 ปี ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็น cervical cancer (SIL หรือ CIN) พบว่า เกิดจากการติดเชื้อ HPV 99% อุบัติการณ์ของการติดเชื้อ HPV เกิดจากการมีเพศสัมพันธ์ พบสูงที่สุดในเพศหญิงวัยเจริญพันธุ์[2] โดยเชื้อเข้าไปทางรอยแตกเล็ก ๆ ของเซลผิวหนังหรือ mucosa เชื้อ High risk strains HPV สามารถ integrate viral DNA เข้าไปใน host genome [2] หลังจากนั้น viral genes (โปรตีน E6, E7) จะ over-expressed โปรตีน E6 และ E7 จะทำให้ HPV เป็นสาเหตุของการเกิด cancer โดยไปยับยั้ง activity ของ key tumor suppressors[3,4]

บทที่ 2

วัตถุประสงค์

1. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบ E6 / E7 mRNA และ พยาธิสภาพของเซลขูดมดลูกที่สัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูก ในประชากรกลุ่มเป้าหมาย

บทที่ 3

แนวคิด ทฤษฎี และเอกสารการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิธีที่ใช้ตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในปัจจุบันได้แก่

การตรวจเซลปากมดลูกโดยวิธีเซลวิทยา (conventional Pap smear) มีความไวต่ำ มีผลลบลวงร้อยละ 6 ถึง 55 ทำให้ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาแต่เนิ่นๆ หรือได้รับการรักษาที่มากเกินจริง จากผลการตรวจที่ผิดพลาด ในระยะหลายปีที่ผ่านมา มีรายงานมากมายที่ประเมินประสิทธิภาพของการตรวจด้วยวิธีนี้และพบว่าความไว (sensitivity) ของ conventional Pap smear ค่อนข้างต่ำ จากรายงานแบบ meta-analysis โดยวิเคราะห์จาก 28 การศึกษา พบว่าค่าเฉลี่ยของความไวและความจำเพาะ (specificity) ของ conventional Pap smear เท่ากับร้อยละ 58 และร้อยละ 69 ตามลำดับ[6] การศึกษาของ U.S. Agency for Health Care Policy and Research (AHCPR) สรุปว่าความไวของการตรวจด้วย conventional Pap smear ในการวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูกและความผิดปกติของปากมดลูกก่อนที่จะกลายเป็นมะเร็งมีเพียงร้อยละ 51[7]

การตรวจหา HPV DNA มีความไวสูงแต่มีความจำเพาะต่ำและมีข้อจำกัดด้านเครื่องมือและอุปกรณ์มีราคาแพงและไม่สามารถบอกถึง cytomorphological criteria ของเซลปากมดลูกที่ติดเชื้อ และ HPV สามารถพบได้ใน normal cervical epithelia[8] ข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันยังไม่เพียงพอที่จะสรุปว่าวิธีนี้ก่อให้เกิดผลดี

การตรวจหา marker ในเซลที่มีความผิดปกติและจะเปลี่ยนเป็นเซลมะเร็งต่อไป เป็นการตรวจคัดกรองที่มีความจำเพาะเพียงพอสำหรับการค้นหาลักษณะที่ผิดปกติทางพยาธิวิทยาของเซลได้ในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่นมีการตรวจหาโปรตีน p16 ในเนื้อเยื่อปากมดลูกที่เพิ่มขึ้นและมักพบเสมอในเนื้อเยื่อติดเชื้อ oncogenic HPV ที่มีภาวะ premalignant lesion ขณะที่ในเนื้อเยื่อปกติหรือติดเชื้อ low risk HPV จะพบการแสดงออกของโปรตีน p16 ได้น้อย การใช้ marker combinations ของ genes expression ได้แก่ กลุ่ม genes ต่อไปนี้ oncogenes, tomour suppressor genes, apoptosis genes, proliferating genes, repair genes และ viral genes[8]

การตรวจหา HPV E6, E7 mRNA เป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (HPV oncoprotein) ซึ่งเป็น biomarker ของมะเร็ง ชนิดต่าง ๆ ที่เกิดร่วมกับ HPV infection เป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่อการเกิดมะเร็งจาก HPV มากกว่า marker จากเซลมะเร็งทั่วไปและยังมีความไวสูงกว่าวิธีคัดกรองอื่น ๆ เพราะไม่ต้องรอให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลจนกลายเป็นมะเร็ง เนื่องจากเป็นการตรวจหาเชื้อ HPV ที่ integrate เข้าไปใน host genome แล้วช่วยในการ screen HPV associated cancer สามารถตรวจ HPV ชนิดต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิด cancers จากเซลขูดปากมดลูกและผู้ที่เป็น carriers ได้ การพบ HPV E6/E7 mRNA จากสิ่งส่งตรวจเป็นหลักฐานที่สำคัญและช่วย prognosis ความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกแสดงว่าจะมีการเกิดมะเร็งปากมดลูกแน่นอนซึ่งจะเป็นช้าหรือเร็วหรือเป็นแล้วก็ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย [5] เนื่องจาก E6 และ E7 เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดมะเร็ง (oncoprotein) โดย E6 ยับยั้งการทำงาน ของ p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor gene ทำให้เซลไม่ตายตามกำหนด (apoptosis) ส่วน E7 จะจับกับ retinoblastoma (Rb) genes ทำให้เซลแบ่งตัวไม่หยุด[10] ดังนั้น HPV E6/E7 mRNA จะเป็น indicator ที่สำคัญสำหรับใช้เฝ้าระวัง

มะเร็งปากมดลูกได้ พบว่าโปรตีน E6/E7 เป็นยีนมะเร็งซึ่งจะมีการแสดงออกในระยะก่อนมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปากมดลูก ซึ่งการตรวจพบโปรตีน E6/E7 จะมีความสัมพันธ์กับระยะก่อนมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปากมดลูกมากกว่าการตรวจค้นหา เอชพีวี ชนิด high risk[27]

ในปัจจุบันการตรวจ HR HPV DNA มีค่า negative predictive values สูงมาก (ประมาณ 99%) และมี positive predictive value สำหรับ pre-cancerous และ cancerous lesion < 50% สำหรับ HPV DNA screening มีการศึกษาวิจัยมากมายที่ยืนยันว่า HR HPV DNA เป็นสาเหตุของ cervical cancer แต่กลับมีเปอร์เซ็นต์ผลการติดเชื้อ HR HPV DNA ที่น้อยมาก ใน pre-cancerous lesion (≥ CIN2)[11]มีข้อมูลการรายงานในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า E6 และ E7 mRNA มีความจำเพาะในการบ่งชี้ถึง cellular transformation และภาวะ CIN2 ที่สูงกว่า[12,14,15,16,17,18,20] การติดเชื้อเอชพีวีเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งปากมดลูกแต่ทุกรายที่ติดเชื้อเอชพีวีไม่ได้หมายความว่าจะเป็นมะเร็งปากมดลูกทุกราย พบว่าผู้ติดเชื้อเอชพีวีชนิด high risks สามในสี่สามารถกำจัดเชื้อได้ด้วยระบบภูมิคุ้มกันของตนเองภายใน 1-2 ปี ผู้ติดเชื้อเพียงหนึ่งในสี่เท่านั้นที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic persistence) ทำให้มีการดำเนินโรคลุกลามเป็นระยะที่รุนแรงมากขึ้น เช่น CIN2, CIN3 และ invasive carcinoma โดยที่ 7 ปี จากการติดตามผู้ที่ติดเชื้อเอชพีวีชนิด high risks พบว่าเกือบ 90% สามารถกำจัดเชื้อได้ด้วยระบบภูมิคุ้มกันของตนเอง ประมาณ 3% ที่เป็น chronic persistence โดยที่ไม่ดำเนินลุกลามมากขึ้นและประมาณ 10% เท่านั้นที่เป็น chronic persistence และมีการดำเนินโรคลุกลามมากขึ้น (CIN2, CIN3 และ invasive carcinoma) [25]

มีสตรีจำนวนมากที่ผล HR HPV DNA test เป็นบวก แต่ผล biopsy ปกติ การตรวจ HPV E6/E7 mRNA จะให้ผลบวกเฉพาะรายที่มี E6, E7 overexpression เท่านั้น ซึ่งใน life cycle ของ HPV นั้น การที่มี overexpression ของ E6/E7 mRNA ในเซลแสดงว่ามีการเกิด มะเร็งปากมดลูก [12,13]

Irwin D. และ Patterson B (2007) ได้ตรวจวัด HPV E6/E7 mRNA expression ในเซลขูดปากมดลูกด้วยเครื่อง Flow cytometer ซึ่งสามารถปรับปรุงค่า positive predictive value ได้ [21] โดยใช้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่เป็น Liquid based cervical cytology specimens จำนวน 395 ตัวอย่าง เป็น CIN2 และ CIN3 (หรือ squamous cell carcinoma) 73 ราย และ normal cytology 322 ราย ผลการวิจัยพบว่า positive predictive value ของการวัดค่า HPV E6/E7 mRNA ในเซล = 83% ซึ่งสูงกว่าการตรวจหา HPV DNA ความจำเพาะ (specificity) = 96% ในตัวอย่าง 322 ราย ที่เป็น normal cytology เมื่อเปรียบเทียบผลการแสดงออกของ E6/E7 mRNA ใน ectocervical cells จากสตรีที่มี CIN2,3 หรือ cancer (mean 10.7%) กับสตรีที่มี normal cytology (mean 1.1%) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยค่า $p < 0.001$ และวิธีการตรวจหา HP HPV DNA กับ HPV E6/E7 mRNA expression มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ > 10,000 relative light units (RLU) แสดงให้เห็นว่าการตรวจหา HPV E6/E7 mRNA สามารถนำไปลดการเกิด false positive HPV DNA results ($r=0.61$, $p=0.01$)

วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เหมาะสมที่สุดเพื่อหา early diagnosis ของโรค จึงควรเป็นวิธีที่ง่าย มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจหา early stage และช่วยทำนายความเสี่ยงของการพัฒนาไปสู่การเกิด cervical cancers ได้แก่การตรวจหา HPV E6/E7 mRNA โดยในการวิจัยครั้งนี้ใช้ 2 วิธี คือ แบบ Rapid test และใช้เครื่อง Flow cytometry E6/E7 oncoproteins เป็น biomarker ของมะเร็งที่มีความไวและความจำเพาะสูง ในการตรวจหามะเร็งชนิดต่าง ๆ ที่เกิดร่วมกับ HPV infection ทุกระยะ [5]

จากงานวิจัยของ Mockel J และคณะ (2007) ได้ใช้วิธีการตรวจหา HPV E6/E7 ด้วยเทคนิค PCR เป็นตัวบ่งชี้การเกิด epithelial cervix dysplasia จาก cervical lesion ของผู้ป่วยกลุ่ม high risk ในคลีนิค dysplasia clinics หลายแห่งในประเทศเยอรมัน จำนวน 344 ราย จัดให้อยู่ในกลุ่มตั้งแต่ low grade intraepithelial lesions ไปจนถึง invasive cervical carcinoma ผลการศึกษาพบว่าการตรวจหา HPV E6/E7 มี prognosis สูงกว่าการใช้วิธีตรวจหา HPV DNA [22]

จากการศึกษาของ Fiedler M. และคณะ (2004) ได้ตรวจหา HPV-16 E7 protein จาก cervical biopsy ด้วยวิธี immunohistochem ผลการศึกษาพบว่า ไม่มี E7 protein ใน tissue ที่มี epithelium cell ที่ปกติจากกลุ่ม HPV-negative control พบว่าระดับของ E7 protein จะเพิ่มสูงมากในช่วง precancerous และ cancerous progression ใน cervical biopsies ที่ HPV-16 positive [23]

เพื่อพัฒนาให้ได้วิธีการตรวจคัดกรองที่มีความจำเพาะและและใช้วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือที่มีอยู่แล้วในโรงพยาบาลทั่วไปคือการตรวจหา HPV E6/E7 mRNA ด้วยเครื่อง Flow cytometry และเปรียบเทียบกับการใช้ชุด Rapid test ตรวจหา HPV E6/E7 oncoprotein ในเนื้อเยื่อปากมดลูกหญิงอาชีพขายบริการ อายุ 18 ปีขึ้นไป จากสถานบริการจังหวัดเชียงใหม่ เนื่องจากการติดเชื้อ Human Papilloma Viruses ที่อวัยวะเพศนั้นติดต่อโดยทางเพศสัมพันธ์ จึงเป็นที่ชัดเจนว่าพฤติกรรมเสี่ยงทางเพศเป็นปัจจัยหลักในการติดเชื้อ HPV ได้แก่ การเริ่มมีเพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุน้อย การมีคู่เพศสัมพันธ์จำนวนมาก การมีเพศสัมพันธ์กับประชากรกลุ่มเสี่ยง (เช่น กรณีผู้หญิงที่มีเพศสัมพันธ์กับชายนักเที่ยวที่มีคู่เพศสัมพันธ์จำนวนมาก) [24]

ดังนั้นการคัดเลือกอาสาสมัครจากหญิงบริการที่มีพฤติกรรมเสี่ยงทางเพศดังกล่าวมากกว่าประชากรหญิงปกติ ทำให้มีโอกาสในการพบการติดเชื้อ เอชพีวี ได้มากกว่าประชากรหญิงปกติ ช่วยให้ลดขนาดกลุ่มตัวอย่างสำหรับการศึกษาและประหยัดงบประมาณในการทำวิจัย อีกทั้งงานสาธิตบริการกามโรคภายใต้กลุ่มพัฒนาวิชาการ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 (คลินิกกามโรค) มีหญิงบริการมารับบริการ เฉลี่ย 240 คน/เดือน จึงสามารถใช้ศักยภาพของงานสาธิตบริการกามโรคดำเนินการดังกล่าวได้ โดยแบ่งอาสาสมัครเป็น 3 กลุ่มตามผลการตรวจทางเซลวิทยาของปากมดลูกคือ 1.) กลุ่มที่ให้ผลการตรวจเป็นปกติ 2.) กลุ่มที่ให้ผลเป็น CIN1 3.) กลุ่มที่ให้ผลเป็น CIN $\geq$ 2 จำนวนทั้งสิ้น 100 ราย เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการเกิด cervical carcinoma จากการติดเชื้อ HPV โดยผลการวัดค่าการแสดงออกของ E6/E7 HPV oncoprotein จะนำมาประเมินควบคู่ไปกับผลการติดตามดูความผิดปกติของเซลขูดปากมดลูกที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ค้นหาผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ไวมากขึ้น เพื่อส่งผู้ป่วยเข้าสู่การรักษาเพื่อป้องกันการดำเนินโรคในการลุกลามเป็นระยะที่รุนแรงมากขึ้น ทำให้สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้
- ได้เทคนิคการตรวจหา HPV E6/E7 mRNA จากเซลขูดปากมดลูกด้วยเครื่อง Flow cytometer เพื่อใช้เพิ่มความไวในการเฝ้าระวังการเกิดมะเร็งปากมดลูก
- ลดการเจ็บป่วยและเสียชีวิตจากมะเร็งปากมดลูก

บทที่ 4
วัสดุอุปกรณ์ วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

- เครื่อง FC 500 Series – Beckman Coulter
- HPV Onco Tect E6, E7 mRNA test
- Water bath
- Microcentrifuge tube 1.5 ml
- Centrifuge 1,000 X g
- Pipette 1-20 ul, 20-200 ul, 200 – 1,000 ul

สารเคมี

- PBS pH 7.4
- Formamide
- Nuclease free water

1. <u>ประสานงานกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง</u>

- ชี้แจงรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานของโครงการฯ ให้กับเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องได้แก่
  - ติดต่อกับสถานบริการในเขตอำเภอเมืองจังหวัดเชียงใหม่โดยสุ่มแบบ random จากสถานบริการในเขตเมืองเชียงใหม่ทั้งหมด 86 แห่ง

- การคัดเลือกอาสาสมัคร
- การค้นประวัติเพื่อการคัดกรองอาสาสมัคร
- การเก็บข้อมูลโดยใช้แบบสัมภาษณ์
- การเก็บตัวอย่างเซลขูดปากมดลูกและการส่งต่อไปยังห้องปฏิบัติการ

2. <u>การเก็บตัวอย่างและข้อมูล</u>

ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นการทำ pilot study คัดเลือกกลุ่มอาสาสมัครโดยสุ่มตามโควต้าเป็นหญิงอาชีพบริการในเขตอำเภอเมืองจังหวัดเชียงใหม่ อายุ 18 ปีขึ้นไป จำนวน 100 ราย

คัดเลือกกลุ่มอาสาสมัครโดยสุ่มตามโควต้าเป็นหญิงอาชีพขายบริการอายุ 18 ปีขึ้นไปจากสถานบริการในจังหวัดเชียงใหม่ ให้ผลการตรวจทางเซลวิทยาของปากมดลูกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ให้ผลการตรวจเป็นปกติ กลุ่มที่ให้ผลเป็น CIN1, CIN ≥ 2 จำนวนทั้งสิ้น 100 ราย ใช้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเป็น Liquid based cervical cytology specimens

3. <u>พื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง</u>

ในสถานบริการที่สุ่มคัดเลือกแบบ random ในจังหวัดเชียงใหม่ ทำการเก็บตัวอย่างจนครบ

4. <u>ระยะเวลาดำเนินการศึกษา</u>

2 ปี เริ่มจาก ตุลาคม 2554 – กันยายน 2556

5. <u>การวิเคราะห์ตัวอย่าง</u>

การวิเคราะห์ HPV E6/E7 mRNA ด้วยเครื่อง Flow cytometry

ใช้ตัวอย่างเซลขูดปากมดลูก ที่เก็บโดย Liquid based cervical cytology specimens (ThinPrep) จำนวน 500 ul เติม reagent ตามขั้นตอนที่กำหนดตามวิธีของ HPV HRDNA detection by Hybrid Capture II (Digene, Gaithersberg, MD) and HPV E6, E7 mRNA quantification in cells using HPV OncoTect (Invirion Diagnostics, Oak Brook IL) ตามขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมน้ำยาและตัวอย่างสิ่งส่งตรวจให้พร้อม โดยการปั่นแยกเซลขูดปากมดลูก
2. Cell Fixation และ Permeabilization
3. Pre – hybridization washes
4. Hybridization
5. Post – hybridization washes
6. นำเข้าเครื่อง flow cytometer วิเคราะห์ สรุป บันทึกผล

การตรวจหาความผิดปกติทางเซลวิทยาของเซลขูดปากมดลูก

สิ่งส่งตรวจเซลขูดปากมดลูก จะถูกส่งไปตรวจ ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดย รศ.พญ.นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข

เก็บตัวอย่างเซลขูดปากมดลูกจากหญิงอาชีพขายบริการ จากสถานบริการในจังหวัดเชียงใหม่ อายุ 18 ปีขึ้นไป จำนวน 100 รายโดยสุ่มตามโควต้า เพื่อตรวจหา HPV E6/E7 mRNA ร่วมกับติดตามความผิดปกติทางเซลวิทยาส่งห้องปฏิบัติการเพื่อทำการตรวจหา HPV E6/E7 mRNA ต่อไป

เก็บข้อมูลประวัติกลุ่มตัวอย่าง

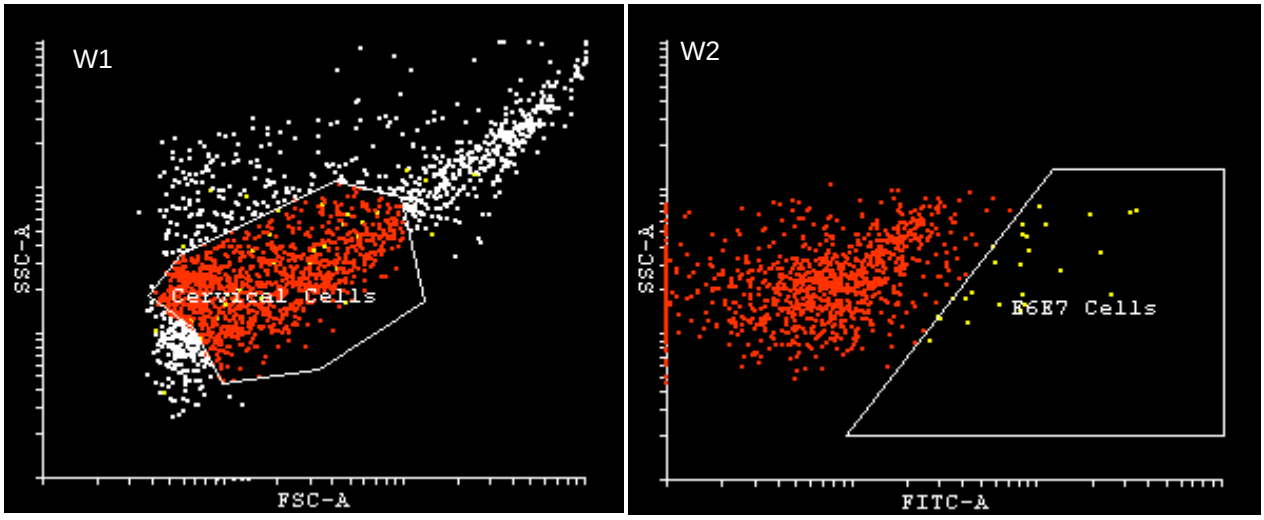
- รายละเอียดการสร้างแบบสอบถามประกอบด้วย
- ข้อมูลทั่วไป
- ข้อมูลประวัติการตรวจรักษา

การคำนวณข้อมูลทางสถิติ

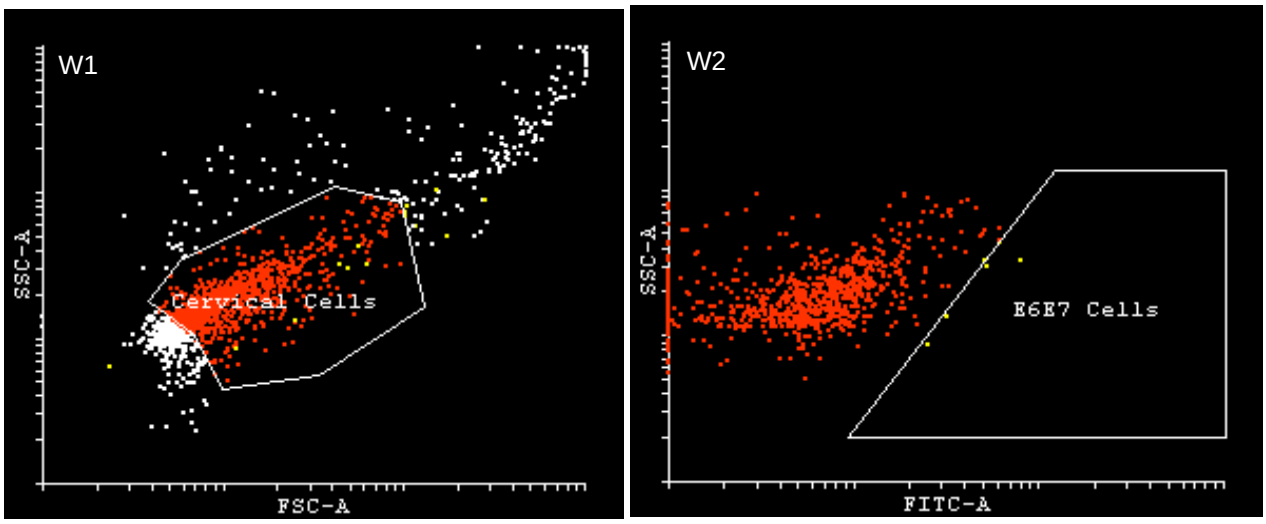
ในการวิจัยครั้งนี้จะเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของ HPV E6/E7 mRNA ในตัวอย่างเซลขูดปากมดลูกของหญิงอาชีพบริการกับการเกิดความผิดปกติของเซลที่จะพัฒนาไปเป็นเซลมะเร็ง จำนวน 100 ราย รวมทั้งวิเคราะห์รายละเอียดจากแบบสอบถามประกอบเพื่อเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังและติดตามการเกิดมะเร็งปากมดลูก

บทที่ 5

ผลการวิจัย

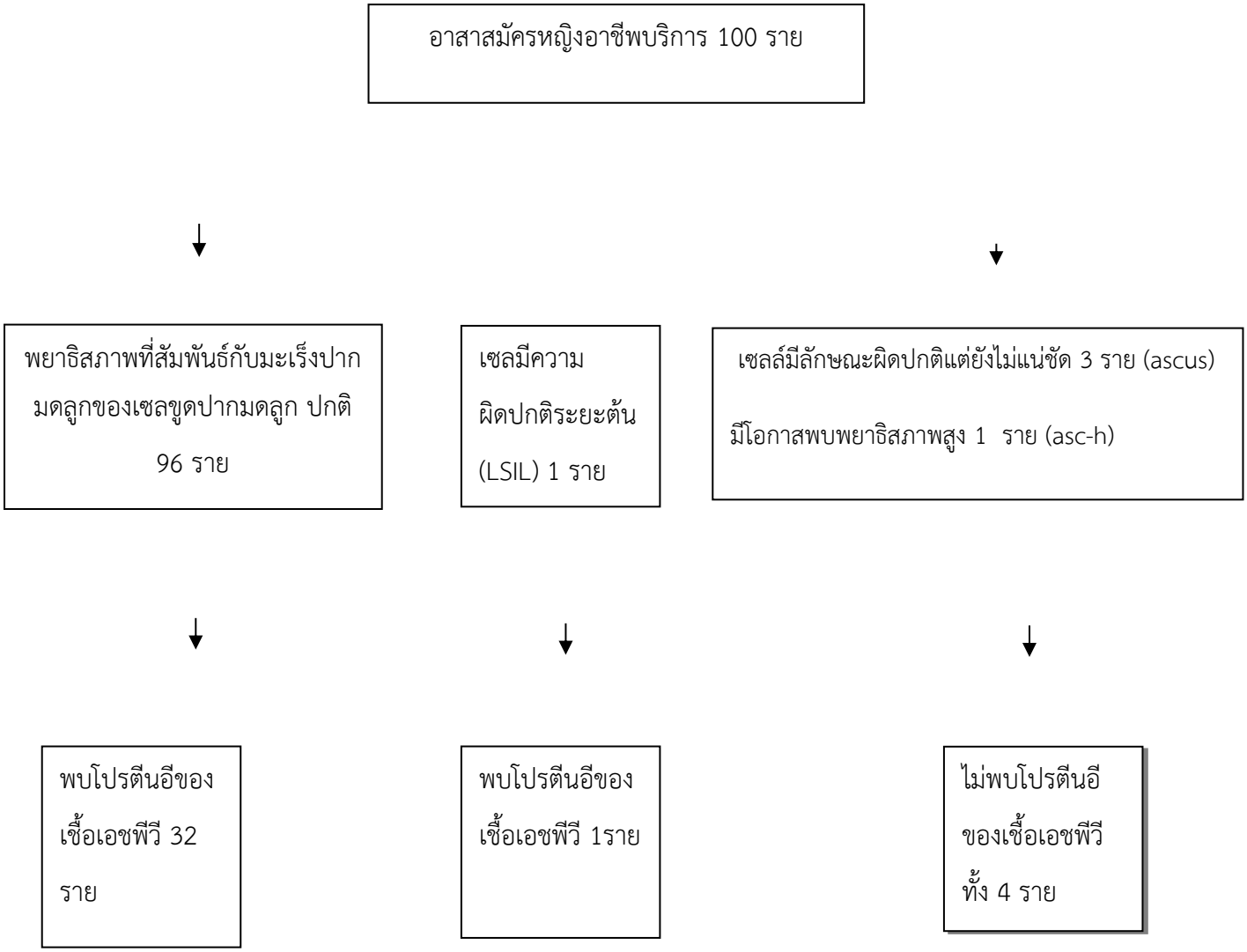


รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจหา HPV E6/E7 mRNA ด้วยเครื่อง flowcytometer ที่ให้ผล positive (E6E7 Cells % of vis = 2.6%)



รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจหา HPV E6/E7 mRNA ด้วยเครื่อง flowcytometer ที่ให้ผล negative (E6E7 Cells % of vis = 0.7%)

รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงการสรุปผลการดำเนินการวิจัย



พบว่าในอาสาสมัคร 100 รายมีผลการตรวจพยาธิสภาพที่สัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกของเซลขูดปากมดลูกปกติ (Pap smear) 96 ราย ให้ผลเซลมีลักษณะผิดปกติแต่ยังไม่แน่ชัด 3 ราย และมีโอกาสพบพยาธิสภาพสูง 1 รายให้ผลโปรตีนอีปกติ ส่วนอีก 1 รายให้ผลเซลมีลักษณะผิดปกติแต่ยังจัดเป็นระยะต้นของความผิดปกติให้ผลโปรตีนอีบวก แต่พบโปรตีนอีของเชื้อเอชพีวีบวก ถึง 32 ราย ในกลุ่มที่มีผลการตรวจทางพยาธิสภาพของเซลปกติแสดงให้เห็นถึงความไวในการตรวจหาความผิดปกติของเซลขูดปากมดลูกโดยการตรวจหาโปรตีนของเชื้อไวกว่าการตรวจทางพยาธิสภาพของเซลถึงร้อยละ 33.3 ซึ่งโปรตีนนี้เป็นยีนมะเร็งซึ่งจะมีการแสดงออกในระยะก่อนมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปากมดลูกซึ่งการตรวจพบโปรตีนอีของเชื้อจะมี

ความสัมพันธ์กับระยะก่อนมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปากมดลูกมากกว่าการตรวจชนิดอื่น ๆ ดังนั้นการติดตามดูความผิดปกติของเซลที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกเป็นข้อมูลสำคัญต่อการรักษาสำหรับประเทศไทย

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษา อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าความไวในการตรวจหาความผิดปกติของเซลขูดปากมดลูกโดยการตรวจหา HPV E6/E7 mRNA ไวกว่าการตรวจทางพยาธิสภาพของเซล (Pap smear) ถึงร้อยละ 28.1 ซึ่ง E6 และ E7 เป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดมะเร็ง (oncoprotein) โดย E6 ยับยั้งการทำงาน ของ p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor gene ทำให้เซลไม่ตายตามกำหนด (apoptosis) ส่วน E7 จะจับกับ retinoblastoma (Rb) genes ทำให้เซลแบ่งตัวไม่หยุดโปรตีน E6/E7 เป็นยีนมะเร็งซึ่งจะมีการแสดงออกในระยะก่อนมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปากมดลูก ซึงการตรวจพบโปรตีน E6/E7 จะมีความสัมพันธ์กับระยะก่อนมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปากมดลูกมากกว่าการตรวจค้นหา เอชพีวี ชนิด high risk (HPV DNA) เนื่องจากการตรวจหา HPV DNA มีความไวสูงแต่มีความจำเพาะต่ำ ไม่สามารถบอกถึง cytomorphological criteria ของเซลปากมดลูกที่ติดเชื้อและการตรวจพบ HPV DNA สามารถพบได้ใน normal cervical epithelia มีข้อมูลการรายงานในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า E6 และ E7 mRNA มีความจำเพาะในการบ่งชี้ถึง cellular transformation และภาวะ CIN2 ที่สูงกว่า ซึ่งใน life cycle ของ HPV นั้นการที่มี overexpression ของ E6/E7 mRNA ในเซลแสดงว่ามีการเกิดมะเร็งปากมดลูก

จากผลการศึกษาการพัฒนาวิธีการตรวจหา mRNA ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกเพื่อใช้พยากรณ์ความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งปากมดลูกในผู้ติดเชื้อ Human papillomavirus (ปราณี ลี้ชนะชัย, 2539) ในกลุ่มสตรีที่มารับการตรวจรักษาที่คลินิกสูตินรีเวช โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ 214 ตัวอย่าง พบสารพันธุกรรมของเชื้อในเซลล์มะเร็งระยะไม่ลุกลาม 15.38% (N = 104) และระยะลุกลาม 72.92% (N = 48) จำแนกทัยป์ได้ 47 ราย พบ8 ยีโนทัยป์ คือ HPV-16 (41.18%), HPV-18 (13.73%), -35 (13.73%), -52 (9.8%), -6 (7.84%), -11 (1.96%), -51 (1.96%) และ –59 (1.96%) ตรวจการแสดงออกของยีน E6 และ E7 ของเชื้อ HPV-16 และ HPV-18 พบ 18 ตัวอย่าง (N=21) ที่มีการยืนยันให้เห็นว่ายีน E6 และ E7 มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในเซลล์มะเร็ง ได้สรุปว่าการนำวิธีการตรวจหาการแสดงออกของยีน E6 และ E7

ของเชื้อ HPV มาประยุกต์ใช้ในการทำนายการพัฒนาของระยะมะเร็งนั้นควรรอให้มีการศึกษาในลักษณะของการศึกษาติดตามระยะยาวในกลุ่มตัวอย่างที่มากพอและต่อเนื่องก่อน

จิรานุวัฒน์ บาริศรีและคณะ (2552) ศึกษาการแสดงออกของ E6/E7 mRNA ของเชื้อไวรัส HPV ที่เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งปากทวารหนักในกลุ่มชายที่มีเพศสัมพันธ์กับชายที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อเอชไอวี พบการแสดงออกของ E6/E7 mRNA (> 2.0%) 151(61.9%) ราย ไม่พบ E6/E7 mRNA 93 (38.1%) ราย โดยการแสดงออกของ E6/E7 mRNA ในเซลปากทวารหนักมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างกลุ่ม MSM ที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อเอชไอวี (69.0% vs. 45.1%, $p < 0.05$) ซึ่งได้สรุปว่าควรมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ E6/E7 mRNA และการดำเนินโรคจนเป็น pre-cancer และ anal cancer เกิดระยะก่อนเป็นมะเร็งปากทวารหนักและมะเร็งปากทวารหนักในกลุ่ม MSM ต่อไป เพื่อประเมินความเป็นไปได้ที่จะใช้วิธีดังกล่าวในวิธีการตรวจคัดกรอง anal HPV infection ที่เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากทวารหนักในที่สุด

ดังนั้นการติดตามดูความผิดปกติของเซลที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกรวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ E6/E7 mRNA และการดำเนินโรคจนเป็น pre-cancer และ cervical cancer เกิดระยะก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก และมะเร็งปากมดลูกในกลุ่มอาสาสมัครที่มี E6/E7 mRNA positive จากการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลสำคัญที่จะประเมินวิธีคัดกรองการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่มีประสิทธิภาพต่อการรักษาสำหรับประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

1. Ferley J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: Cancer incidence mortality and prevalence worldwide. In:GLOBOCAN 2002, Version 2.0. IARC Cancer Base No.5. Lyon: IARC Press; 2004, http;//www.dep.iurc.fr/globocan/globocan.htm.
2. Hamid NA, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. Cell Mol Life Sci. 2009 May;66(10):1700-17.
3. Jabbar S, Strati K, Shin MK, Pitot HC, Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice. Virology. 2010 Aug 24.
4. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat Rev Cancer. 2010 Aug;10(8):550-60. Epub 2010 Jul 1.
5. Detection, screening and diagnosis of HPV- associated cancers. http://www.freepatentsonline.com/privacy.html. 10 March 2011.
6. Fahey MT, Irwig L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap-test occuracy. Am J Epidemiol 1995;141:680-9.
7. Agency for Health Care Policy and Research. Evaluation of cervical cytology: evidence report/technology assessment (no.5) Rockville, MD: AHCPR, January 1999. Online monograph: http://www.ahcpr.gov/clinic/epesums/cervsumm.htm.
8. Method for specifically detecting tumor cells and their precursors in uterine cervical smears by simultaneously measuring at least 2 different molecular markers. Copyright 2004-2011 . http://www.freepatentsonline.com/28 Feb 2011.
9. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Moscicki A, Smith RA, Eyre HJ, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. CA Cancer J Clin 2002;52:342-62.
10. พวงทอง ไกรพิบูลย์. มะเร็งวิวัฒน์. วารสารสมาคมรังสีรักษาและมะเร็งวิทยาแห่งประเทศไทย. ปีที่ 3 ฉบับ กรกฎาคม-ธันวาคม 2550. หน้า 17
11. Schiffman M, Kjaer SK, Chapter 2 : Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia J Natl Cancer Inst Monograph 31 2003;14-9
12. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2002, 2:342-50.

13. Schwartz E, et al. " Structure and Transcription of the human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature 1985;314:111-114
14. Grundhoefer, D and B.K. Patterson 2001 Determination of liquid-based cervical cytology specimen adequacy using cellular light scater and flow cytometry. Cytometry 46: 340-344
15. Szarewski, et al, " Comparison of Predictors for High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears", CEBP 2008:17 (ii). Nov 2008
16. Ratnam, et al, " Clinical Correlation of APTIMA HPV Assay in Comparison with hc2 Test in Cervical Cancer Screening" ISSTDR Poster July 2009
17. Dockter, et al," Clinical Performance of APTIMA HPV Assay for Detection of E6/E7 mRNA from HR HPV Types in Liquid Based Cytology Specimens" ISSTDR Poster July 2009
18. S Dockter, J, et al. Clinical performance of the APTIMA® HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high grade cervical lesions J. Clin Virol 2009 Jul; 45 Suppl 1: 555-61
19. Miralles, R., Editorial in ginecologia y obstetrician clinica, Volumen 9 Numero 3/2008, July/September
20. Kottaridi C, et al J. Inf Dis 2009 in press
21. Irwin D. and Patterson B. Quantitative analysis of HPV E6/E7 mRNA expression in cells using flowcytometry (HPV ONCOTECT) improves positive predictive value for lesionson. Abstract from the clinical cytometry society 22nd annual meeting. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 72B:482–494 (2007)
22. Möckel J, Clad A, Endres A-S and Schneider V. HPV E6/E7 mRNA transcripts as predictors of high-grade epithelial cervix dysplasia. Diagnostic Pathology 2007.
23. Fiedler M. et al. High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb-levels in cervical biopsies. The FASEB Journal. Vol. 18 July 2004: 1120-22.
24. Xavier Castellsagué. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. Gynecologic Oncology 110 (2008) S4–S7.
25. Rodriguez AC., Et al. Prospective study of type-specific carcinogenic HPV infections over 7 years in Guanacaste, Costa Rica. Proceedings of the 24th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. Beijing, China 2007. Abstracts book. Abstract 7B-02.

26. Yugawa T, and Kiyono T., 2009. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. Rev Med Virol, 19(2):97-113.