

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูก
ด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด

The Development of Animal Model for Immunotherapy Study in Cervical Cancer

รายนามผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าวพันธ์ ภัทรโกศล

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์นายแพทย์สมชัย นิรุตติศาสตร์

ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.ปกรัฐ หังสสุต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายมณฑล เลิศวรปรีชา

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

กันยายน 2554

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือขูดสัตว์ทดลองตลอดโครงการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาสรีรวิทยา ภาควิชาสัตวศาสตร์นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานและให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นต่องานวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณ อาจารย์นายแพทย์ อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาการพัฒนางานด้านอนุภาคนาโนทองคำ จนทำให้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบนำร่องได้

ในท้ายที่สุด ต้องขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ผ่านทุนอุดหนุนจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ ๒๕๔๘-๒๕๕๒

บทคัดย่อภาษาไทย

เรื่อง การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด

ผู้วิจัยหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทร โกศล

ผู้ร่วมวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช, รองศาสตราจารย์นายแพทย์สมชัย นิรุติศาสตร์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ ดร.ปกรัฐ หังสสุต และ อาจารย์มณฑล เลิศวรปรีชา

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบเป็นอันดับสองในสตรีทั่วโลก มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสเปปปีโลมา มีความพยายามศึกษากลไกการก่อมะเร็งของไวรัสเปปปีโลมาแต่ทำได้ยาก เนื่องจากไม่มีโมเดลสัตว์ทดลองที่เหมาะสม ในการศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์พัฒนาโมเดลหนูทดลองเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของแกมมา-เดลตา ทีเซลล์ (gamma-delta T cell) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก เปรียบเทียบกับการทดลองในหลอดทดลอง ผลการทดลองในหนูพบว่า การปลูกถ่ายด้วยเซลล์ HeLa จำนวนน้อยที่สุดคือ 2.5×10^5 เซลล์ สามารถทำให้เกิดก้อนเนื้ออกในหนูทดลองได้ จำนวนเซลล์ที่ปลูกถ่ายมีความสัมพันธ์กับขนาดของก้อนเนื้ออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R^2=0.98$, $y=0.1171x+4.35$) เมื่อนำเซลล์แกมมา-เดลตา ทีเซลล์ฉีดเข้าหนูทดลอง พบว่า เซลล์มีความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกและความสามารถจะเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากยาปามีโดรเนท จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีความไวต่อเซลล์แกมมา-เดลตา ทีเซลล์ที่สุดคือเซลล์ HeLa รองลงมาคือ SiHa และ CaSki กลไกการฆ่าของเซลล์แกมมา-เดลตา ทีเซลล์นั้นเกี่ยวข้องกับ CD 107 กระตุ้นผ่านทาง granzyme และ perforin มีการหลั่งไซโตไคน์ชนิด Interferon gamma และ TNF alpha ด้วย ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด นอกจากนี้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเตรียมโปรตีนบริสุทธิ์ของไวรัสเปปปีโลมา คือ E6 และพัฒนาเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน E6 ของไวรัสเปปปีโลมาเพื่อประโยชน์ในการศึกษากลไกการก่อโรคและพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Title: The Development of Animal Model for Immunotherapy Study in Cervical Cancer

Principle investigator : Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.

Co-investigators: Associate Professor Suthiluk Patumraj, Ph.D., Associate Professor Somchai Niruthisard, MD., Assistant Professor Pokrath Hansasuta, M.D., D. Phil., Mr. Monthon Lertworapreecha

Cervical cancer is the second most common cancer found in women worldwide. It causes by human papillomavirus (HPV) infection. Many attempts in studying the oncogenesis mechanism had been done with difficulty since no appropriate animal model. The objectives of this study are to develop an animal model and to study the possibility of gamma-delta T cells for immunotherapy *in vivo* (animal harbor cervical cancers) compared to *in vitro* system. The results showed that the minimal amount of HeLa cells that could induce tumor in mouse was 2.5×10^5 . The amount of implanted cells correlated significantly with the size of developed tumor ($R^2=0.98$, $y=0.1171x+4.35$). After injecting gamma-delta T cells into the tumor, the cells can kill the cervical cancer cells in that tumor. The killing efficiency enhanced in pamidronate treated cervical cancer cells. The killing efficiency of gamma-delta T cells was also demonstrated *in vitro*. The most sensitive cervical cancer cells to gamma-delta T cells was HeLa followed by SiHa and CaSki cells. The killing mechanism of gamma-delta T cells involved CD 107 through granzyme pathway, degranulation of perforin and secreting of cytokines (Interferon gamma and TNF alpha). Information obtained from this study will be useful in treatment cervical cancer patients with immunotherapy. Moreover, purified protein of HPV E6 and cells expressing E6 protein were prepared for beneficially further studies in pathogenesis and development of laboratory diagnostic test.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญรูป	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	9
บทนำ	12
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	14
ขอบเขตของโครงการวิจัย	14
ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	15
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	15
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	18
วิธีดำเนินการวิจัย	19
วัสดุและวิธีการ	19
ผลการวิจัย	30
อภิปราย/วิจารณ์	61
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	64
ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้	65
บรรณานุกรม	66
ภาคผนวก: ประวัตินักวิจัยและคณะ	69

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ oligo nucleotides ที่ใช้ในการศึกษา	20
ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและ condition ที่ใช้ในการทำ PCR ของแต่ละ primers	21
ตารางที่ 3 primers ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิด E6 และ L1	25
ตารางที่ 4 Standard cell lines used in control experiment	29
ตารางที่ 5 ผลการปลูกถ่ายเซลล์ HeLa ในปริมาณต่างๆ ในหนูทดลอง	30
ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยแกมมาเดลตาทีเซลล์	41
ตารางที่ 7 การสังเกตผลปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของอนุภาคนาโนทองคำกับ cancer cell lysate	59
ตารางที่ 8 การสังเกตผลปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของอนุภาคนาโนทองคำกับ bacterial cell lysate	60

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1 Dorsal- Skinfold Chamber เซลล์มะเร็งที่ทราบชนิดจะนำปลูกลงใน Chamber	22
รูปที่ 2 ลักษณะของหนูที่เกิดตุ่มนูนคล้าย papillomatosis และกราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ ขนาดก้อนเนื้อและระยะเวลา	31
รูปที่ 3 ภาพถ่ายเส้นเลือดแดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง	32
รูปที่ 4 ลักษณะทางเซลล์วิทยาที่พบการเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดในชั้นเนื้อ	33
รูปที่ 5 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในหนูทดลอง	34
รูปที่ 6 ผลการทดสอบและจำแนกสารพันธุกรรมของ HPV	35
รูปที่ 7 ผลการตรวจสอบยืนยันสารพันธุกรรมของ HPV โดยวิธี <i>in situ</i> hybridization	36
รูปที่ 8 เซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงได้จากเซลล์ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก	37
รูปที่ 9 ปริมาณร้อยละของแกมมาเซลล์ที่เซลล์หลังจากการกระตุ้น PBMC ด้วย pamidronate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	38
รูปที่ 10 การทำให้แกมมาเซลล์ที่เซลล์บริสุทธิ์	39
รูปที่ 11 ผลการตรวจแกมมาเซลล์ที่เซลล์ที่ทำให้บริสุทธิ์และย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะชนิดต่าง ๆ ด้วย Flow cytometry	40
รูปที่ 12 ค่าเฉลี่ยปริมาณไซโตไคน์ IFN γ (pg/ml, \pm SD) ที่หลังหลังจากแกมมาเซลล์ที่เซลล์	42
รูปที่ 13 ค่าเฉลี่ยปริมาณไซโตไคน์ TNF α (pg/ml, \pm SD) ที่หลังหลังจากแกมมาเซลล์ที่เซลล์	43
รูปที่ 14 ภาพหนูทดลองขณะกำลังมีชีวิต	44
รูปที่ 15 ผลการฆ่าเซลล์มะเร็งในหนูทดลองของแกมมาเซลล์ที่เซลล์	45
รูปที่ 16 ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue ของ GST-HPV16E6	47
รูปที่ 17 ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue ของ GST-HPV16L1	48
รูปที่ 18 ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue A: GST-HPV16E6, B: GST-HPV16L1	49
รูปที่ 19 SDS-PAGE and Western blot analysis ของ GST-HPV16E6	50
รูปที่ 20 SDS-PAGE analysis ของ GST-HPV16L1	51
รูปที่ 21 ผลการเพิ่มจำนวนยีน HPV-16E6	52
รูปที่ 22 จำนวนเซลล์ RKO ที่มีชีวิตหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ neomycin ที่ความเข้มข้น 0, 500, 1,000, 2,000 and 2,500 μ g/ml	53

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 23 pCI-Neo-E6 transfected RKO cells	53
รูปที่ 24 การตรวจหาโปรตีน HPV16E6 ที่สกัดจากเซลล์ RKO-E6	54
รูปที่ 25 กราฟแสดงค่า OD 580 nm เฉลี่ย ที่ระดับความเจือจางของแอนติบอดี E6	56
รูปที่ 26 กราฟแสดงการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกันของอนุภาคนาโนทองคำ กับแอนติเจน L1	57
รูปที่ 27 ปฏิกิริยาของอนุภาคนาโนทองคำ	58
รูปที่ 28 กราฟแสดงความไวของการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกัน	58

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ATCC	=	American Type Culture Collection
Au	=	Gold
AuNPs	=	Gold nanoparticles
CaCx	=	Cervical cancer
CIN	=	Cervical intraepithelial neoplasia
CSF	=	Cerebrospinal fluid
CTL	=	Cytotoxic T lymphocyte
DAB	=	Diaminobenzidine
Db	=	Decibell
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxynucleotide triphosphates
DTT	=	Dithiothreitol
E2F	=	Elongation factor 2
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetate
ELISA	=	Enzyme linked immunosorbent assay
FBS	=	Fetal bovine serum
FDA	=	Food and Drug Administration
FITC	=	Fluorescein isothiocyanate
GST	=	Glutathione S-transferase
HCl	=	Hydrochloric acid
HEPES	=	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPV	=	Human papillomavirus
Hr	=	Hour
IgG	=	Immunoglobulin G
IFN- γ	=	Interferon- γ (gamma)
IP	=	Intra peritoneal
IPP	=	Isopentenyl pyrophosphate
IPTG	=	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IL	=	Interleukin
K ₂ CO ₃	=	Potassium carbonate

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

KCl	=	Potassium chloride
kDa	=	Kilodalton
KH_2HPO_4	=	Dipotassium hydrogen phosphate
L	=	Liter
LDH	=	Lactate dehydrogenase
M	=	Molar
mAb	=	Monoclonal antibody
MACS	=	Magnetic activating cell sorter
MCP-1	=	Monocyte chemoattractant protein-1
MEM	=	Minimal essential medium
MEP	=	Mevalonate pathways
MgCl_2	=	Magnesium chloride
MHC I	=	Major histocompatibility complex class I
MHC II	=	Major histocompatibility complex class II
Min	=	Miniute
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
mRNA	=	Messenger RNA
Na_2HPO_4	=	Sodium phosphate
NaCl	=	Sodium chloride
nBP	=	Nitrogen bisphosphonate
NF- κ B	=	Nuclear factor kappa B
nm	=	Nanometer
OD	=	Optical density
PBMC	=	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	=	Phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
pRb	=	Retinoblastoma protein
RNA	=	Ribonucleic acid
rpm	=	Revolutions per minute

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

RPMI	=	Rosewell Park Memorial Institute
SDS	=	Sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	=	Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
ssDNA	=	Single strand DNA
TBS	=	Tris buffer saline
TEMED	=	Tetramethylethylenediamine
TNF- α	=	Tumor necrosis factor- α
μ l	=	microliter

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบได้ เป็นอันดับต้นๆ ในสตรีทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศไทยกำลังพัฒนา ซึ่งรวมประเทศไทยด้วย จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (1) มะเร็งปากมดลูกจัดเป็นมะเร็งอันดับหนึ่งที่ได้พบได้ในผู้หญิงไทย ซึ่งนับว่าเป็น โรคระบาดที่ก่อปัญหาทางสาธารณสุขและส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ จากรายงานการศึกษาถึงสาเหตุ ของมะเร็งปากมดลูกจำนวนมากทั่วโลก (2,3,4,5) มีข้อมูลที่ได้รับการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์อย่างชัดเจนว่าสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูกเกิดจากการติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) ซึ่งจัดเป็นเชื้อไวรัสที่สามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ (Sexual transmitted disease) HPV เป็น ไวรัสใน Family *Papillomaviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น DNA สายคู่ ขนาดประมาณ 7.9 kb. เชื้อ HPV มีอยู่หลายสายพันธุ์ด้วยกัน โดยปัจจุบันพบเชื้อ HPV ประมาณ 200 สายพันธุ์ (6) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามตำแหน่งที่มีการติดเชื้อคือ

1. Cutaneous group พบการติดเชื้อ ที่อวัยวะบริเวณ ผิวหนังทั่วไปและมือ
2. Mucosal group พบเกิดการติดเชื้อ ที่บริเวณเยื่อเมือกเป็นส่วนใหญ่ เช่น ระบบทางเดินหายใจ และ ระบบทางเดินปัสสาวะ และอวัยวะสืบพันธุ์

เชื้อ HPV ที่พบว่ามีความสำคัญกับการเกิดมะเร็งปากมดลูก จัดอยู่ในกลุ่มของ mucosal group ในปัจจุบัน พบประมาณ 20 สายพันธุ์ที่จัดเป็น mucosal group และมีความสัมพันธ์กับการก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก เชื้อ HPV ในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Low risk HPV type การติดเชื้อไวรัสในกลุ่มนี้ มีโอกาสพัฒนาเป็นเป็นมะเร็งได้ น้อย สายพันธุ์ที่สำคัญในกลุ่มนี้ เช่น HPV 6 และ 11
2. High risk HPV type การติดเชื้อไวรัสในกลุ่มนี้จะมีการโอกาสพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้สูง เชื้อสายพันธุ์ที่สำคัญที่พบมีการระบาดในประเทศไทย เช่น HPV-16 และ HPV – 18

กลไกสำคัญที่ทำให้เกิดมะเร็ง พบว่าสารพันธุกรรมของไวรัสสามารถสอดแทรกเข้าไปในพันธุกรรมของเซลล์เจ้าบ้าน การสอดแทรกนี้มีผลทำให้มีการสร้างโปรตีน 2 ชนิดออกมาจำนวนมาก คือ Early (E) 6 และ 7 จากการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลทำให้ทราบว่า โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้เป็น oncoprotein โดยพบว่า E6 เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับ tumor suppressor protein คือ p53 ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการกระตุ้นให้เซลล์ เกิด apoptosis การจับเกาะระหว่าง E6 และ p53 จะเร่ง ให้ p53 ถูกทำลายไป เกิดการหยุดยั้งขบวนการ apoptosis นอกจากนี้ E7 ยังสามารถจับกับ Retinoblastoma protein (pRb) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ ผลของโปรตีนทั้งสองของไวรัส ทำให้เซลล์มีการ

เจริญอย่างไม่มีที่สิ้นสุด นับเป็นกลไกสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง (7,8)

ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาจำนวนมากที่ศึกษาถึงกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ HPV เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสเปปิโลมา พบว่าระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายก็มีการตอบสนอง แต่แตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล ในผู้หญิงส่วนมากหลังการติดเชื้อไวรัสเปปิโลมาพบว่าร่างกายสามารถกำจัดไวรัสออกไปได้เองภายใน 6 เดือน แต่ก็มีส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถกำจัดไปได้ และทำให้เกิดภาวะการติดเชื้อระยะยาว ซึ่งกลุ่มนี้จะมีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ แอนติบอดีที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อที่เรียกว่า Neutralizing antibody ซึ่งจำเพาะต่อส่วนของ L1 นั้น มีรายงานว่ามียับยั้งบทบาทความสำคัญในการควบคุมไวรัสและลดความเสี่ยงของการพัฒนาเซลล์ติดเชื้อเป็นเซลล์มะเร็ง (9) การตอบสนองของเซลล์ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะ มีรายงานบทบาทของ cytotoxic T lymphocyte (CTL) ที่จำเพาะต่อไวรัสเปปิโลมา ในการควบคุมและลดความเสี่ยงของการพัฒนาเซลล์ติดเชื้อเป็นเซลล์มะเร็งเช่นกัน โดยพบว่าผู้ติดเชื้อไวรัสที่มีระดับการตอบสนองของ CTL สูง จะมีความเสี่ยงในการพัฒนาเป็นโรคมะเร็งต่ำกว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสและมีระดับการตอบสนองของ CTL ต่ำ (10)

การตรวจพบแอนติบอดี และการตอบสนองทางเซลล์ ต่อการติดเชื้อ HPV ที่พบเหล่านี้นำไปสู่การพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ HPV ในปัจจุบันมีวัคซีนที่ได้รับการพัฒนา และได้มีการนำมาศึกษาในขั้นตอนการทดลองใช้ในคนแล้ว ซึ่งวัคซีนที่กำลังศึกษาอยู่ เป็นวัคซีนที่เตรียมจาก L1 โปรตีน ซึ่งเป็น major capsid protein ของไวรัส โดยเป้าหมายของวัคซีนชนิดนี้ เพื่อการกระตุ้นให้ร่างกายสามารถสร้าง แอนติบอดีเพื่อป้องกันการติดเชื้อเป็นสำคัญ (11,12) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาจำนวนมาก (13,14) ที่ยืนยันว่าภูมิคุ้มกันโดยอาศัยเซลล์ โดยเฉพาะ (Cytotoxic T lymphocyte; CTL) ที่จำเพาะต่อ E7 โปรตีนของไวรัส มีบทบาทสำคัญในการกำจัดและทำลายเซลล์มะเร็ง ซึ่งผลการศึกษานี้ นำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันบำบัด (immunotherapy) แต่ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและวิธีในการรักษามะเร็งโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันบำบัด คือโมเดลที่จะใช้ในการศึกษาในสัตว์ทดลอง ทั้งนี้เป็นเพราะว่า เชื้อ HPV เป็นไวรัสที่ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงใน เซลล์เพาะเลี้ยงได้

ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา มีความพยายามทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง เพื่อการทดลองวัคซีน และการรักษามะเร็งปากมดลูก ซึ่งการศึกษาส่วนใหญ่เป็นการใช้ cell ที่ถูก transform ด้วย E6/E7 oncogene ของ HPV(15) หรือ การ cell line ของมะเร็งปากมดลูกที่มีเชื้อ HPV สอดแทรกอยู่ในโครโมโซม (16, 17) ฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง ซึ่งสามารถทำให้สัตว์ทดลองนั้นเกิดก้อนเนื้อออกได้ อย่างไรก็ตาม transformed cell หรือ cell line ที่ใช้ยังคงมีความแตกต่างไปจากเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง และสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาโดยส่วนใหญ่ ก็ยังมีระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถ

ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นการวัดผลที่ได้จากการศึกษาอาจทำให้เกิดมีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงไปได้

ดังนั้น วัตถุประสงค์สำคัญในการศึกษานี้เพื่อ พัฒนาโมเดลสัตว์ทดลอง โดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาวิธีการรักษาโดยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก

1. เพื่อพัฒนาการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกของคนในสัตว์ทดลอง
2. เพื่อศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (T cell) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกในสัตว์ทดลอง

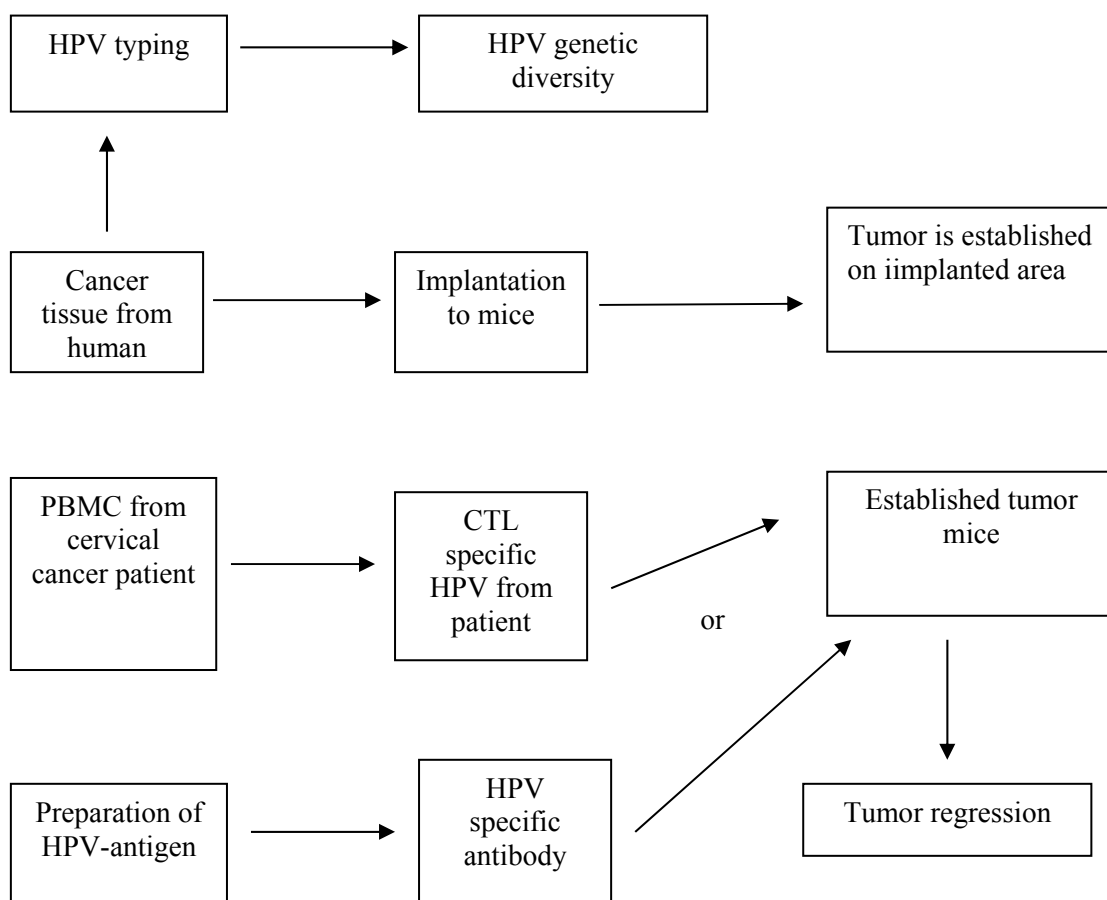
วัตถุประสงค์รอง

1. สามารถเตรียมแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการศึกษานี้ จะใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือดจากผู้ป่วยเฉพาะที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เท่านั้น การทดลองในสัตว์ จะทำที่ศูนย์สัตว์ทดลอง ดิศริวิททยา คณะแพทยศาสตร์ โดยส่งสัตว์ทดลองจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา การวิจัยนี้จะเริ่มดำเนินการหลังจากผ่านการพิจารณาจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

เชื้อ HPV เป็นสาเหตุที่ก่อโรคหลายๆ โรคในคน ทั้งที่เป็นเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง (benign tumor) เช่น common skin wart ไปจนกลายเป็นมะเร็ง ซึ่งมะเร็งปากมดลูกนับเป็นโรคมะเร็งที่พบได้มากเป็นอันดับต้นๆ ในผู้หญิงทั่วโลก จัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ปัญหานี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามศึกษาเพื่อหาวิธีการในการป้องกัน และรักษา การติดเชื้อ HPV แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาเชื้อ HPV ในการก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก นั้นยังคงมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อไวรัสไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงดังเช่นเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ และนอกจากนี้เชื้อ HPV เป็นไวรัสที่มีความจำเพาะต่อ species สูงไม่พบว่ามีการศึกษาเชื้อไวรัสข้ามสายพันธุ์ (species) เหตุผลนี้ทำให้การศึกษาทางด้านพยาธิกำเนิด (pathogenesis) ของโรคนั้นทำได้ลำบากและมีข้อจำกัด

โมเดลที่ใช้ในการศึกษา เชื้อ HPV ในรูปของ *in vivo* ที่มีการนำมาใช้ คือการปลูกถ่ายเซลล์ ที่มีลักษณะของเซลล์มะเร็ง เช่นการใช้ cell line ที่มี HPV แทรกอยู่ใน chromosome ฉีดเข้าสู่สัตว์ทดลอง แล้วศึกษาการเกิดเนื้องอกในสัตว์ทดลองนั้น ซึ่งมีรายงานพบว่าการใช้ CaSki, HeLa, ME180 ซึ่งเป็น cell line ของมะเร็งปากมดลูก ที่มีเชื้อ HPV สอดแทรกอยู่ ฉีดเข้าสู่ SCID mice สามารถชักนำให้หนูนั้นเกิดเนื้องอกขึ้นได้ (16) ซึ่งการศึกษานี้เป็น โมเดลสำคัญที่ทำให้สามารถนำมาใช้ศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคนอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาโดยการใช้เนื้อเยื่อของหูด ที่ตัดจากผู้ป่วยโดยตรง และทำการ inoculate เชื้อ HPV-6 และ 11 ลงไปก่อนที่จะนำไปปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง ซึ่งวิธีนี้ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนเชื้อ HPV ได้ในสัตว์ทดลอง (17)

การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองสำหรับการศึกษา HPV ที่สำคัญประการหนึ่งคือ การศึกษาการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน รวมทั้งการรักษามะเร็งโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันบำบัด ซึ่งมีรายงานการศึกษา โดยการใช้ peptide ที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ CTL และทดสอบความสามารถของ CTL นั้นในการกำจัดเซลล์มะเร็งที่ได้จาก lung epithelium cell ซึ่งถูก transformed ด้วย E6 และ E7 ของ HPV-16 นำมาปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง ซึ่งผลปรากฏว่า CTL นั้นสามารถกำจัดเซลล์มะเร็งนั้นได้ (15)

อย่างไรก็ตามการศึกษาต่างๆ เหล่านี้ยังคงมีข้อให้โต้แย้งอยู่บางประการ เช่นการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งลงในสัตว์ทดลอง ซึ่งบางการศึกษาใช้ cell line ซึ่งอาจมีความแตกต่างไปจากเซลล์มะเร็งที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง หรือการใช้ HPV ที่เป็น low risk ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่น้อย ในขณะที่บางการศึกษาใช้เซลล์ปกติที่ถูก transformed ด้วยโปรตีนของ HPV เหล่านี้อาจทำให้ผลการศึกษานั้นมีความคลาดเคลื่อนไปได้ เมื่อเทียบกับการใช้เซลล์มะเร็งที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง นำมาปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง ซึ่งปัจจุบันยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน ดังนั้นหากสามารถพัฒนาโมเดลนี้ได้ จะทำให้สามารถทำการศึกษาทั้งทางด้านพยาธิกำเนิด และ การรักษา หรือการทดสอบวัคซีนได้ผลน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

การดูแลสัตว์ทดลอง

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มุ่งหวังที่จะพัฒนาโมเดล เพื่อการรักษามะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันบำบัด (immunotherapy) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการใช้สัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นหนูที่ไม่มีต่อมไทมัสและมีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (nude mouse) ทำให้ไม่มีปฏิกิริยาปฏิเสธอวัยวะแปลกปลอม ที่ทำการปลูกถ่ายเข้าไป ซึ่งการศึกษานี้เลือกใช้หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c-nude mice อายุ 8-10 อาทิตย์ น้ำหนักประมาณ 20-25 กรัม ซึ่งหนูพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ที่มีการนำมาใช้ในการศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งและการรักษา โดยจะทำการจัดซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประมาณ 150 ตัว โดยสัตว์ทดลองจะทำการเลี้ยงในกรงสำหรับเลี้ยงหนู ที่จัดอยู่ในห้องควบคุมเชื้อ ที่ศูนย์สัตว์ทดลอง ดิศาสตร์วิทยา คณะแพทยศาสตร์ โดยจัดให้มีการควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ดังนี้

- จะทำการเลี้ยง หนู 1 ตัว / กรง
- หนูทดลองจะเลี้ยงในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิโดยเฉลี่ยประมาณ $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$
- ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 90 \%$
- วงจรการให้แสง 12 ชั่วโมงสว่าง 12 ชั่วโมงมืด
- มีการถ่ายเทอากาศเพียงพอ โดยอากาศที่ผ่านเข้ากรงหนูทดลอง จะถูกกรองด้วยแผ่นกรองอากาศเพื่อให้ได้อากาศที่สะอาด
- วัสดุรองพื้นจะผ่านการฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้
- ระดับเสียงต่ำกว่า 60 db
- มีการดูแลให้อาหารและน้ำตามแนวทางปฏิบัติของ Home office guidelines on the scientific use of animal (Scientific procedures) Act 1986 โดยใช้อาหารเม็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และใช้น้ำซึ่งผ่านการกรองแล้ว ใส่ในกรงเพื่อให้สัตว์ได้กินตลอดเวลา ซึ่งการดูแลสัตว์และให้อาหารจะปฏิบัติโดยเจ้าหน้าที่ซึ่งผ่านการฝึกอบรมการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ในวันที่ทำการทดลองหนูแต่ละตัวจะถูกทำให้สลบโดยการให้ยาสลบที่เหมาะสม (Pentobarbital 50 mg/kg IP) แล้วใส่ Dorsal- Skinfold Chamber บนหลัง โดยในการศึกษาระยะแรก จะทดลองโดยใช้เซลล์มะเร็งที่ทราบชนิดของไวรัสแบปปีโลมา (HeLa cell) ในปริมาณเซลล์ที่ต่างกัน (แปดแสน- สองล้านเซลล์) ใส่ลงใน Dorsal- Skinfold Chamber จึงทำการปิด Chamber โดยใช้กระจกเพื่อป้องกัน ให้อยู่บริเวณนั้น ภายใน Chamber และจะใช้หนูไม่น้อยกว่า 5 ตัว สำหรับแต่ละกลุ่ม ภายหลังจากทราบปริมาณที่เหมาะสมของเซลล์ในการปลูกถ่ายลงในตัวหนู แล้วจึงจะเริ่มใช้เซลล์มะเร็งที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง

การจัดการสัตว์ทดลองหลังสิ้นสุดการศึกษา

เมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง หนูที่ทำการทดลอง จะถูกทำให้ตายโดยให้มีความทรมานน้อยที่สุด โดยการให้ยาสลบ Barbiturate (Pentobarbital) ในขนาดที่สูง ฉีดเข้าสู่ช่องท้องของหนูทดลองเพื่อทำให้หนูตาย และซากของหนูทดลอง จะถูกนำไปทำลายโดยการเผาในเตาเผาซากสัตว์ต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ผลการศึกษานี้คาดว่าจะสามารถเผยแพร่โดยการตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการในสาขา ที่เกี่ยวข้องกับระดับชาติ และนานาชาติ
2. สามารถพัฒนาโมเดลเพื่อการศึกษาพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อ HPV ในสัตว์ทดลองได้
3. มีแอนติเจนจำเพาะของ HPV ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาชุดตรวจสอบ HPV
4. เข้าใจกลไกและบทบาทในการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดย T cell ซึ่งอาจนำมาใช้เพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งในคนได้
5. สามารถสร้างและพัฒนาบุคลากรทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทั้งระดับปริญญาโทและปริญญาเอก

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ

1. การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองโดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเรื้องปากรมดลูกของคนในสัตว์ทดลอง
2. การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (T cells) ต่อเซลล์มะเร็งเรื้องปากรมดลูกที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)
3. การเตรียมแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็น
 - 3.1. การเตรียมแอนติเจนจำเพาะต่อไวรัสแปปิโลมาชนิดโปรตีนบริสุทธิ์
 - 3.2. การพัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีแอนติเจนของไวรัสแปปิโลมา
4. การพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ

วัสดุและวิธีการ

1. เซลล์มะเร็งเรื้องปากรมดลูก

เซลล์ HeLa, Caski, และ SiHa ทั้งหมดเป็นเซลล์มะเร็งเรื้องปากรมดลูกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา โดย HeLa มีการติดเชื้อของไวรัสแปปิโลมาชนิด 18 Caski (ATCC :CRL-1550 Lot No: 3794357) และ SiHa (ATCC: HTB-35 Lot No: 4031219) เป็นเซลล์ที่มีการติดเชื้อของไวรัสแปปิโลมาชนิด 16 เซลล์ทั้งสามชนิดนี้มีสารพันธุกรรมของไวรัสสอดแทรกอยู่และสามารถทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้อย่างต่อเนื่อง โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (MEM) ที่มีสารอาหารและยาปฏิชีวนะ ต่าง ๆ ผสมอยู่ เช่น 10% fetal bovine serum (FBS), 2 uM L-Glutamine, 10 mM HEPES, streptomycin (100 mg/ ml) และ penicillin (100 unit/ml) เป็นต้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์

2. เซลล์ปากมดลูกปกติของคน

เก็บจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และจำเป็นต้องทำการตัดชิ้นเนื้อเพื่อการวินิจฉัยโรคว่าเป็นมะเร็งเรื้องปากรมดลูกหรือเพื่อการรักษาผ่าตัดเนื้อออก การเก็บตัวอย่างทำโดยสูตินรีแพทย์ ที่ภาควิชาสูติศาสตร์-รีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ นำเนื้อเยื่อปากมดลูกของผู้ป่วยที่ได้จากการผ่าตัด แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM

F12 (GIBCO) ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บจะรีบนำมาทำการย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ทันที โดยทำการตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเล็กราวประมาณ 1 ตารางมิลลิเมตร แล้วนำไปปั่นล้างใน Hank's Balanced Salt solution (HBSS) 2 ครั้ง แล้วนำไป incubate ใน digestion solution (1X DMEM F 12, 10% FBS, 5,000u/ml of penicillin, 5,000 ug/ml of streptomycin, 50u/ml of collagenase) 37 ° C ซ้ำมกั้น หลังจากนั้น นำเซลล์ที่ได้มาทำการปั่นล้าง ด้วย HBSS จำนวน 3 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM F12 ที่ประกอบด้วย 10% FBS, penicillin 5,000 u/ml, streptomycin 5,000 ug/ml, epidermal growth factor 10ng/ml, hydrocortisone 0.4ug/ml หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง เมื่อเซลล์เริ่มเติบโต ทำการแยกเฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์เนื้อเยื่อปกติ ให้บริสุทธิ์อีกครั้ง เซลล์ที่แยกได้นี้ให้ชื่อว่า NTY ซึ่งเซลล์ปากมดลูกปกตินี้ใช้เป็นเซลล์ควบคุมตลอดการศึกษาครั้งนี้

3. การตรวจหาสารพันธุกรรม HPV

ตัวอย่างเซลล์มะเร็ง นำมาทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Qiagen DNA mini kit แล้วทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ HPV โดยเทคนิค PCR ด้วย primer L1 (18) ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HPV ได้อย่างน้อย 11 ชนิด คือ (HPV 6, 11,16, 18, 31, 33, 42, 52, 58, 34 และ 36) โดยลำดับเบสของ primers และ conditions ที่ใช้ในการทำ PCR แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ oligo nucleotides ที่ใช้ในการศึกษา

Name	Sequence (5' - 3')	Target
L1C1	CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT	HPV-L1
L1C2	TACCCTAAATACTCTGTATTG	HPV-L1
PC04	CAACTTCATCCACGTTCCACC	Human β - goblin
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	Human β - goblin
GAPDH1	CAGTTGTGGTGGTGTCTTCC	Mouse GAPDH
GAPDH2	CTTGAGGCCAAAAGAGAAG	Mouse GAPDH

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและ condition ที่ใช้ในการทำ PCR ของแต่ละ primers

Primer	reaction (50ul)	condition	product size
L1C1 L1C2	1X buffer (100 mM.KCl, 20 mM Tris.) 1.5 mM MgCl ₂ 200 uM dNTPs 25 pmole primers 1.25 units of Taq 1 ul of DNA sample	Start 95 ° C 10 min 1 cycle Denature 95 ° C 1.30 min Annealing 40 ° C 1.30 min Extension 72 ° C 2 min Extension 72 ° C 10 min	40 250 bps.
PC04 GH20	1X buffer (100 mM.KCl, 20 mM Tris.) 1.5 mM MgCl ₂ 200 uM dNTPs 2.5 pmole primers 1.25 units of Taq 1 ul of DNA sample	Start 94 ° C 10 min 1 cycle Denature 94 ° C 30 sec Annealing 62 ° C 1min Extension 68 ° C 1 min Extension 68 ° C 1 min	40 268 bps
GAPD H1 GAPD H2	1.5 mM MgCl ₂ 200 uM dNTPs 25 pmole primers 1.25 units of Taq 1 ul of DNA sample	Start 94 ° C 10 min 1 cycle Denature 94 ° C 30 sec Annealing 62 ° C 1min Extension 68 ° C 1 min Extension 68 ° C 1 min	40

4. การจำแนกไทป์ HPV

ทำการจำแนกชนิดของ HPV ด้วยชุดทดสอบ HPV genotyping kit (INNO-LiPA HPV genotyping V2; Innogenetics) ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสามารถทำการจำแนกชนิดของ HPV ครอบคลุม 26 ชนิด โดยขั้นตอนการทดสอบจะปฏิบัติตามคู่มือที่แนบมากับชุดทดสอบ ซึ่งชุดตรวจสอบใช้หลักการ ของ reverse hybridization โดยสารพันธุกรรมของ HPV ในบางส่วนของบริเวณ L1 ที่เพิ่มจำนวนได้จากวิธี PCR จะถูกติดฉลากด้วย biotin หลังจากนั้นจะถูกทำให้เสียสภาพแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว แล้วนำไปทำการ hybridize กับ specific probes ที่จำเพาะต่อ HPV แต่ละชนิดที่ถูกตรึงเป็นแถวอยู่บนแผ่นเมมเบรน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบสารพันธุกรรมที่สามารถจับกับ probes ได้โดยการเติม streptavidin ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase ตามด้วย substrate ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ จะเกิดปฏิกิริยาทำให้เกิดสีม่วงบริเวณตำแหน่งที่สารพันธุกรรมของ HPV จับกับ specific probes นั้น ทำให้ทราบว่าเป็น HPV ชนิดใด

5. สัตว์ทดลอง

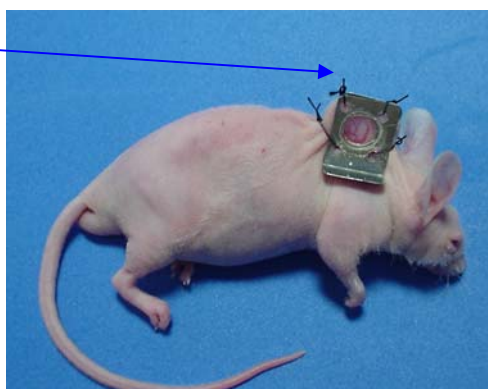
หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c-nude mice อายุ 8-10 อาทิตย์ น้ำหนักประมาณ 20-25 กรัม สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล หนูทดลองจะทำการเลี้ยงภายในห้องควบคุมเชื้อ และอุณหภูมิ ที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มีการดูแลให้อาหารและน้ำ ตามแนวทางปฏิบัติของ Home office guidelines on the scientific use of animal (Scientific procedures) Act 1986

6. การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง

ในวันที่ทำการทดลอง หนูแต่ละตัวจะถูกทำให้สลบโดย Phentobarbital sodium 5-9 mg/100 g ทางช่องท้อง (IP) แล้วใส่ Dorsal- Skinfold Chamber บนหลัง (ดังรูปที่ 1) โดยจะทดลองใช้เซลล์มะเร็งที่ทราบชนิดของไวรัสเปปโตไมโนปริมาณเซลล์ที่ต่างกัน (แปดแสน-สองล้านเซลล์) [11] ใต้งใน Dorsal- Skinfold Chamber จึงทำการปิด Chamber โดยใช้กระจก เพื่อป้องกัน ให้อยู่บริเวณนั้น ภายใน Chamber และจะใช้หนูไม่น้อยกว่า 5 ตัว สำหรับแต่ละกลุ่ม

รูปที่ 1

Dorsal- Skinfold Chamber
เซลล์มะเร็งที่ทราบชนิดจะนำ
ปลูกลงใน Chamber



7. การศึกษาเพื่อยืนยันการเจริญของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง

1. การตรวจทางพยาธิวิทยา ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตรงกลาง Chamber นำไปผ่านขบวนการ paraffin embedding แล้วตัดชิ้นเนื้อดังกล่าวเป็นแผ่นบาง ลงในสไลด์ เพื่อนำไปย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) และอ่านผลโดยพยาธิแพทย์

2. การตรวจสอบหาสารพันธุกรรม HPV ภายในเซลล์ ตัดชิ้นเนื้อจาก paraffin embedded tissue เป็นแผ่นบาง นำไปทำการตรวจสอบสารพันธุกรรมของ HPV ด้วยวิธี *in situ* hybridization โดยห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาและจุลชีววิทยาโมเลกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

3. การตรวจการเพิ่มขึ้นของหลอดเลือด เมื่อครบ 14 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์ (Tumor angiogenesis) นำหนูทำการตรวจดูการเพิ่มขึ้นของหลอดเลือด โดยวิธี Intravital Fluorescein Videomicroscopy และใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ภาพ Digital Image Analysis

8. การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด gamma delta T lymphocytes

ทำการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell ที่มีคุณสมบัติเป็น gamma delta T lymphocytes โดยใช้ตัวอย่างเลือด buffy coat ที่แยกได้จากผู้บริจาคโลหิตที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งเซลล์ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์แปลกปลอมของร่างกายโดยไม่ต้องอาศัย Major histocompatibility complex (MHC) วิธีทำโดยย่อคือ ทำการแยก Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) จาก buffy coat โดยผ่าน Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation หลังจากนั้นนำ PBMC มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (PAA, Austria) ที่มี 2 mM L-glutamine ยาปฏิชีวนะ 10 mM HEPES และ 10% fetal bovine serum (PAA, Austria) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ และทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย 10uM pamidronate (Novartis) 1 ครั้ง และตามด้วย 100u/ml of IL-2 (PeproTech, USA) ทุก 3 วัน เมื่อครบ 14 วัน จึงทำการแยก gamma delta T lymphocytes จาก PBMC โดยใช้ miniMACS (Miltenyi Biotech, Germany) และ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry

9. การทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยเซลล์ gamma delta T lymphocytes ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

9.1 Cytotoxicity test นำเซลล์ gamma delta T lymphocytes ที่เตรียมให้บริสุทธิ์แล้ว มาทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกในหลอดทดลอง การทดสอบใช้ชุดทดสอบ LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche) ในเบื้องต้นได้ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด คือ HeLa cell, SiHa cell และ Caski cell และใช้ NTY cell ซึ่งเป็น normal

human fibroblast ที่แยกได้จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก เป็นเซลล์ควบคุม โดยทำการแบ่งเซลล์มะเร็งทั้งหมดออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้รับยา pamidronate และ กลุ่ม 2 ไม่ได้รับยา pamidronate โดยใช้อัตราส่วนของ effectors: target cells ที่ 20:1 และ 40:1 ตามลำดับ

9.2 **Cytokine detection** ทำการทดสอบกลไกการฆ่าเซลล์มะเร็งโดยการวิเคราะห์ตรวจหา Cytokines ที่หลั่งออกมาในระหว่างการฆ่าเซลล์ ได้แก่ Interferon-gamma, Tumor necrotic factor –alpha ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปของ PeproTech, USA

10. การทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยเซลล์ gamma delta T lymphocytes ในหนูทดลอง (*in vivo*)

10.1 **ทดสอบการคงอยู่ของเซลล์ gamma delta T lymphocytes** ทำการติดตามเซลล์ gamma delta T lymphocytes ด้วยน้ำยา CellTracker green (5-chloromethyl fluorescein diacetate; CMFDA, Invitrogen, USA) แล้วนำเซลล์ที่ติดตามติดเข้าสู่บริเวณที่มีการปลูกเซลล์มะเร็งในหนูโดยฉีดหลาย ๆ ตำแหน่ง ทำการตรวจสอบความคงอยู่ของเซลล์ด้วย *in vivo* imaging System (Kodak, USA) ทันทีหลังฉีด

10.2 ***in situ* apoptosis detection** คือ การทดสอบความสามารถของ gamma delta T lymphocytes ในการทำให้เซลล์มะเร็งตาย โดยตรวจดูพยาธิสภาพของเซลล์มะเร็งหลังการยอมสัจจำเพาะด้วยวิธี *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag® Plus Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit; CHEMICON International, USA) ผ่านกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

11. การเตรียมโปรตีน E6 และ L1 ของไวรัสแบปิโลมาในหลอดทดลอง

11.1 **การเตรียม E6 และ L1 expression plasmid** พลาสมิด pGEX-4T-2-L1 มียีนสร้างโปรตีน HPV type 16 L1/GST fusion และ pGEX-3X-E6MT มียีนสร้างโปรตีน HPV type 16 E6/GST fusion ได้รับความอนุเคราะห์จาก Assistant Professor Dr Peter C Angeletti (Nebraska Center for Virology, School of Biological Sciences, University of Nebraska Lincoln, NE 68588, USA) ทำการโคลนพลาสมิดทั้งสองชนิดเข้า *Escherichia coli* DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดให้เพียงพอ

11.2 **การตรวจสอบยีน E6 และ L1 ใน plasmid** ทำการตรวจสอบยืนยันว่า E6 และ L1 พลาสมิดที่อยู่ใน *Escherichia coli* DH5 α จริง ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers จำเพาะต่อ HPV-16 E6 และ L1 ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 primers ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิด E6 และ L1

Primers	Sequence (5'-3')	Target	PCR product (bp)
L1C1	CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT	L1	250
L1C2	TACCCTAAATACTCTGTATTG		
Pr1	TCAAAGCCACTGTGTCCTGA	HPV-16 E6	119
Pr2	CGTGTTCTTGATGATCTGCAA		

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA 5 ไมโครลิตร ใน 1X PCR buffer (100 mM KCl, 20mM Tris pH 8.0), 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 20 pmole of each Pr1/Pr2 primer, 1 unit of Taq polymerase (Fermentas, EU) ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ที่สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที อีก 35 รอบ และสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที สังเกตผลผลิตที่ได้โดย 1.5% agarose gel ใน 0.5X Tris borate EDTA (TBE) buffer

11.3 การทำ transformation นำพลาสมิดที่เตรียมไว้ transform เข้าสู่ *Escherichia coli* BL-21 (DE3) ซึ่งเป็น expression vector สามารถถูกกระตุ้นด้วย Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Z-competent *Escherichia coli* transformation kit & buffer set (Zymobroth™) เมื่อได้แบคทีเรียที่คัดเลือกแล้ว ต้องตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดด้วยวิธี PCR ที่กล่าวใน 11.2 อีกครั้ง

11.4 สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน เพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการมากที่สุด จึงทำการตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณสารกระตุ้น คือ IPTG ที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 1 mM และระยะเวลาการกระตุ้น ตั้งแต่ 4, 6 และ 8 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ผ่านการกระตุ้นนำไปล้างด้วย PBS และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดต่อไป

11.5 การสกัดโปรตีน นำแบคทีเรียที่ผ่านการกระตุ้นมาละลาย ทำให้เซลล์แตกโดยเติม PBS ที่มีส่วนผสมของ 2 mM DTT, 1% Triton X-100, lysozyme (1KU/ml), complete proteases inhibitor cocktail (1 tablet/10ml) (Roche Co., USA) และเพื่อให้เซลล์แตกสมบูรณ์ นำไปผ่านเครื่องสั่นคลื่นเสียงสูง (High intensity ultrasonic processor VC505, SONICS) หลังจากนั้นนำไป

ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 17,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บตัวอย่างสารละลายและตะกอนเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE

11.6 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

11.6.1 โปรตีน E6 ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยตัวกรอง (Affinity chromatography) GST Fusion protein column purification kit ของบริษัท GE Healthcare เนื่องจากโปรตีนจาก plasmid vector (pGEX) ถูกเชื่อมอยู่กับ glutathione S-transferase (GST) เมื่อนำมาผ่านตัวกรองที่มี glutathione จับเกาะอยู่กับเจล (sepharose) โปรตีนจะถูกจับ โปรตีนที่ไม่มีGSTจะไหลออกไปกับ buffer จากนั้นเติม elution buffer จะทำให้ GST หลุดออกมาโปรตีนที่เชื่อมอยู่กับ GST จะหลุดออกด้วยทำให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มาก

11.6.2 โปรตีน L1 เนื่องจากโปรตีน L1 อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (Inclusion body) จึงต้องทำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำก่อนโดยใช้ 3.5 M urea และกำจัด urea ออกโดยการทำ Dialysis ด้วย dialysis membrane ขนาด 7000 ดาลตัน (โปรตีน L1 มีขนาด 8000 ดาลตัน) แล้วจึงนำผ่านตัวกรอง (Affinity chromatography) GST Fusion protein column purification kit ของบริษัท GE Healthcare เพื่อแยกโปรตีนบริสุทธิ์ต่อไป

11.7 การทำ SDS-PAGE และ Western Blot เพื่อตรวจสอบยืนยันความบริสุทธิ์ของโปรตีน E6 และ L1 นำโปรตีนที่เตรียมได้มาแยกผ่าน 10% polyacrylamide gel และย้อมดูแถบโปรตีนด้วยสี Coomassie blue สังเกตขนาดของแถบโปรตีนที่ปรากฏ เพื่อให้มีความจำเพาะหลังจากแยกโปรตีนผ่าน 10% polyacrylamide gel แล้วให้ทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนมายังแผ่นเมมเบรน (nitrocellulose membrane) และทำการตรวจหาโปรตีนด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ E6 และ L1 [mouse anti-HPV-16 L1 and E6 monoclonal antibody(Santa cruz)] และ goat anti-mouse IgG labeled alkaline phosphatase (Santa cruz) ตามด้วย substrate BCIP/NBT เพื่อสังเกตการปรากฏของแถบสีจำเพาะ

12. การพัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของไวรัสแปปิโลมา

12.1 เซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์ RKO (ATCC CRL-2577) เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งยังคงมีคุณสมบัติของ wild-type p53 แต่ไม่มี endogenous human thyroid receptor nuclear receptor (h-TRbeta1) ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimal Essential Medium (MEM) ที่มี 20% fetal

bovine serum (PAA; Austria), 100 units/ml penicillin G และ 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 0.01M HEPES (N-2-hydroxyethylpiperaine-N'-2-ethan sulfonic acid) (Sigma, USA) เซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% CO₂

12.2 **Plasmid** pCI-Neo (Promega, USA) ที่มียีน HPV-16 E6 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Paul Harmonat, University of Arkansas, USA นำพลาสมิดมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน HPV-16 E6 ด้วยวิธี PCR ในข้อ 11.2

12.3 **การทำ Transfection** นำพลาสมิด pCI-Neo มาเข้าสู่เซลล์ RKO โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FUGENE HD® Transfection kit (Roche, USA) และวิธีการตามที่บริษัทแนะนำ ทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิด pCI-Neo โดยใช้ยาปฏิชีวนะ neomycin 2,000 µg/ml ผสมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่ต่อไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ neomycin 2,000 µg/ml โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน ประมาณ 1 เดือน หลังจากนั้น นำเซลล์ที่เลี้ยงได้มาตรวจสอบการมียีน HPV-16 E6 ด้วยวิธี PCR ในข้อ 11.2 เซลล์ที่มียีน HPV-16 E6 ที่ต้องการต่อไปเรียกว่า RKO-E6

12.4 **การตรวจสอบ RKO-E6 ด้วยวิธี Immunofluorescence** นำเซลล์ RKO-E6 ที่ได้มาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ โดยนำเซลล์มาตรึงบนสไลด์ด้วย cold acetone ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้อมด้วย mouse monoclonal anti-HPV16 E6/18 E6 IgG (Santa cruz) ที่ความเจือจาง 1:100 ตามด้วย goat polyclonal anti-mouse IgG PE (Abcam, UK) ความเจือจาง 1:20 ครั้งละ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบดูผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (Olympus, USA) สังเกตเซลล์ที่มีการเรืองแสงสีแดง

12.5 **RKO-E6 Stable cell line** เพื่อต้องการเซลล์ที่มีคุณสมบัติการแสดงออกของโปรตีน HPV-16 E6 ให้อยู่ตลอดไป จึงต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ RKO-E6 ที่ได้จากข้อ 12.3 ต่อไป โดยทำการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกโดยใช้ยาปฏิชีวนะ neomycin 2,000 µg/ml เป็นระยะๆ ทุก ๆ 2 เดือน ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เป็นระยะๆ จนกระทั่งเซลล์ทุกเซลล์มีการแสดงออก (ร้อยละ 100)

12.6 **การตรวจสอบ RKO-E6 ด้วยวิธี Western blot** นำเซลล์จำนวนสิบล้านเซลล์มาสกัดโปรตีนและแยกผ่าน SDS-PAGE และตรวจหา HPV-16E6 ด้วยวิธี Western blot ตามวิธีข้อ 11.7

13. การพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ

13.1 การเตรียมอนุภาคนาโนทองคำ จัดซื้อ gold colloidal solution ขนาด 10 nm จากบริษัท Sigma-Aldrich, cat.G1527 อนุภาคนาโนทองคำนี้มีปริมาณ 0.01% แฉงลอยใน 0.01% tanic acid, 0.04% trisodium citrate, 0.26 mM potassium carbonate, และ 0.02% sodium azide

13.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอนุภาคนาโนทองคำกับแอนติบอดีต่อ HPV เพื่อให้ได้ปริมาณแอนติบอดีที่เคลือบสูงที่สุดบนผิวอนุภาคนาโนทองคำ จึงต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลาย (pH 4, 5, 6, 7, 8, และ 9) กับความเข้มข้นของแอนติบอดีจำเพาะต่อ HPV-16E6 และ HPV-16L1 (Santa cruz) ซึ่งเจือจางเป็น 1:200, 1:400, 1:600, 1:800 and 1:1000 เมื่อทำปฏิกิริยาแล้วนาน 5 นาที จึงนำไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 580 nm

13.3 การเตรียมอนุภาคนาโนทองคำเคลือบแอนติบอดีต่อ HPV โดยย่อคือ นำสารแฉงลอยอนุภาคนาโนทองคำปรับสภาวะกรด-ด่างด้วย 0.2 M K_2CO_3 ให้ได้ pH 8.0 ใส่แอนติบอดีปริมาณ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากนั้นเติม จึงทำการล้างอนุภาคนาโนทองคำด้วยสารละลาย 20 mmol/L sodium borate, pH 8 ที่มี 1% BSA และ 0.1% sodium azide ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 25000 รอบต่อนาที และใส่สารละลาย 20 mmol/L sodium borate, pH 8 ที่มี 1% BSA และ 0.1% sodium azide เก็บ 4°C

13.4 การตรวจหาแอนติเจน HPV-16 E6 และ HPV-16L1 ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ นำโปรตีนบริสุทธิ์ HPV-16 E6 และ HPV-16L1 ที่เตรียมจากข้อ 11.6 มาทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อ HPV ข้อ 13.3 โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจปฏิกิริยาด้วยเครื่อง spectrophotometer (SmartTM Spec, BIO-RAD) ที่ความยาวคลื่น 520, 580 และ 620 nm หลังจากทำปฏิกิริยานาน 0, 30 และ 60 นาที โดยหลอดควบคุมบวกใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ซึ่งมีสารพันธุกรรมของ HPV-16 อยู่ประมาณ 600 copies และหลอดควบคุมลบ ใช้อนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบด้วย normal antibody

13.5 ความจำเพาะและความไวของวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ เพื่อหาความไวของการตรวจจึงทำการเจือจางปริมาณแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 0.625, 2.5, 10, and 40 $\mu\text{g/ml}$ และทำการทดสอบ ส่วนการหาความจำเพาะใช้ตัวอย่าง cell lysate ของแบคทีเรียซึ่งพบได้บ่อยในช่องคลอด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridians*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างดังกล่าวจาก อาจารย์ ดร.ชนิษฐา นัตรสุวรรณ หน่วยแบคทีเรียวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ใช้ตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีและไม่มีสารพันธุกรรมชนิดต่าง ๆ ของ HPV ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 Standard cell lines used in control experiment

Cell lines	Type of cell line	HPV DNA
CaSki	Human cervical carcinoma	~ 600 copies HPV-16 DNA
SiHa	Human cervical carcinoma	1-2 copies HPV-16 DNA
Hela	Human cervical carcinoma	HPV-18 DNA
ME-180	Human cervical carcinoma	HPV-39 DNA, HPV-18 DNA
MS751	Human cervical carcinoma	HPV-18 DNA, HPV-45 DNA
C-33A	Human cervical carcinoma	Negative for HPV DNA
HEp-2	Human laryngeal carcinoma	Negative for HPV DNA

ผลการวิจัย

ส่วนที่ 1

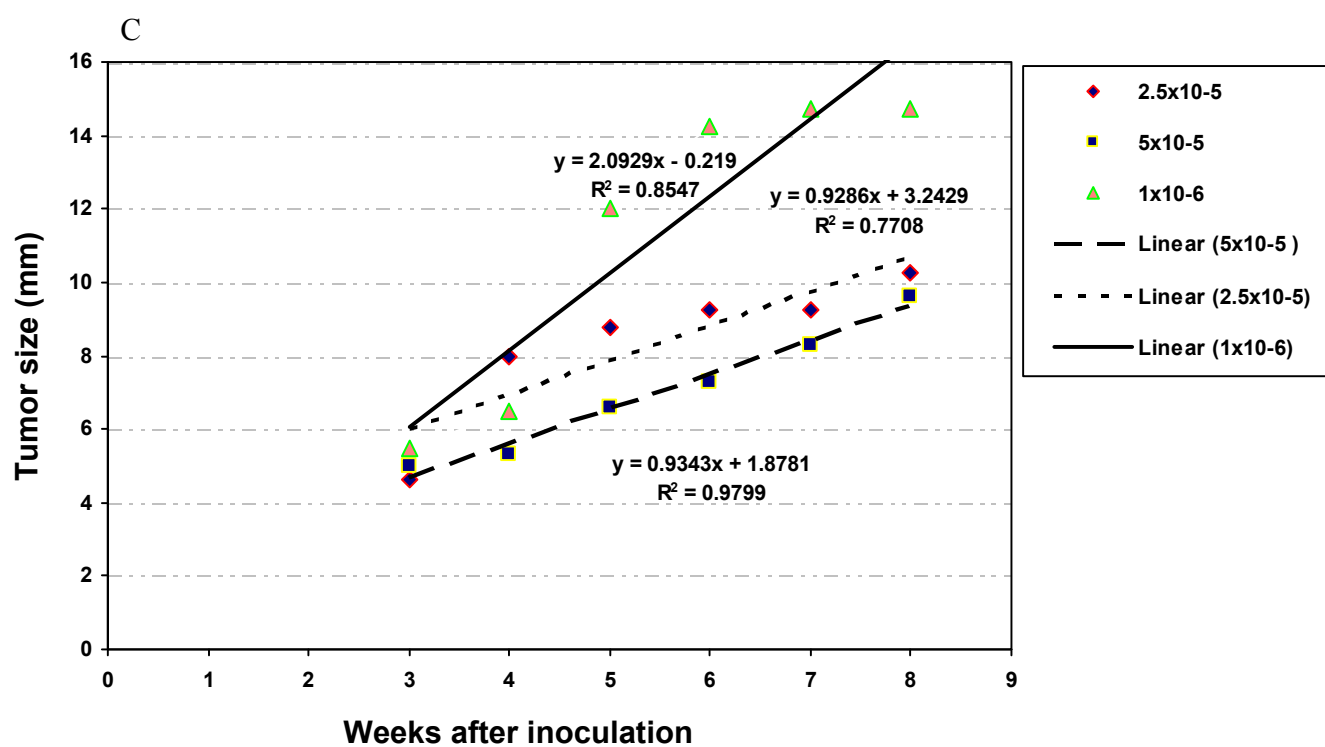
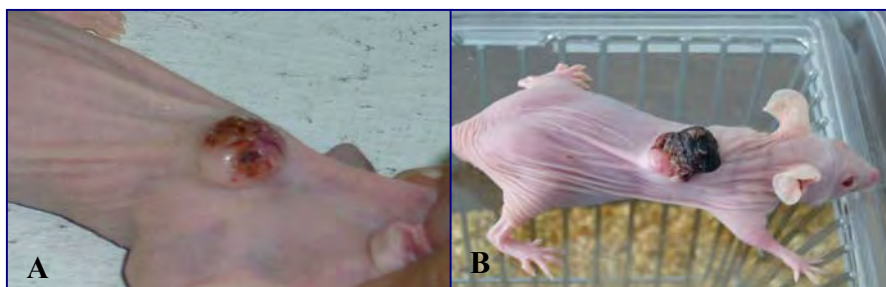
การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองโดยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกของคนในสัตว์ทดลอง

1. การทดสอบหาปริมาณของเซลล์มะเร็งที่เหมาะสมในการปลูกถ่ายในหนูทดลอง

ในเบื้องต้น ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกติดเชื้อ HPV-18 และทดลองปลูกถ่ายในหนูทดลอง ชุดแรกจำนวน 20 ตัว โดยใช้ปริมาณของเซลล์ ที่แตกต่างกัน คือ 2.5×10^5 , 5×10^5 , และ 1×10^6 ทั้งนี้เพื่อหาปริมาณของเซลล์ที่น้อยที่สุดที่สามารถทำให้เกิดก้อนมะเร็งได้ในหนูทดลอง พบว่าปริมาณเซลล์ 2.5×10^5 เพียงพอที่จะทำให้เกิดก้อนเนื้อ การเพิ่มขยายของก้อนเนื้อสังเกตเห็นได้ตั้งแต่วันที่ 14 หลังจากนั้นได้ทำการทดลองในหนูเพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ปลูกถ่ายและระยะเวลาการพัฒนาก้อนเนื้อ รวมถึงขนาดก้อนเนื้อ พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ผลแสดงดังตารางที่ 5 และรูปที่ 2

ตารางที่ 5 ผลการปลูกถ่ายเซลล์ HeLa ในปริมาณต่างๆ ในหนูทดลอง

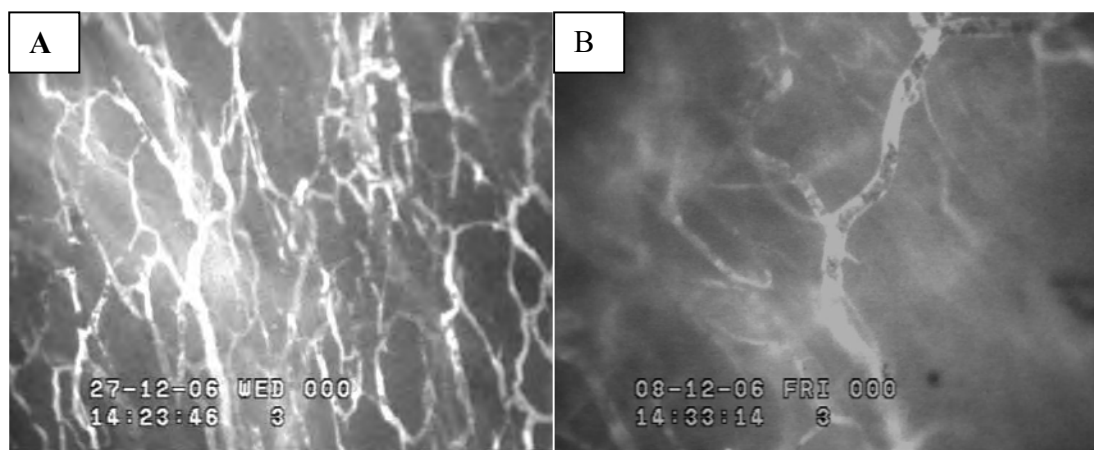
No. HeLa cells No of mice with tumor (%)		Week (s) after implantation								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
2.5×10^5 4/5 (80)	Size (mm)	0	0	0	4.6 ± 1.70	8.0 ± 2.30	8.75 ± 1.5	9.25 ± 1.5	9.25 ± 1.5	10.25 ± 2.87
	Body weight (g)	23.24 ± 1.61	24.06 ± 0.64	24.26 ± 0.42	25.32 ± 1.23	26.16 ± 1.31	25.84 ± 1.24	25.82 ± 1.02	25.72 ± 1.07	26.36 ± 1.01
5×10^5 2/3 (66)	Size (mm)	0	0	4.00 ± 0.00	5.00 ± 1.00	5.3 ± 0.57	6.6 ± 0.57	7.3 ± 1.15	8.3 ± 1.52	9.6 ± 0.57
	Body weight (g)	18.6 ± 0.66	20.66 ± 1.15	21.60 ± 1.15	21.76 ± 1.07	21.83 ± 1.15	21.60 ± 0.26	22.03 ± 0.65	23.00 ± 0.72	23.73 ± 0.70
1×10^6 4/4 (100)	Size (mm)	0	0	3.0 ± 0.81	5.5 ± 1.00	6.5 ± 3.10	12.0 ± 6.53	14.25 ± 7.13	14.75 ± 7.36	14.75 ± 7.36
	Body weight (g)	17.3 ± 1.04	19.67 ± 0.88	20.60 ± 0.98	21.00 ± 1.37	21.85 ± 1.36	22.32 ± 1.14	22.37 ± 1.14	23.03 ± 1.31	24.02 ± 1.49



รูปที่ 2 (A,B) ลักษณะของหนูที่เกิดตุ่มบนผิวหนัง papillomatosis บริเวณที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง (C) กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ HeLa ที่ปลูกถ่าย ขนาดของก้อนเนื้อและระยะเวลา

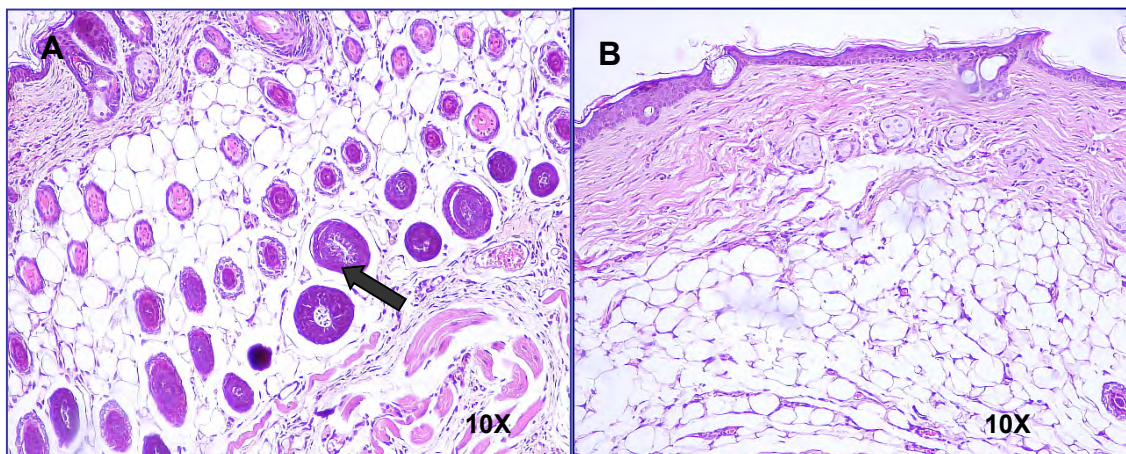
2. การตรวจดูการเพิ่มขึ้นของหลอดเลือด

การเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดจะทำการตรวจโดยการย้อมสีเส้นเลือดด้วยสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate (FITC) เมื่อครบ 14 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์ (Tumor angiogenesis) โดยวิธี Intravital Fluorescein Videomicroscopy พบว่า บริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์ HeLa เข้าไปของหนูจะพบมีการสร้างของเส้นเลือดเพิ่มมากขึ้นอย่างสังเกตเห็นได้ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM (รูปที่3) และนอกจากนี้ผลจากการศึกษาทางพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อที่ตัดจากบริเวณของรอยโรคในกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งยังพบลักษณะของเส้นเลือดที่มากกว่าในกลุ่มควบคุมด้วย (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 ภาพถ่ายเส้นเลือดแสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดบริเวณเนื้อเยื่อที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง

- A. หนูกลุ่มที่ได้รับ เซลล์ HeLa ที่ปริมาณ 10^6 เซลล์ (สองสัปดาห์)
- B. หนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ MEM medium (สองสัปดาห์)

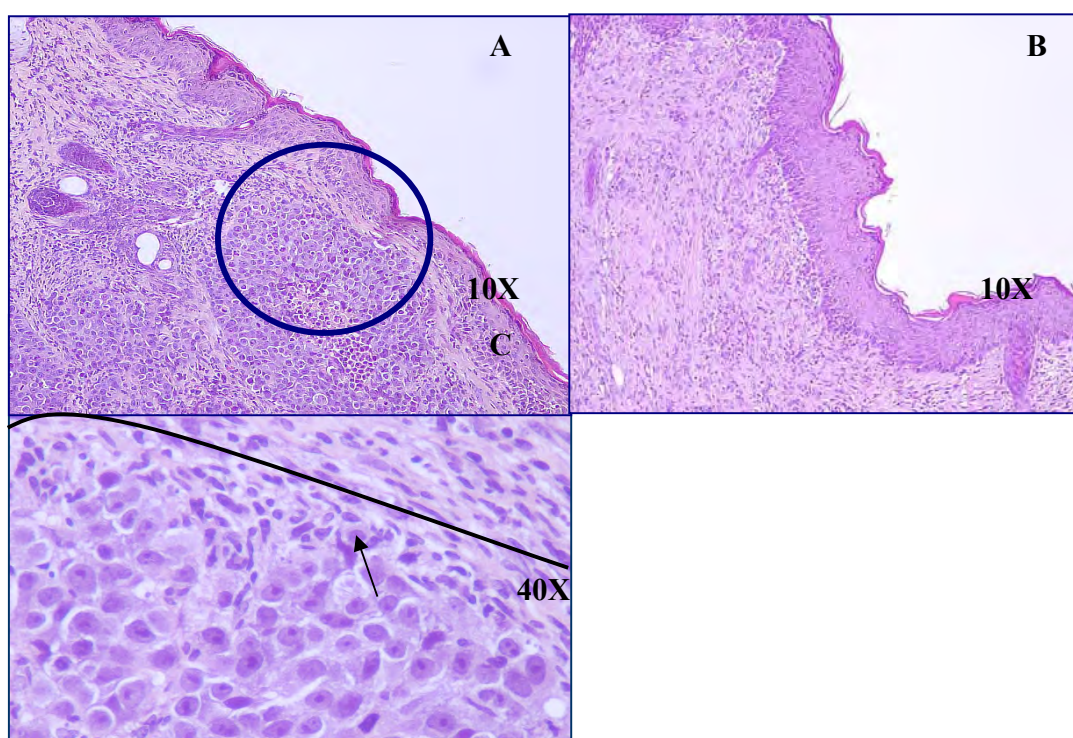


รูปที่ 4 ลักษณะทางเซลล์วิทยาที่พบการเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดในชั้นเนื้อของหนูที่ทำการศึกษา

- A. ชั้นเนื้อบริเวณรอบๆ รอยโรคของหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วย HeLa cell (10^6) พบลักษณะของเส้นเลือดที่เพิ่มขึ้น (ลูกศรชี้)
- B. ชั้นเนื้อบริเวณรอบๆ รอยโรคของหนูกลุ่มควบคุม

3. ลักษณะเซลล์ทางพยาธิวิทยา

ภายหลังจากทำการปลูกถ่ายเซลล์ HeLa ลงไปแล้วประมาณ สองสัปดาห์ จะทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งเพื่อทำการส่งตรวจทางพยาธิวิทยา ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ได้จากหนูในกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งจะพบลักษณะของเซลล์ที่มีความผิดปกติ (dysplasia) และสามารถเห็นลักษณะจำเพาะของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV ที่เรียกว่า koilocyte ได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของเซลล์ในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่พบมีความผิดปกติใดๆ (รูปที่ 5)



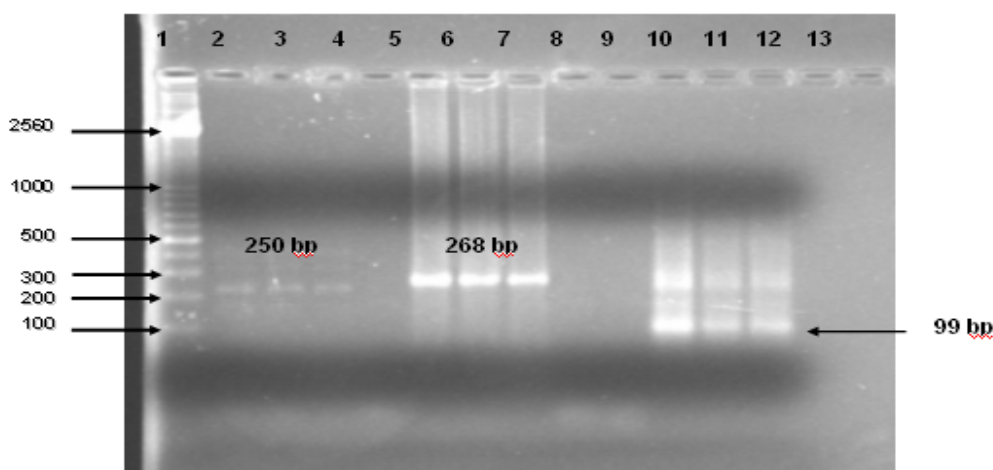
รูปที่ 5 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในหนูทดลอง

- A. เซลล์หนูที่ได้รับการปลูกถ่าย HeLa cell ที่ปริมาณ 10^6 แสดงให้เห็นลักษณะของเซลล์ที่ผิดปกติ (ในวงกลม)
- B. เซลล์หนูกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย MEM medium ไม่พบเห็นลักษณะเซลล์ที่ผิดปกติ
- C. ลักษณะของ koilocytes ที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV (ลูกศรชี้)

4. การตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสเปปโลมาในก้อนเนื้อ

เพื่อยืนยันว่าบริเวณที่มีพยาธิสภาพก้อนเนื้อนั้นเกิดจากเซลล์ HeLa ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบยืนยัน โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของ HPV ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีน L1 สำหรับ HPV และใช้ human β -globin gene เป็นตัวบ่งชี้ว่าเป็น human DNA และ mouse GAPDH เป็นตัวบ่งชี้ว่าเป็น mouse DNA และทำการยืนยันผลการตรวจสารพันธุกรรมของ HPV โดยการจำแนกชนิดของ HPV โดยใช้ชุดทดสอบ HPV genotyping (INNO-LiPA HPV) และ การทำ *in situ* hybridization ด้วย probes ที่จำเพาะต่อ HPV type 16 และ 18 อีกครั้งหนึ่ง โดยมีตัวควบคุมคือ HeLa DNA และ เนื้อเยื่อของหนูที่ฉีดด้วย MEM เป็น normal mouse DNA

ผลการทดสอบพบว่าหนูทั้งสองตัว (X4 และ X5) ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วยเซลล์ HeLa มีสารพันธุกรรมของ HPV (รูปที่ 6 A, Lane 3,4) และตรวจพบ human β -globin gene (รูปที่ 6A, Lane 7,8) เหมือนกับเซลล์ HeLa (รูปที่ 6A, Lane 2, 5) นอกจากนี้ยังตรวจพบ mouse GAPDH ด้วย (รูปที่ 6A, Lane 11, 12)



รูปที่ 6 A. ผลการทดสอบสารพันธุกรรมของ HPV จากบริเวณรอยโรคที่ได้จากเนื้อเยื่อหนูที่ได้รับการ ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง

Lane 1. DNA marker (bp)

Lane 2. HeLa DNA (L1 primers)

Lane 3. X4 DNA (L1 primers)

Lane 4. X5 DNA (L1 primers)

Lane 5. Normal mouse DNA (L1 primers)

Lane 6. HeLa DNA (β -globin primers)

Lane 7. X4 DNA (β -globin primers)

Lane 8. X5 DNA (β -globin primers)

Lane 9. Normal mouse DNA (β -globin primers)

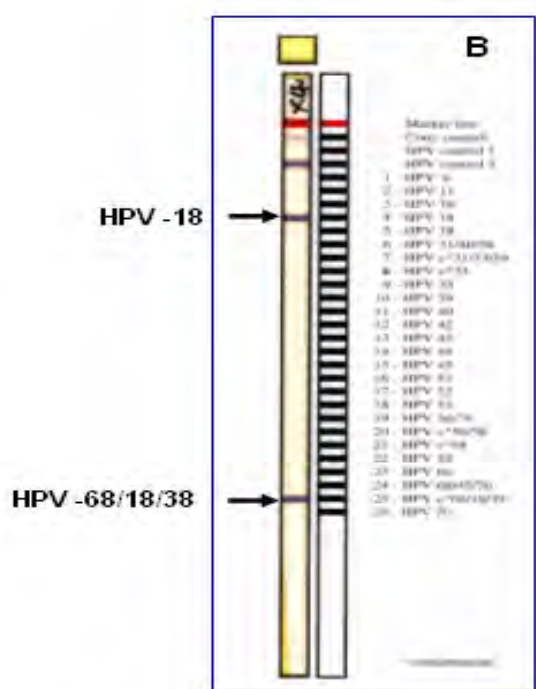
Lane 10. HeLa DNA (GAPDH- primers)

Lane 11. X4 DNA (GAPDH- primers)

Lane 12. X5 DNA (GAPDH- primers)

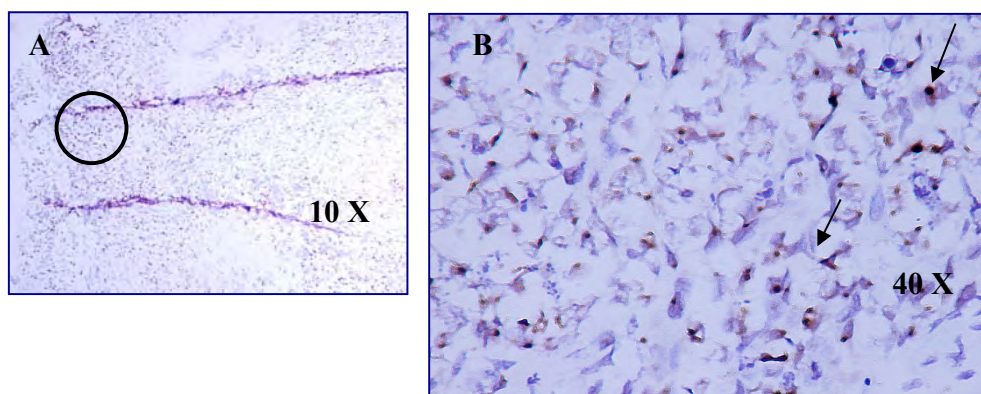
Lane 13. Normal mouse DNA (GAPDH- primers)

เมื่อตรวจจำแนกไทป์พบเป็น HPV type 18 ซึ่งสอดคล้องกับไทป์ของ HPV ที่สอดแทรกอยู่ในโครโมโซมของเซลล์ HeLa (รูปที่ 6 B) และการตรวจด้วยวิธี *in situ* hybridization ก็ให้ผลบวกต่อ HPV type 18 เช่นกัน (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 B.

ผลการจำแนกชนิดของ HPV จากบริเวณรอยโรคที่ได้จากเนื้อเยื่อจากหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง โดยชุดทดสอบ HPV-genotyping V2 (INNO-LiPA HPV; Innogenetics)



รูปที่ 7 ผลการตรวจสอบยืนยันสารพันธุกรรมของ HPV โดยวิธี *in situ* hybridization

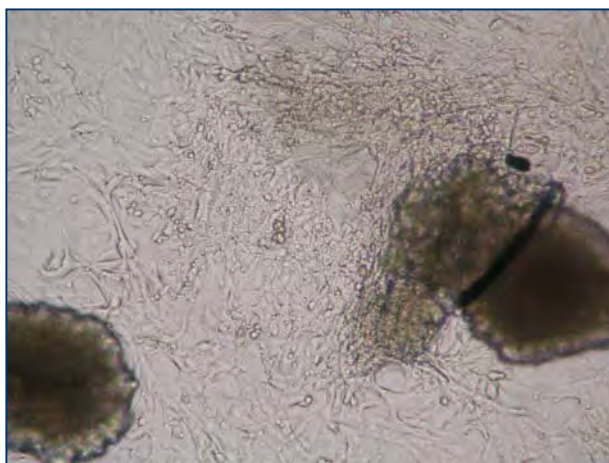
- บริเวณที่ตรวจพบเซลล์ที่มีสารพันธุกรรม HPV-18 กำลังขยาย 10X
- ภาพขยายแสดงเซลล์ที่ให้ผลบวกจะติดสีน้ำตาลภายในนิวเคลียส (ลูกศร) กำลังขยาย 40X

5. การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งจากผู้ป่วย

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้เซลล์มะเร็งที่แยกได้จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกทำการปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง จึงได้ทดลองนำเซลล์จากผู้ป่วยมาทำการเพาะเลี้ยงและปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง

การศึกษาเบื้องต้นทำการเก็บตัวอย่างเซลล์มะเร็งจากผู้ป่วยได้สองตัวอย่างและทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลองตามวิธีการที่กล่าวแล้วข้างต้น ผลการศึกษาคือสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ให้รอดชีวิตได้เพียง 1 ตัวอย่าง (รูปที่ 8) เมื่อทำการทดสอบเซลล์ดังกล่าวว่ามีสารพันธุกรรม HPV หรือไม่โดยวิธี PCR พบว่าให้ผลบวก เมื่อทำการจำแนกไทป์ ปรากฏว่าไม่สามารถจำแนกชนิดของไวรัสได้ ทั้งนี้อาจจะเป็น HPV ชนิดอื่นๆ ที่ชุดทดสอบไม่สามารถตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามได้ทำการทดลองปลูกถ่ายเซลล์ที่ได้ลงในสัตว์ทดลอง แต่ไม่สามารถทำให้สัตว์ทดลองเกิดพยาธิสภาพของมะเร็งได้ ได้นำเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์ลงไปในหนูมาทำการตรวจสอบซ้ำว่ายังมีเซลล์มะเร็งที่มีไวรัสเปปโตมาอยู่หรือไม่ด้วยวิธี PCR ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรม HPV ในเนื้อเยื่อดังกล่าว

ได้พยายามที่จะเพาะแยกเซลล์มะเร็งปากมดลูกจากเนื้อเยื่อผู้ป่วยโดยตรงต่อไปอีก แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จ จึงได้ตัดสินใจล้มเลิกการใช้เซลล์มะเร็งโดยตรงจากผู้ป่วย และใช้เซลล์ HeLa แทนในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 8 เซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงได้จากเซลล์ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

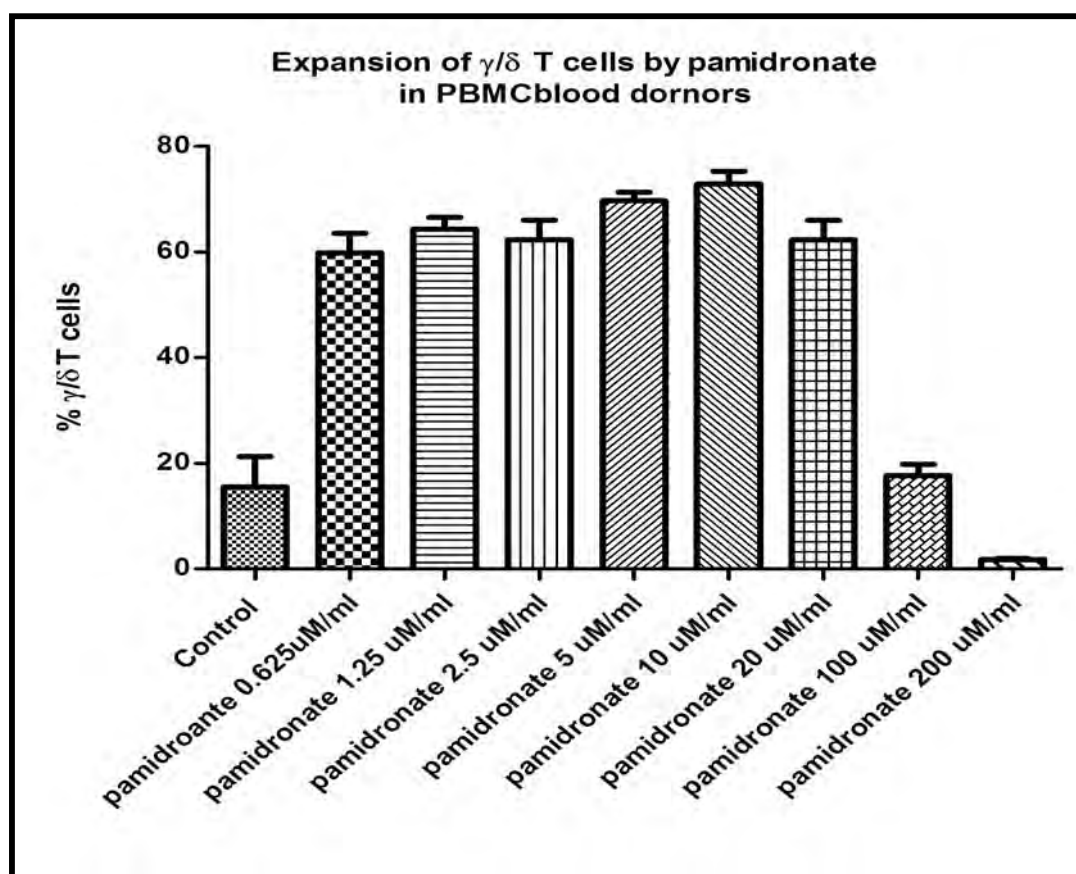
ส่วนที่ 2

การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (Tcells) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

1. การเตรียมเซลล์แกมมาเดลตาทีเซลล์ (gamma/delta T cell)

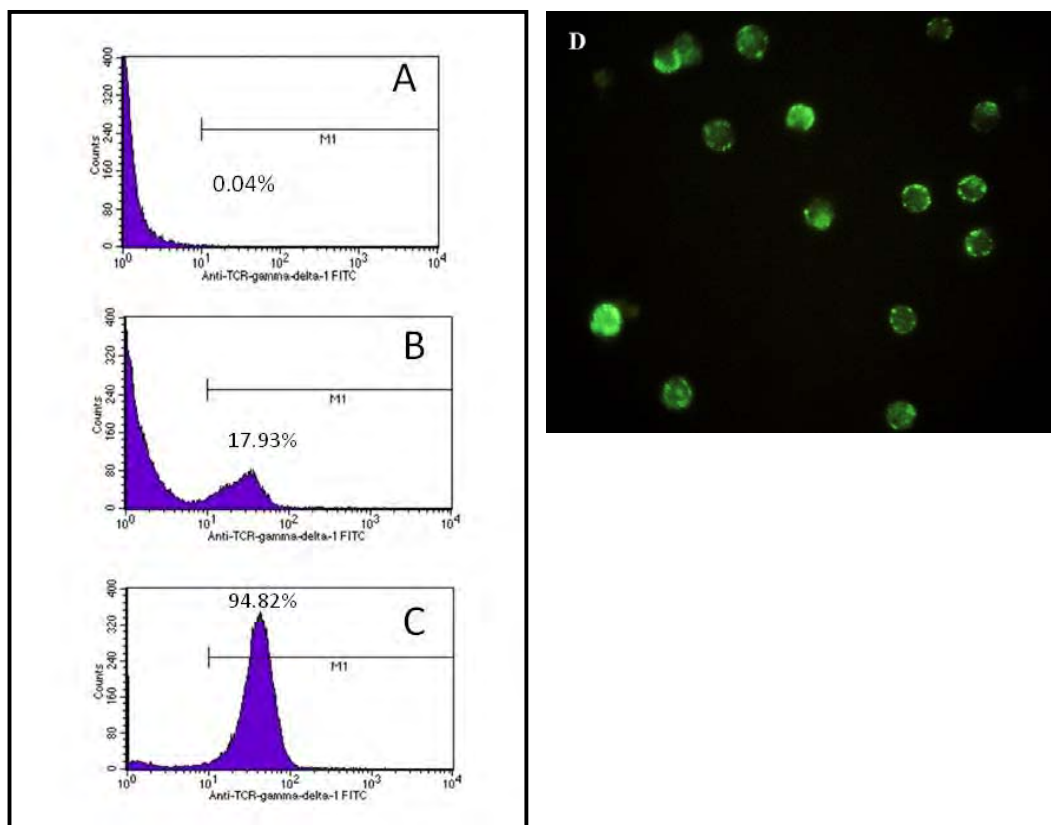
1.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ pamidronate ในการกระตุ้นแกมมาเดลตาทีเซลล์

ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ pamidronate โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.625-200 $\mu\text{M/ml}$ กระตุ้น PBMC ผลการทดสอบพบว่า ความเข้มข้นที่กระตุ้นให้มีแกมมาเดลตาทีเซลล์สูงที่สุดคือ 10 $\mu\text{M/ml}$ โดยสามารถกระตุ้นให้มีเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 77 เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย pamidronate (รูปที่ 9)

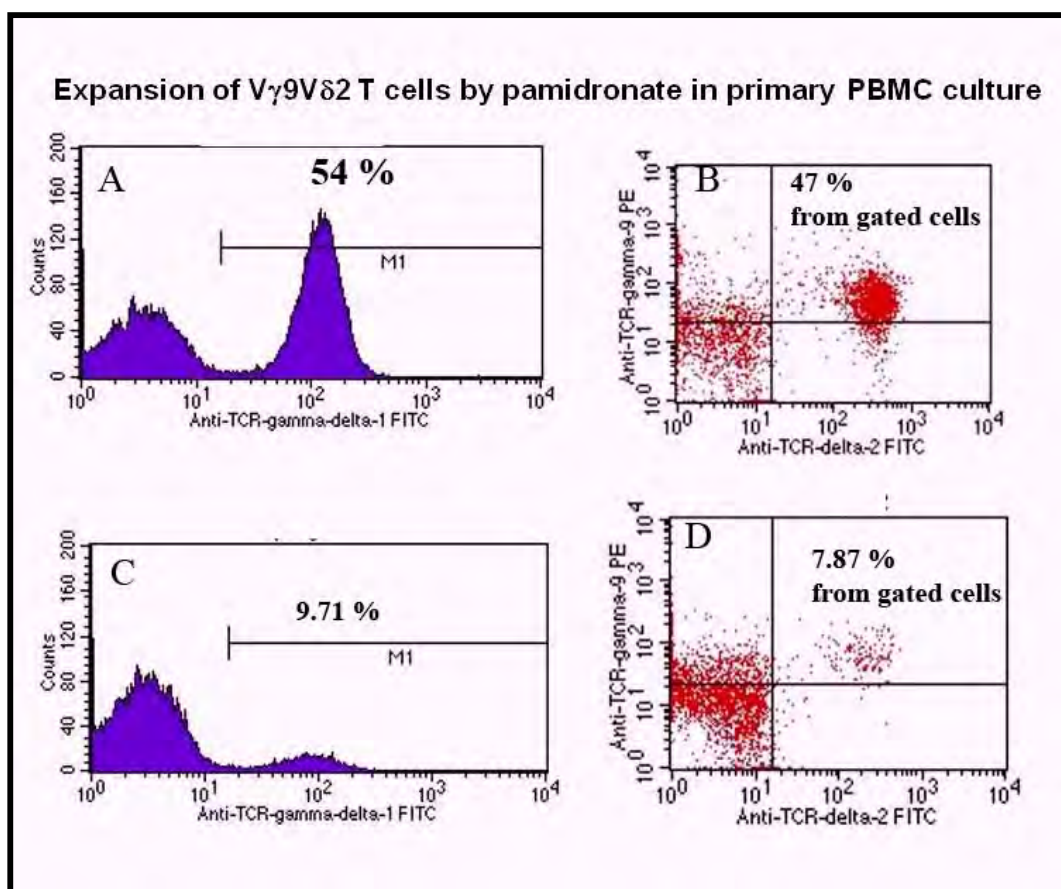


รูปที่ 9 ปริมาณร้อยละของแกมมาเดลตาทีเซลล์หลังจากการกระตุ้น PBMC ด้วย pamidronate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

1.2 ปริมาณแกมมาเดลตาทีเซลล์บริสุทธิ์ หลังจากกระตุ้นเซลล์ PBMC ใวนาน 14 วัน จึงนำมาทำการแยกแกมมาเดลตาทีเซลล์ ซึ่งผลของการทำให้บริสุทธิ์พบว่ามากถึงร้อยละ 90 (รูปที่ 10) และประชากรส่วนใหญ่ (ร้อยละ 87) ของแกมมาเดลตาทีเซลล์ที่แยกได้เป็น $\nu\gamma 9\nu\delta 2$ T cells (รูปที่ 11)



รูปที่ 10 การทำให้แกมมาเดลตาทีเซลล์บริสุทธิ์ A) non-stained pamidronate treated PBMC B) PBMC stained with FITC anti gamma delta-TCR antibody C) purified gamma delta stained with FITC anti gamma delta-TCR antibody determined by Flowcytometry D) purified gamma delta stained with FITC anti gamma delta-TCR antibody determined by Fluorescence microscope



รูปที่ 11 ผลการตรวจแอมมาเซลล์ที่เซลล์ที่ทำให้บริสุทธิ์และเชื่อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะชนิดต่าง ๆ ด้วย Flow cytometry

- A) Stimulated PBMC เชื่อมด้วย FITC pan anti g/d TCR antibody.
- B) แอมมาเซลล์ที่เซลล์จาก Stimulated PBMC เชื่อมด้วย PE anti V γ 9 antibody and FITC anti V δ 2 antibody
- C) Control PBMC เชื่อมด้วย FITC pan anti g/d TCR antibody.
- D) แอมมาเซลล์ที่เซลล์จาก Control PBMC เชื่อมด้วย PE anti V γ 9 antibody and FITC anti V δ 2 antibody

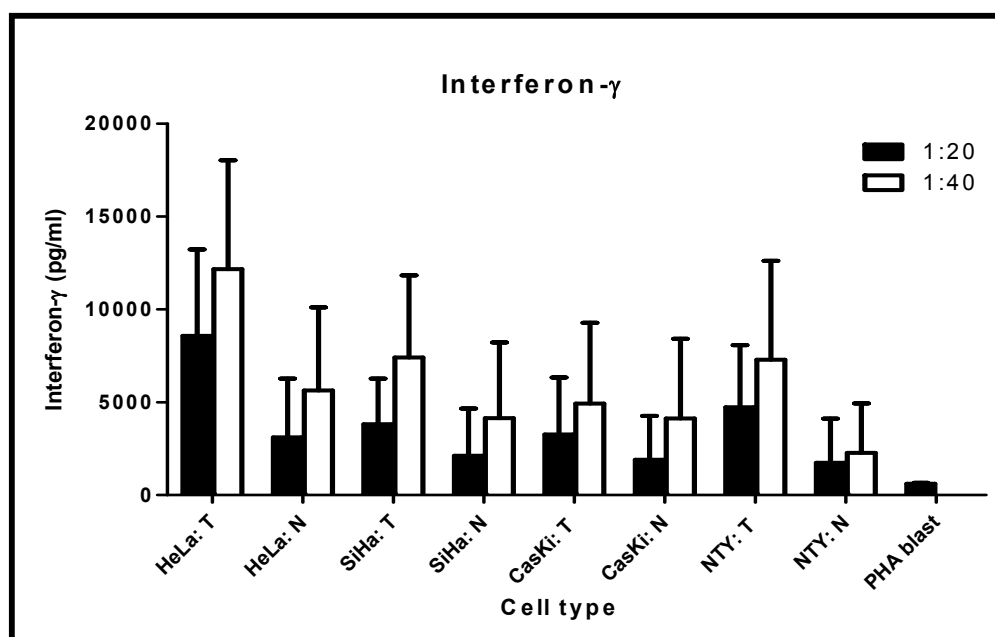
2. ความสามารถของแกมมาเคลตาทีเซลล์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูก นำแกมมาเคลตาทีเซลล์บริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสแปปีโลมา สามชนิด คือ HeLa; HPV-18, SiHa; HPV-16 และ CaSki; HPV16 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 10 uM/ml of pamidronate นาน 5 วันก่อนนำมาใช้ และไม่ได้รับการกระตุ้น ในอัตราส่วน 20:1 และ 40:1 ผลของแกมมาเคลตาทีเซลล์ของผู้บริจาคโลหิตจำนวน 5 คนให้ผลดังตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า แกมมาเคลตาทีเซลล์สามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสามชนิดได้ แต่ประสิทธิภาพในการทำลายแตกต่างกัน แกมมาเคลตาทีเซลล์สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ผ่านการกระตุ้นด้วย 10 uM/ml of pamidronate ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เซลล์ที่ถูกทำลายได้ดีที่สุดคือ HeLa ตามด้วย SiHa และ CaSki อัตราส่วนแกมมาเคลตาทีเซลล์ต่อเซลล์มะเร็ง 40:1 มีประสิทธิภาพในการทำลายสูงกว่า 20:1 และมีความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นและไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยแกมมาเคลตาทีเซลล์

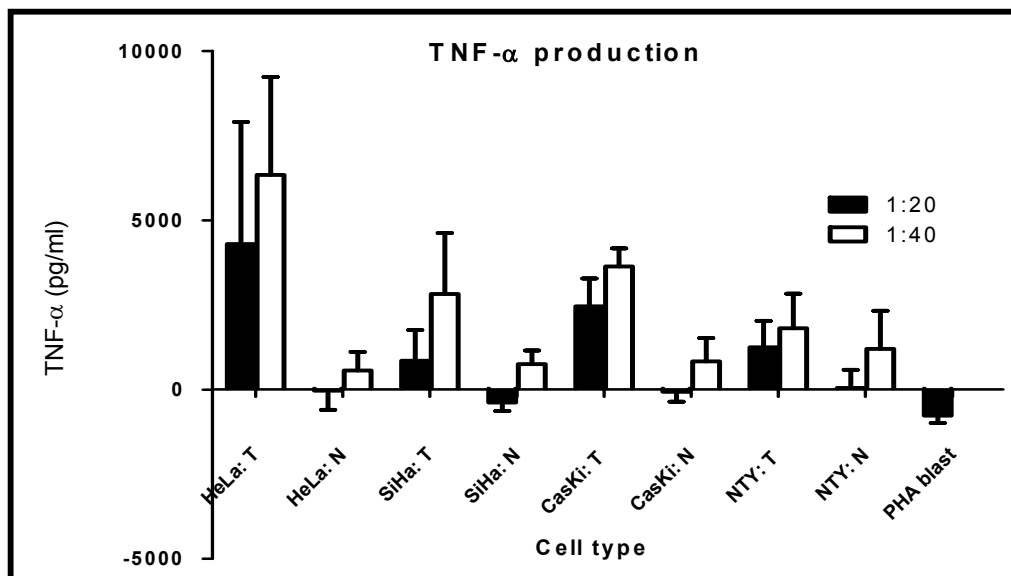
% Cytotoxicity (Mean \pm SD)				
Cells	E:T = 20:1	<i>P</i> value	E:T = 40:1	<i>P</i> value
HeLa: Treated	40.70 \pm 10.80	0.0041	51.52 \pm 16.56	NS
HeLa: Non-treat	20.38 \pm 11.31		34.85 \pm 13.52	
SiHa: Treated	31.31 \pm 15.49	NS	49.31 \pm 16.80	0.0038
SiHa: Non-treat	20.81 \pm 10.71		31.46 \pm 11.12	
CaSki: Treated	25.61 \pm 11.16	NS	48.46 \pm 13.57	0.0461
CaSki: Non-treat	13.93 \pm 1.60		28.16 \pm 7.51	
NTY: Treated	17.12 \pm 6.00	0.0395	36.57 \pm 14.54	0.0176
NTY: Non-treat	10.33 \pm 3.80		16.59 \pm 5.44	
PHA blast	3.95 \pm 0.49		ND	ND

ข้อสังเกตคือ แกมมาเคลตาทีเซลล์นอกจากสามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกแล้ว ยังสามารถทำลายเซลล์ปกติ (NTY) ได้ด้วย แต่ไม่สามารถทำลายหรือฆ่าเซลล์ของผู้บริจาคโลหิตที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PHA (autologous cells)

3. การหลั่งไซโตไคน์จากแกมมาเดลตาทีเซลล์ เพื่อเข้าใจกลไกในการฆ่าเซลล์มะเร็งของแกมมาเดลตาทีเซลล์ จึงศึกษาความสามารถในการหลั่งไซโตไคน์ว่าเหมือนกับขบวนการฆ่าเซลล์ของ cytotoxic T cells อื่น ๆ หรือไม่ ผลการตรวจพบว่าในปฏิกิริยาทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกของแกมมาเดลตาทีเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย pamidronate และไม่ได้รับการกระตุ้น สามารถหลั่งไซโตไคน์ทั้ง interferon gamma (IFN γ) และ tumor necrotic factor alpha (TNF α) โดยการหลั่งไซโตไคน์สัมพันธ์กับความสามารถของเซลล์ในการฆ่า คือ ปริมาณหลั่งสูงสุดอยู่ที่เซลล์ HeLa (รูปที่ 12 และ 13)



รูปที่ 12 ค่าเฉลี่ยปริมาณไซโตไคน์ IFN γ (pg/ml, \pm SD) ที่หลั่งหลังจากแกมมาเดลตาทีเซลล์ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง NYT และ autologous PHA blast ในอัตราส่วน 20:1 และ 40:1 ผลการทดลองมาจากการทำ 5 ครั้ง

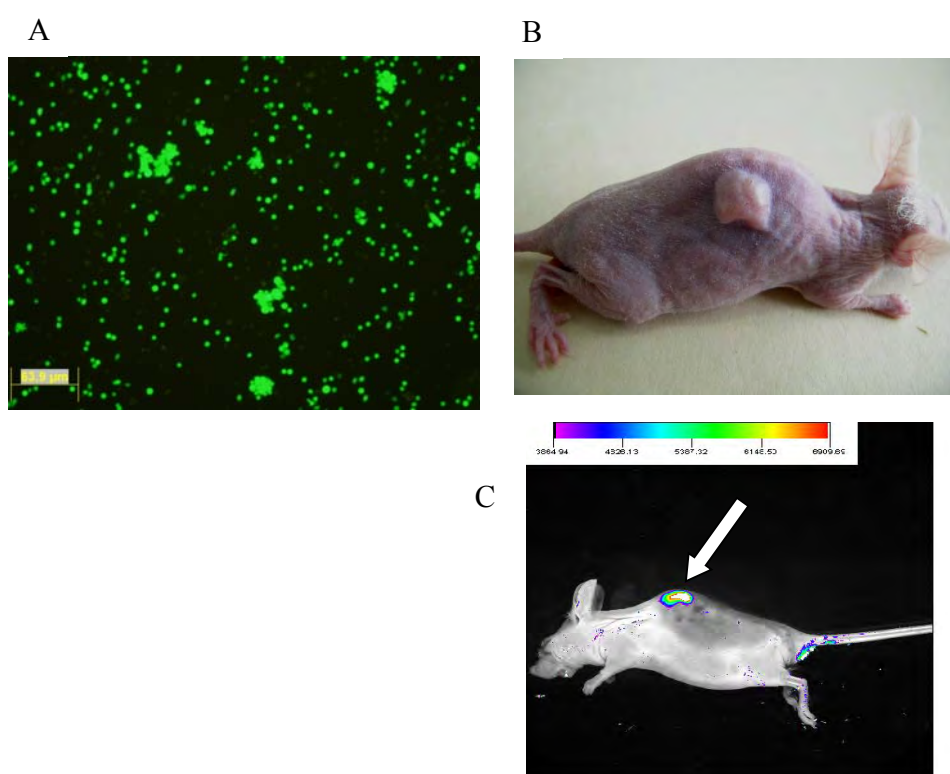


รูปที่ 13 ค่าเฉลี่ยปริมาณไซโตไคน์ TNF α (pg/ml, \pm SD) ที่หลั่งหลังจากแกมมาเดลตาที่เซลล์ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง NYT และ autologous PHA blast ในอัตราส่วน 20:1 และ 40:1 ผลการทดลองมาจากการทำ 5 ครั้ง

4. การแสดงออกของ CD107 เพื่อพิสูจน์ว่าการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกของแกมมาเดลตาที่เซลล์กระตุ้นผ่าน CD107 บนผิวแกมมาเดลตาที่เซลล์ ดังนั้นหลังทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์มะเร็งและแกมมาเดลตาที่เซลล์ ทำการย้อมเซลล์แกมมาเดลตาที่เซลล์ด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ CD107 และตรวจนับด้วย flow cytometry พบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสามชนิดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย pamidronate สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CD107 บนผิวแกมมาเดลตาที่เซลล์ โดยพบสูงที่สุดใน SiHa (13.95%) ตามด้วย HeLa (10.96%) และ CaSki (6.9%) ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกดังกล่าวในปฏิกิริยาระหว่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย pamidronate (0.91%, 1.07% และ 0.89% ตามลำดับ) ที่น่าสนใจคือ การกระตุ้นไม่ได้เกิดขึ้นทุกเซลล์ แสดงว่ากลไกในการฆ่าน่าจะมีกลไกอื่นร่วมด้วย

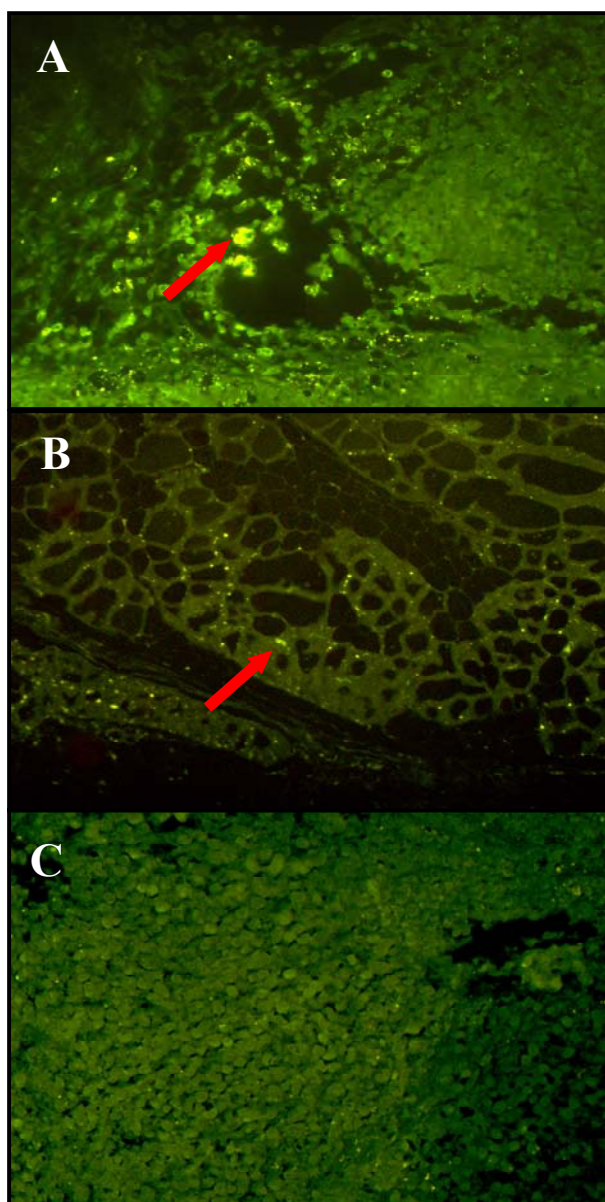
5. การทดสอบความสามารถของแกมมาเดลตาทีเซลล์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกในสัตว์ทดลอง

5.1 การฉีดแกมมาเดลตาทีเซลล์เข้าสู่สัตว์ทดลอง ทำการข้อมแกมมาเดลตาทีเซลล์ที่บริสุทธิ์ด้วย Green; 5-fluoromethylfluorecein diacetate (CMFDA) แล้วทำการฉีดเซลล์เข้าสู่ที่บริเวณก้อนเนื้อที่หลังของหนูทดลอง โดยฉีดเข้าหลายตำแหน่ง หลังจากนั้นนำไปส่องกล้องดูตำแหน่งการคงอยู่ของเซลล์ด้วยกล้อง *in vivo* imaging system (Kodak, USA) พบว่าเซลล์แกมมาเดลตาทีเซลล์กระจายอยู่ในก้อนเนื้อเซลล์มะเร็ง ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 ภาพหนูทดลองขณะกำลังมีชีวิต A) แกมมาเดลตาทีเซลล์ที่ข้อมด้วย CMTDA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ขยาย 100 เท่า) B) รูปหนูทดลองที่มีก้อนเนื้อออกเจริญฝงอยู่ C) ตำแหน่งที่แกมมาเดลตาทีเซลล์อยู่ในก้อนเนื้อ (ลูกศร)

5.2 การทำลายเซลล์มะเร็งในหนูทดลอง ทำการตรวจสอบเซลล์ในก้อนเนื้อของหนูทดลอง โดยหลังจากที่ฉีดเซลล์เข้าไปแล้ว ที่ระยะไว้อีก 3 วัน จึงทำการฆ่าหนูทดลอง นำชิ้นเนื้อบริเวณก้อนเนื้อออกมา ตรวจสอบลักษณะทางพยาธิสภาพ และย้อมตรวจการตายของเซลล์มะเร็ง ด้วย *In situ* apoptosis detection assay kit (CHEMICON) พบว่าบริเวณที่มีแกมมาเคลตาที่เซลล์อยู่เซลล์มะเร็งในก้อนเนื้อมีการตาย (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 ผลการฆ่าเซลล์มะเร็งในหนูทดลองของแกมมาเคลตาที่เซลล์ A) บริเวณที่เซลล์มะเร็งถูกทำลาย (ลูกศร) B) เซลล์ควบคุมบวก (มาพร้อมกับชุดน้ำยา) C) เซลล์ควบคุมลบ (เก็บจากหนูทดลองที่มีก้อนเนื้อออก แต่ไม่ได้ฉีดแกมมาเคลตาที่เซลล์) กำลังขยาย 200 เท่า

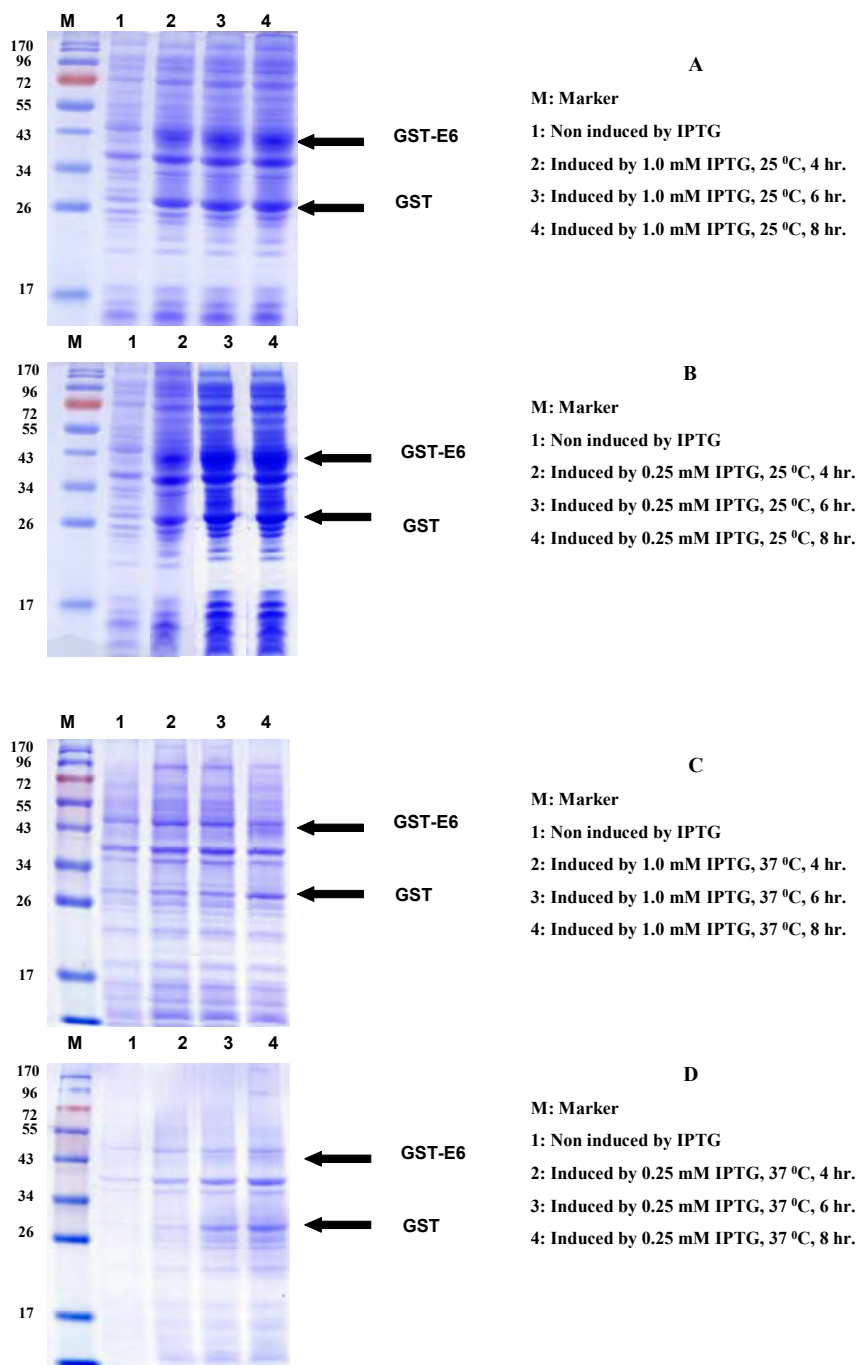
ส่วนที่ 3

การเตรียมแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

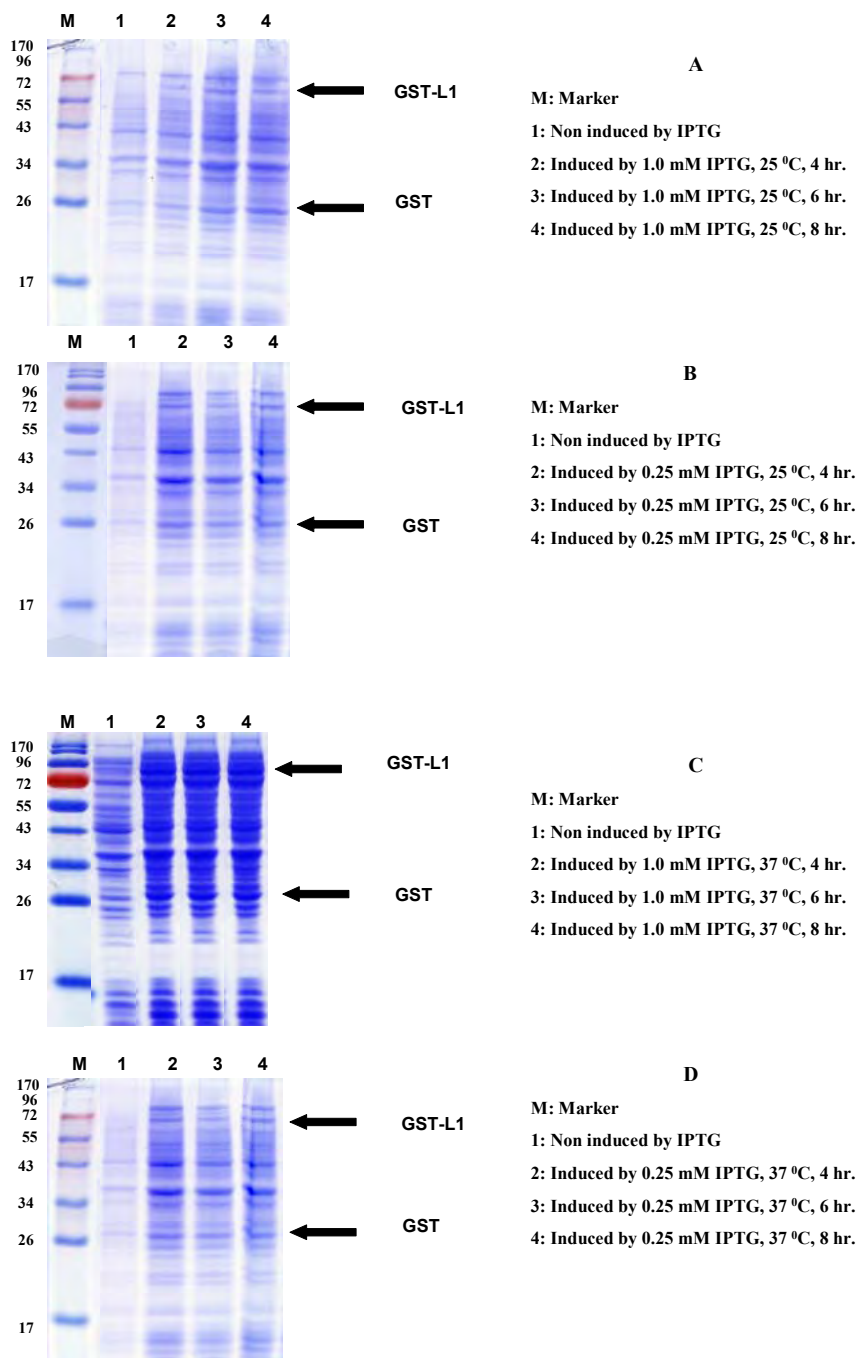
1. การเตรียมแอนติเจนจำเพาะ HPV-16 E6 และ HPV-16 L1 จากแบคทีเรีย

5.1 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิดในแบคทีเรีย ในการวิจัยนี้ ทำการเตรียมแอนติเจนจำเพาะ 2 ชนิด คือ HPV-16 E6 และ HPV-16 L1 ดังนั้นเมื่อเตรียม *E.coli* BL-21(DE3) ที่มีพลาสมิด pGEX-3X-E6MT หรือ pGEX-4T-2-L1 ได้แล้ว ทำการหาสถานะการกระตุ้นแบคทีเรียมีการแสดงออกของโปรตีน E6 และ L1 ให้ได้ปริมาณสูงที่สุด โดยการปรับความเข้มข้นของ IPTG (0.25 และ 1.0 mM) อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส และ ระยะเวลาในการกระตุ้น คือ 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ซึ่งผลพบว่าสถานะที่ดีที่สุดของการแสดงออก E6 คือ 0.25 mM IPTG ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) นาน 6 ชั่วโมง (รูปที่ 16) ส่วนสถานะที่ดีที่สุดของการแสดงออก L1 คือ 1 mM IPTG อุณหภูมิ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง (รูปที่ 17)

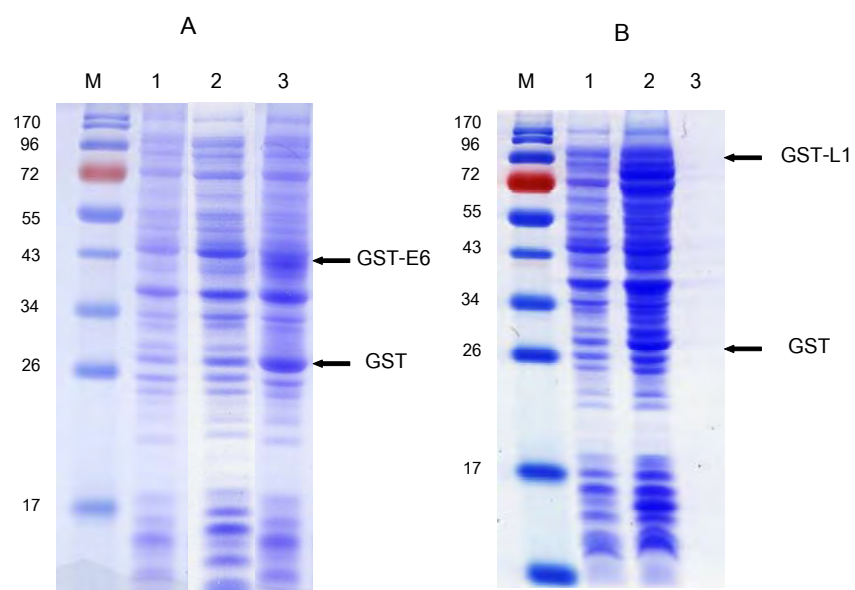
5.2 การสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ ผลจากการวิเคราะห์พบว่าโปรตีน GST-HPV16E6 สามารถหลั่งออกมาได้โดยตรง ส่วน GST-HPV16L1 พบว่าอยู่ติดกับ inclusion bodies ในเซลล์แบคทีเรีย (รูปที่ 18) จึงทำการสกัด GST-HPV16E6 ให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน GST affinity chromatography และทำการยืนยันผลการสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE and Western blot ได้โปรตีนขนาด 43 กิโลดาลตัน (kDa) และมีแถบ GST ขนาด 26 kDa (รูปที่ 19) ส่วน GST-HPV16L1 จำเป็นต้องทำการสกัดละลายโปรตีนออกมาจากตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย 8M urea solution ก่อน แล้วจึงทำให้บริสุทธิ์ภายหลัง ได้โปรตีนขนาด 80 kDa (รูปที่ 20)



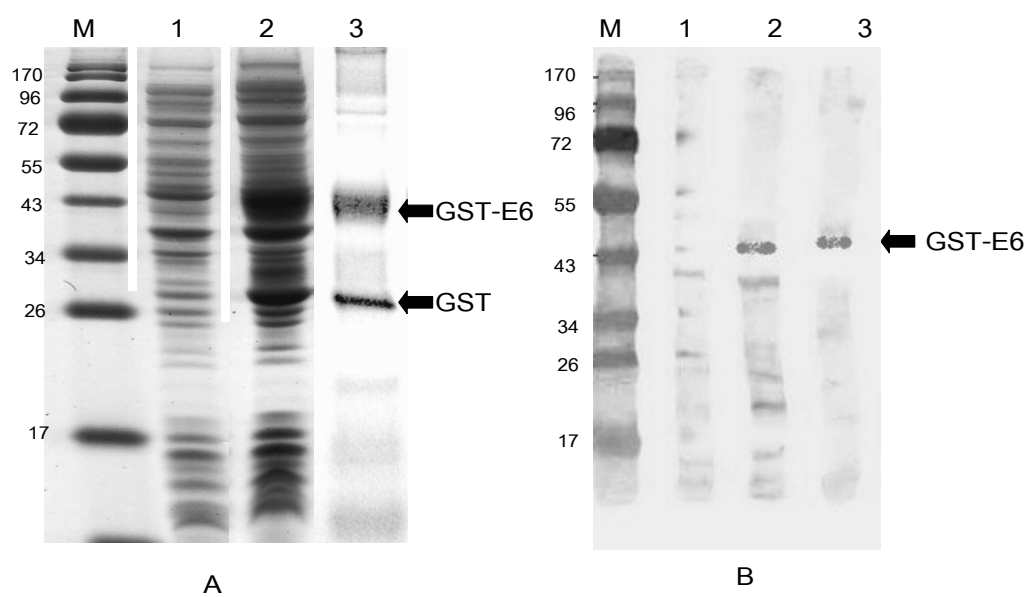
รูปที่ 16 ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue ของ GST-HPV16E6 fusion proteins ใน *E. coli* BL-21(DE3) ที่ภาวะการกระตุ้นต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG (0.25 mM และ 1 mM) อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส และ ระยะเวลาในการกระตุ้น คือ 4, 6 และ 8 ชั่วโมง



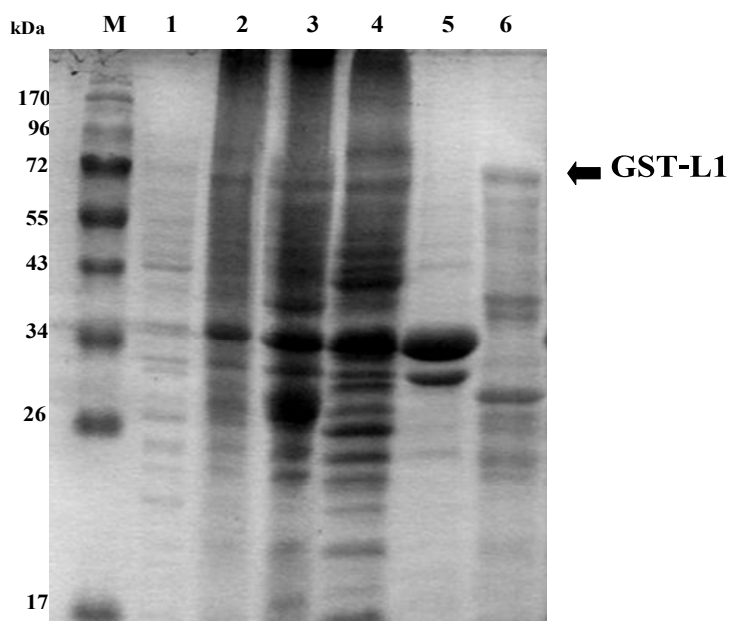
รูปที่ 17 ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue ของ GST-HPV16L1 fusion proteins ใน *E. coli* BL-21(DE3) ที่ภาวะการกระตุ้นต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG (0.25 mM และ 1 mM) อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส และ ระยะเวลาในการกระตุ้น คือ 4, 6 และ 8 ชั่วโมง



รูปที่ 18 ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue A: GST-HPV16E6, B: GST-HPV16L1 lane M; Marker, lane1; whole cell lysate from *E.coli BL-21(DE3)* containing pGEX-3X-MT-E6 or pGEX-4T-2-L1 non-induce by IPTG, lane2; pellet of cell from *E.coli BL-21(DE3)* containing pGEX-3X-MT-E6 or pGEX-4T-2-L1 after sonication, lane3; supernatant of cell lysate from *E.coli BL-21(DE3)* containing pGEX-3X-MT-E6 or pGEX-4T-2-L1 after sonication,



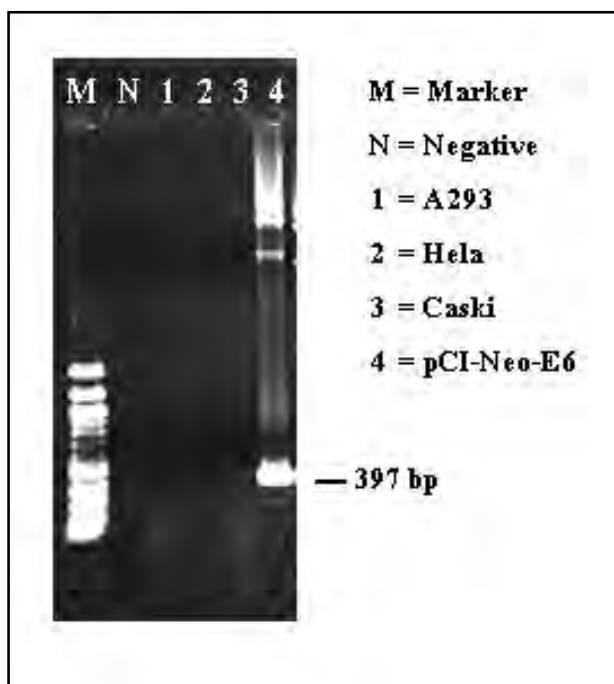
รูปที่ 19 SDS-PAGE and Western blot analysis ของ GST-HPV16E6. A: SDS-PAGE stained with coomassie blue and B: Western blotting, the purified GST-E6 was detected with mouse anti-E6 monoclonal antibody, lane1; whole cell lysate from *E.coli BL-21(DE3)* non-induced by IPTG, lane2; whole cell lysate from *E.coli BL-21(DE3)* containing pGEX-3X-MT-E6 induced by IPTG, and lane3; purified of GST- HPV16E6.



รูปที่ 20 SDS-PAGE analysis ของ GST-HPV16L1 Lane M; protein marker, lane1 and 2; whole cell lysate from *E.coli BL-21(DE3)* containing pGEX-4T-2-L1 non-induce and induced by IPTG, respectively. Lane3; inclusion bodies form *E.coli BL-21(DE3)*, lane4; soluble fraction from *E.coli BL-21(DE3)*, lane5; flow-through washed *E.coli BL-21(DE3)*, lane6; purified GST-HPV16L1 in urea solution.

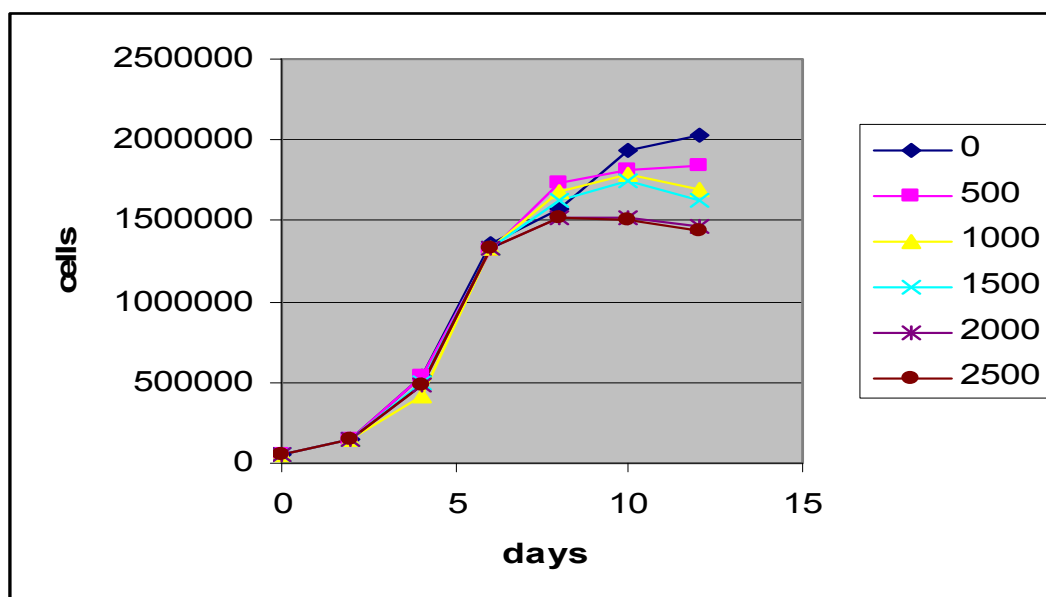
2. การพัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกของแอนติเจนของไวรัสแปปิโลมา

2.1 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง ได้รับพลาสมิด pCI-NEO-E6 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่มียีน HPV-16B6 ทำการ transform เข้าแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α เพื่อทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดให้มีปริมาณมาก แบคทีเรียที่แยกได้ทำการพิสูจน์ว่ามีพลาสมิด pCI-NEO-E6 โดยใช้วิธี PCR ดังรูปที่ 21 แถวที่ 4



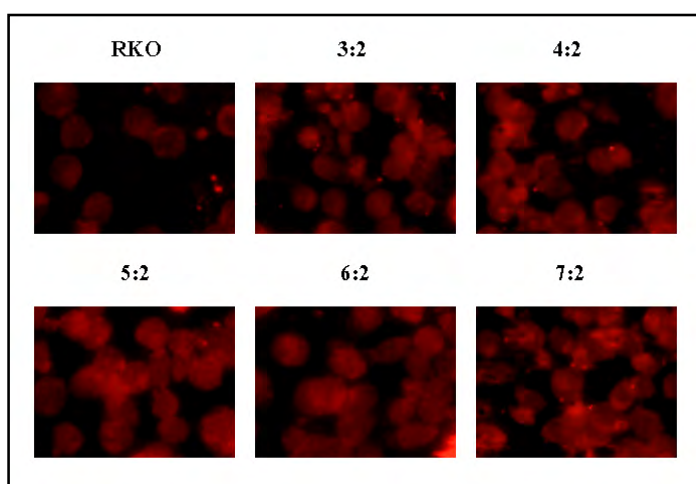
รูปที่ 21 ผลการเพิ่มจำนวนยีน HPV-16E6 แถว M เป็น 100 bp DNA ladder แถว N เป็นน้ำกลั่น แถวที่ 1 เป็นเซลล์ A293 ที่ไม่มีสารพันธุกรรม HPV แถวที่ 2 เซลล์ HeLa ที่มีสารพันธุกรรม HPV-18 แถวที่ 3 เซลล์ CaSki ที่มี HPV-16 แถวที่ 4 เป็นพลาสมิดที่สกัดได้จาก transformed *E. coli* DH5 α

2.2 ทดสอบความคงทนของเซลล์ RKO ต่อยาปฏิชีวนะ neomycin ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เนื่องจากเซลล์ที่จะเตรียมให้มีการแสดงออกของ HPV-16E6 นั้นต้องทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ neomycin ดังนั้นจึงทำการทดสอบความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ขนาดตั้งแต่ 0, 500, 1,000, 2,000 and 2,500 $\mu\text{g/ml}$ และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และนับเซลล์ที่มีชีวิตรอด ผลพบว่า เซลล์เจริญได้จนถึงวันที่ 6 และเริ่มตายเรื่อย ๆ และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2,000 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดี ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 จำนวนเซลล์ RKO ที่มีชีวิตหลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ neomycin ที่ความเข้มข้น 0, 500, 1,000, 2,000 and 2,500 µg/ml

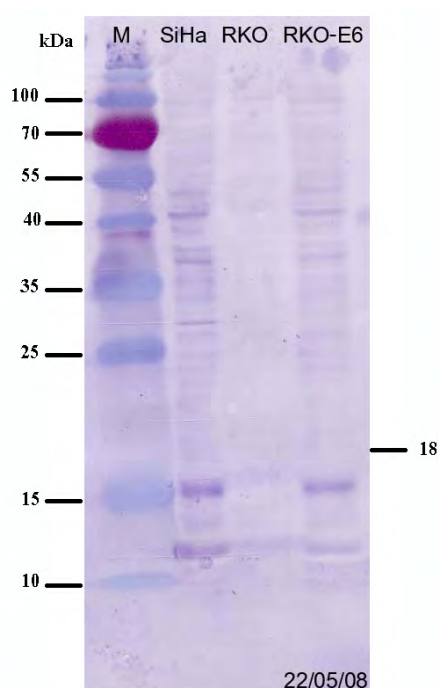
2.3 การหาสถานะที่เหมาะสมในการทำ transfection เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในการทำ transfection โดยใช้อัตราส่วนน้ำยากับปริมาณ DNA ของ pCI-Neo-E6 ต่าง ๆ กันคือ 3:2, 4:2, 5:2, 6:2 และ 7:2 (µl transfection reagent:µg DNA) พบว่าประสิทธิภาพของการเข้าสู่เซลล์ประมาณร้อยละ 10-30 หลังจากตรวจดูการแสดงออกของ HPV-16E6 ภายนอกเซลล์ด้วยวิธี IFA ดังรูปที่ 23 อัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 4:2



รูปที่ 23 pCI-Neo-E6 transfected RKO cells ที่อัตราส่วน µl transfection reagent:µg DNA, 3:2, 4:2, 5:2, 6:2 and 7:2 เซลล์ควบคุมคือ Non-transfected RKO cells

2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีความคงทน (stable cell line) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์หลังจากทำการ transfection ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/ml}$ อย่างต่อเนื่อง โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของ HPV-16E6 ภายในเซลล์ด้วยวิธี IFA เป็นระยะทุก ๆ 1 เดือน พบว่า ประมาณ 3 เดือน เซลล์ทั้งหมดมีการแสดงออกของ HPV-16E6

2.5 การตรวจจับโปรตีน HPV-16E6 ด้วยวิธี Western blot ทำการสกัดโปรตีน HPV-16E6 จากเซลล์ ที่ตรวจพบ HPV-16E6 ภายในเซลล์ด้วยวิธี IFA อีกครั้งด้วยวิธี Western blot พบว่า เซลล์ RKO-E6 มีการแสดงออกของโปรตีน HPV-16E6 ซึ่งปรากฏที่ขนาด 18 กิโลดาลตัน แต่ปริมาณน้อยมาก แม้จะใช้เซลล์มากถึงสิบล้านเซลล์ ดังรูปที่ 24



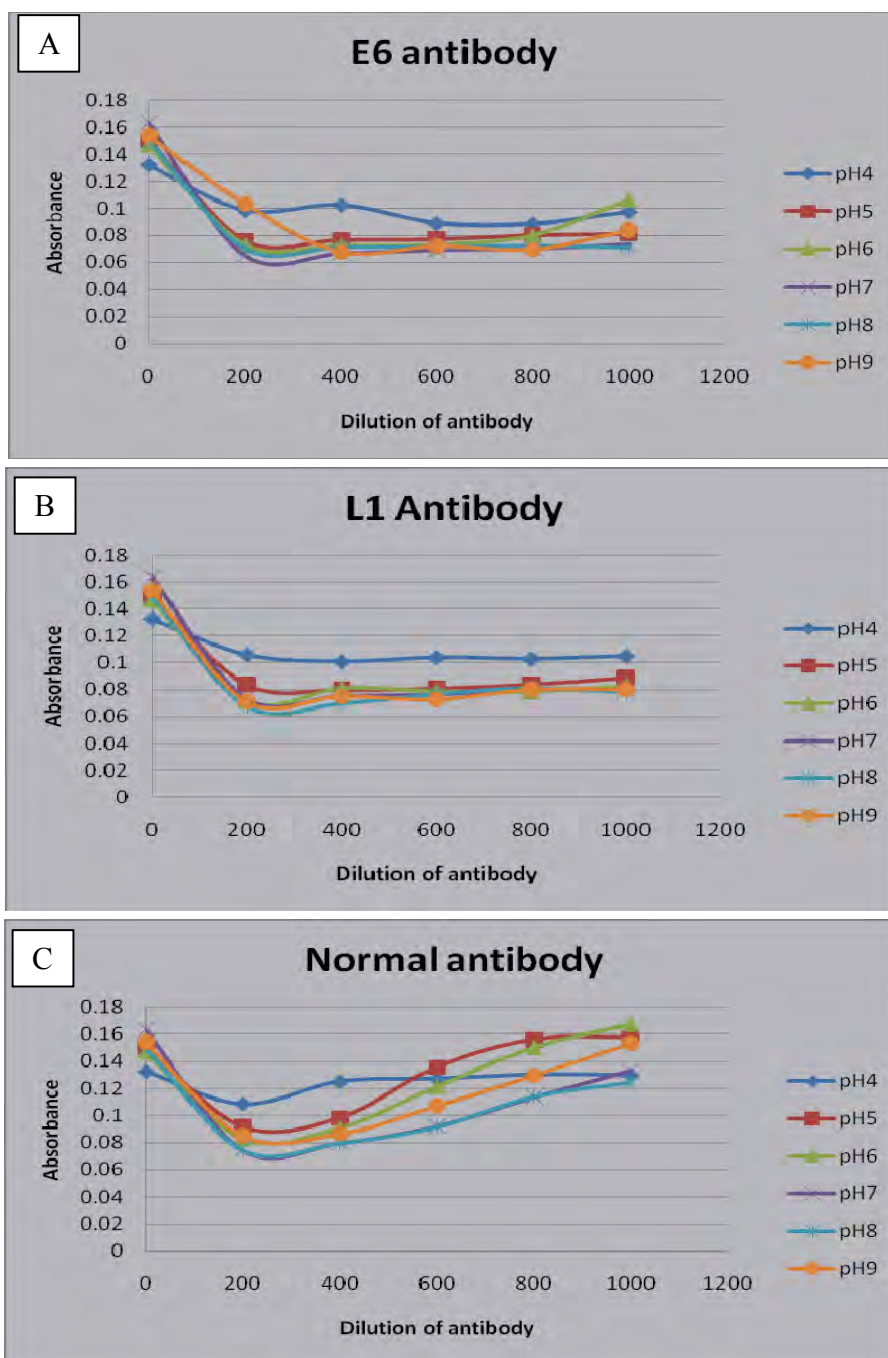
รูปที่ 24 การตรวจหาโปรตีน HPV16E6 ที่สกัดจากเซลล์ RKO-E6 (pCI-Neo E6 transfected RKO cells) M: Marker SiHa: เซลล์ควบคุมบวก RKO: เซลล์ที่ไม่มีพลาสมิด เป็นเซลล์ควบคุมลบ

ส่วนที่ 4

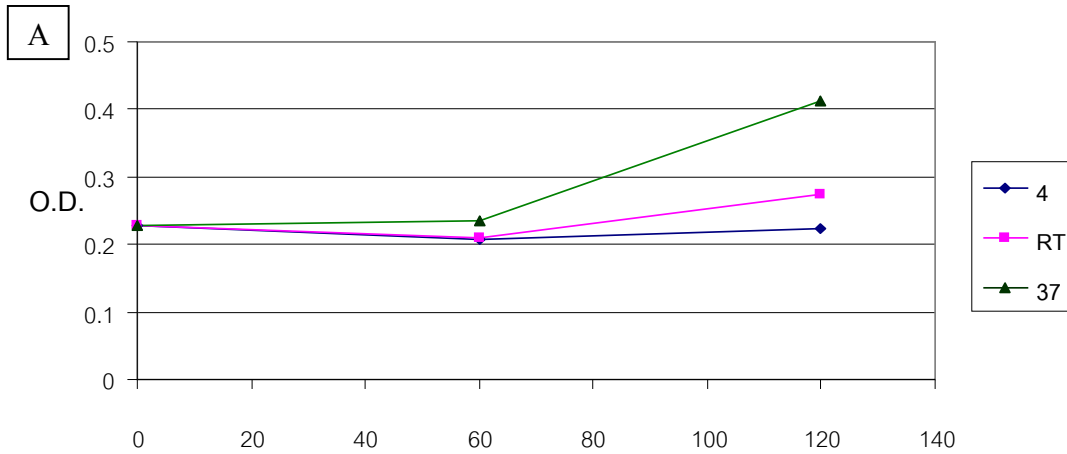
1. การพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ

1.1 การหาความเข้มข้นของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการเคลือบอนุภาคนาโนทองคำ แอนติบอดีที่ใช้จะประกอบด้วย HPV16L1- goat polyclonal IgG ความเข้มข้น 200ug/ml HPV16E6 – goat polyclonal IgG ความเข้มข้น 200ug/ml และ Normal goat IgG ความเข้มข้น 200ug/ml ทำการเจือจางแอนติบอดีเท่ากับ 1:200 , 1:400, 1:600, 1:800 และ 1:1000 ใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองคำขนาด 10 nm เท่ากับ 0.0025% H_{Au}Cl₄ ทดสอบที่ระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่ 4,5,6,7,8 และ 9 ผลแสดงความเข้มข้นของแอนติบอดีและความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่เหมาะสม จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 nm ที่ระดับความเข้มข้นแอนติบอดีและความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำต่างๆ แสดงในรูปที่ 25 สรุปภาวะความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่เหมาะสมคือความเป็นกรด-ด่างที่ช่วง 7-9 ความเข้มข้นของแอนติบอดี E6 และ L1 ที่เหมาะสมคือระดับความเจือจางที่ 1: 400 และ ความเข้มข้นของ Normal antibody ที่เหมาะสมคือระดับความเจือจางที่ 1:200

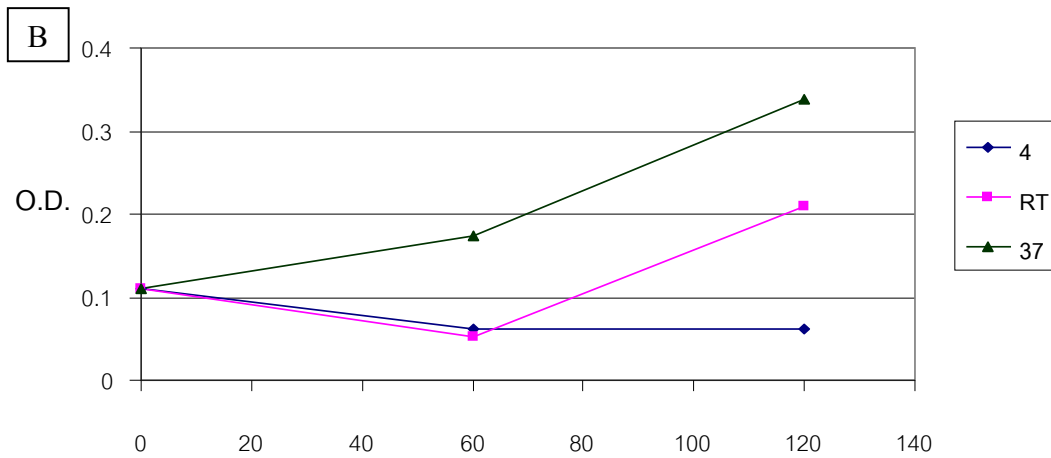
1.2 การทดสอบปฏิกิริยารวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำกับกับแอนติเจน E6 หรือ L1 หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกัน (Immunoagglutination assay) กับแอนติเจน E6 และ L1 โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ความเจือจาง 1:400 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองคำขนาด 10 nm เท่ากับ 0.0025% H_{Au}Cl₄ ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำ = 8 เวลาที่ทำปฏิกิริยา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิขณะทำปฏิกิริยา 4, 25 (อุณหภูมิห้อง) และ 37 องศาเซลเซียส และ ใช้ปริมาณแอนติเจน E6 และ L1 เท่ากับ 40 ไมโครกรัม ผลดังรูปที่ 26 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกัน คือ อุณหภูมิ 25 หลังทำปฏิกิริยาแล้วจะเห็นเป็นตะกอนสีแดงตกอยู่ก้นหลอด (รูปที่ 27)



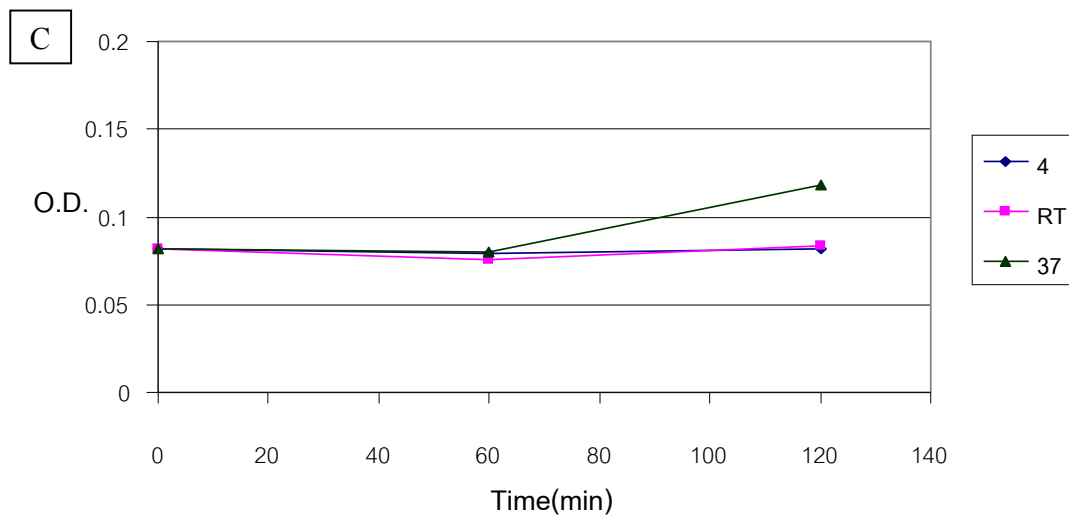
รูปที่ 25 กราฟแสดงค่า OD 580 nm เฉลี่ย ที่ระดับความเจือจางของแอนติบอดี E6 (A), L1 (B), normal antibody (C) กับ ระดับ pH (4, 5, 6, 7, 8, และ 9) ของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำ



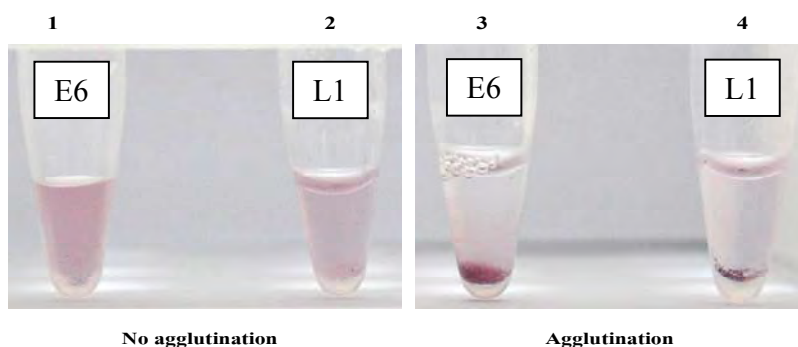
Temperature dependence of E6 antibody coated AuNPs immunoagglutination process



Temperature dependence of normal antibody coated AuNPs immunoagglutination process

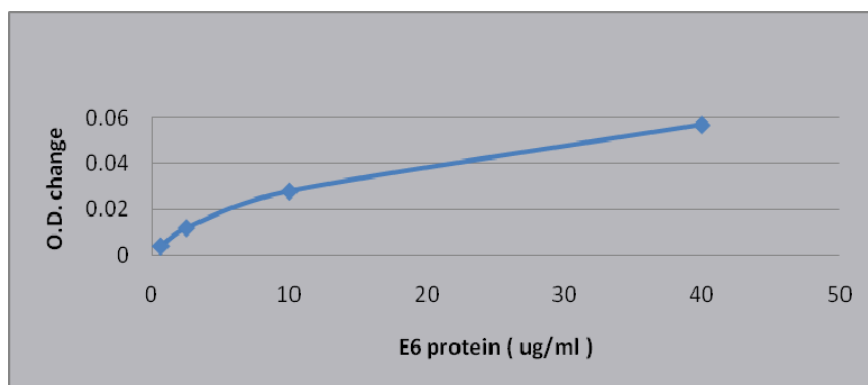


รูปที่ 26 กราฟแสดงการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกันของอนุภาคนาโนทองคำกับแอนติเจน L1 (A) และ E6 (B) ที่ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส (C) เป็นหลอดควบคุมลบ วัดการดูดกลืนแสงที่ 620 nm



รูปที่ 27 ปฏิกริยาของอนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบด้วย normal antibody กับแอนติเจน E6 (หลอดที่ 1) และ L1 (หลอดที่ 2) และ อนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ E6 และ L1 กับแอนติเจน E6 (หลอดที่ 3) และ L1 (หลอดที่ 4) ตามลำดับ จะสังเกตเห็นการตกตะกอนของอนุภาคนาโนทองคำที่กั้นหลอด

1.3 ความไวของการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่ม ทดสอบความไวในการตรวจจับแอนติเจนปริมาณต่าง ๆ กันคือ 0.625, 2.5, 10 และ 40 ug ผลพบว่า สามารถตรวจเห็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ปริมาณแอนติเจน E6 = 2.5 ug (รูปที่ 28) ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกันกับแอนติเจน L1



รูปที่ 28 กราฟแสดงความไวของการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกันที่เวลา 60 นาทีหลังทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ที่เปลี่ยนแปลงในระดับความเข้มข้นของ E6 แอนติเจน 0.625, 2.5, 10 และ 40 ug/ml

อภิปรายและวิจารณ์ผล

การศึกษาวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองที่มีก้อนมะเร็งที่เกิดจากการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก คือ HeLa ด้วยวิธี dorsal skin-fold window chamber technique (รูปที่ 1) โดยพบว่าปริมาณเซลล์ที่น้อยที่สุดที่สามารถปลูกถ่ายและพัฒนาเป็นก้อนเนื้อออกซึ้นมานั้นใช้เพียง 2.5×10^5 cells เท่านั้น (ตารางที่ 1) นอกจากนี้พบว่า 1) การขยายขนาดของก้อนเนื้อออกมีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์มะเร็งที่ปลูกถ่าย ดังตารางที่ 1 2) อัตราการโตของก้อนเนื้อ (ขนาดต่อระยะเวลา) มีความสัมพันธ์กัน แสดงในรูปที่ 2 C 3) การตรวจดูด้วยกล้อง intravital fluorescent videomicroscopy แสดงให้เห็นว่ามีการพัฒนาของหลอดเลือดหลังจากปลูกถ่ายเซลล์เพียงสองอาทิตย์ ดังรูปที่ 3 4) หนูที่ได้รับการปลูกถ่ายสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานอย่างน้อย 6 เดือนหลังการปลูกถ่าย ซึ่งข้อดีเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการนำโมเดลไปใช้ในการศึกษาต่อไป เช่น ศึกษายาต้านมะเร็ง ศึกษากลไกการเจริญของก้อนเนื้อในระดับโมเลกุล เป็นต้น

แม้ว่าจะมีการศึกษาหลายฉบับที่แสดงถึงการพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองโดยทำให้มีการติดเชื้อไวรัสเปปปีโลมา แต่ก็ยังมีข้อจำกัดหลายอย่าง (16, 17) เช่น การเตรียมไวรัสเปปปีโลมาทำได้ยาก เนื่องจากเป็นไวรัสที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงปกติทั่ว ๆ ไปได้ ดังนั้นการเตรียมไวรัสจึงต้องเตรียมจากเนื้อเยื่อติดเชื้อจากผู้ป่วยซึ่งต้องใช้จำนวนเนื้อเยื่อปริมาณมากเพราะมีจำนวนไวรัสส่น้อย นอกจากนี้มีความพยายามนำเนื้อเยื่อผู้ป่วยปลูกฝังลงในสัตว์ทดลองโดยตรงแต่พบปัญหาการเจริญของเนื้อเยื่อเหล่านั้นไม่คงที่ ข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ไม่สามารถติดตามการพัฒนาของเซลล์มะเร็งจนเป็นก้อนนูน เช่นไม่สามารถตรวจดูการพัฒนาของระบบหลอดเลือดที่มาเลี้ยงเซลล์ต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งวิธีที่ใช้ในการวิจัยนี้ คือ dorsal skin-fold window chamber technique สามารถแก้ปัญหาที่กล่าวมาได้เป็นอย่างดี

ในงานวิจัยนี้ได้นำโมเดลหนูทดลองที่พัฒนาขึ้นมาศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้แกมมาเคลตาทีเซลล์ในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกแบบภูมิคุ้มกันบำบัด การเลือกใช้แกมมาเคลตาทีเซลล์นั้น เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าแกมมาเคลตาทีเซลล์มีบทบาทสำคัญในการควบคุมเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น myeloma, colon carcinoma, renal cell carcinoma และ hepatocarcinoma เป็นต้น (19-22) และมีรายงานพบว่า isopentenyl pyrophosphate (IPP) ซึ่งเป็นสารระหว่างกลางในขบวนการ mevalonate pathway ทำหน้าที่

เป็นแอนติเจนที่สำคัญในการกระตุ้นแอมมาเซลล์ที่เซลล์ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ต่าง ๆ ได้ (23) จึงมีการพัฒนาายากลุ่ม nitrogen bisphosphonate drugs (nBps drugs) ซึ่งจะกระตุ้นในเซลล์มีการสะสม IPP และแสดงออกภายในเซลล์ โดยคาดหวังว่าเซลล์ที่ได้รับยาจะถูกทำลายด้วยแอมมาเซลล์ (24-26) นอกจากนี้พบว่าการทำลายของแอมมาเซลล์ไม่ต้องการอาศัยความจำเพาะของเนื้อเยื่อ (MHC) ซึ่งต่างจากขบวนการทำลายเซลล์ของ cytotoxic T cells จึงเป็นข้อดีที่สามารถเตรียมแอมมาเซลล์จากเลือดของคนอื่นได้ อย่างไรก็ตามสมมุติฐานเหล่านี้อยู่ระหว่างการพิสูจน์ ก่อนที่จะทดลองในหนู จึงทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงให้หลอดทดลองก่อน หลังจากทำการแยกแอมมาเซลล์จากเลือดผู้ป่วยจากโลหิต วิทยาชาวไทย นำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนและกระตุ้นให้มีความจำเพาะต่อ IPP ด้วยยา pamidronate ในขนาดที่เหมาะสมแล้ว จึงนำเซลล์มาทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด คือ HeLa, CaSki และ SiHa ผลการทดลองชี้ให้เห็นชัดเจนว่าแอมมาเซลล์สามารถทำลายเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ความสามารถในการทำลายขึ้นกับชนิดของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด (ตารางที่ 6) แสดงว่า pamidronate กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการสะสมของ IPP ทำให้แอมมาเซลล์สามารถทำลายได้ จากผลการทดสอบสังเกตเห็นว่าเซลล์ปกติ (NTY) สามารถถูกทำลายได้ด้วยแอมมาเซลล์ ซึ่งแอมมาเซลล์ของแต่ละบุคคลมีความสามารถในการทำลายแตกต่างกัน แต่กระนั้นก็ยังต่ำกว่าเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิด คาดว่าเป็นเพราะเซลล์ปกตินั้นไม่ใช่เซลล์ที่ได้มาจากบุคคลเดียวกับที่นำมาแยกแอมมาเซลล์ ดังนั้น เป็นไปได้ว่ามี allogenic response ซึ่งเมื่อลองนำเซลล์เม็ดเลือดขาวคนเดียวกัน (autologous cell) มากระตุ้นด้วย PHA พบว่าเซลล์แทบไม่ถูกทำลายเลย ปรากฏการณ์ที่พบนี้สอดคล้องกับรายงานของ Corvaisier และคณะ (27) ซึ่งศึกษาการทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยแอมมาเซลล์ และพบความแตกต่างในการทำลาย autologous และ allogous colon cancer cells เนื่องจากกลไกการทำลายเซลล์ของ Cytotoxic T lymphocyte (CTL) เป็นที่ทราบกันดีว่าเกี่ยวข้องกับหลังสารหลายชนิด ที่สำคัญคือ $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ นอกจากนี้ยังทำให้มีการแสดงออกของโมเลกุล CD107 บนผิวเซลล์ถ้าได้รับการกระตุ้น (28) ในงานวิจัยนี้จึงตรวจสอบหาสาร $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ และการแสดงออกของโมเลกุล CD107 เพื่อศึกษากลไกการทำลายของแอมมาเซลล์ว่าเหมือนกับ CTL หรือไม่ ผลการตรวจหาการหลังของ $IFN-\gamma$ และ $TNF-\alpha$ พบว่าสัมพันธ์กับอัตราการฆ่าเซลล์ (รูปที่ 12 และ 13) แต่ที่น่าสนใจคือ การแสดงออกของโมเลกุล CD107 ไม่ได้พบในทุกเซลล์ของแอมมาเซลล์ (ร้อยละ 6.9-13.95) ปริมาณที่แสดงออกมากน้อยสัมพันธ์กับความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิด

แสดงว่า กลไกการทำลายของแกมมาเซลล์ที่เซลล์น่าจะแตกต่างจาก CTL โดยอาจอาศัยโมเลกุลอื่น มีรายงานพบการแสดงออกของ FasL บนผิวเซลล์แกมมาเซลล์ที่เซลล์ และเป็นที่ยอมรับว่าบนผิวเซลล์มะเร็งหลายชนิดมีโมเลกุล Fas บนผิวเซลล์ ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างสองโมเลกุลนี้กระตุ้นให้เกิดขบวนการ apoptosis ทำให้เซลล์ตายได้ (29) นอกจากนี้ยังมีบทบาทของ NKG2D และ MICA/B ซึ่งรายงานในการศึกษามะเร็งของไต (22) เป็นต้น กลไกที่แน่ชัดคงต้องทำการศึกษาต่อไป

เมื่อทำการทดลองความสามารถของการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกของแกมมาเซลล์ในหนูทดลอง พบว่าแกมมาเซลล์สามารถทำให้เซลล์ตายได้ โดยกลไก apoptosis (รูปที่ 15) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้แกมมาเซลล์ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด

เนื่องจากกลไกการก่อมะเร็งที่มีสาเหตุจากไวรัสแปปิโลมา นั้น ยังไม่ชัดเจน แต่มีการศึกษาหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีน E6 ของไวรัสแปปิโลมามีบทบาทสำคัญในการก่อมะเร็ง โดยเฉพาะ E6 ของ HPV-16 และ HPV-18 เพราะเซลล์มะเร็งจะมีการแสดงออกของโปรตีนนี้สูงมาก ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหาโปรตีน HPV-16E6 เพื่อใช้วินิจฉัยโรคมะเร็งปากมดลูก จึงเตรียมโปรตีน HPV-16E6 และ โปรตีน L1 บริสุทธิ์ (รูปที่ 19 และ 20) เพื่อคาดหวังจะนำไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจต่อไป มีรายงานการเตรียมโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การใช้เซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian cells) ยีสต์ (yeast) แบคทีเรีย (bacteria) ไวรัส (baculovirus) transgenic plants และแบคทีเรีย (30-33) การเตรียมโปรตีนจากแบคทีเรียโดยเฉพาะ *E. coli* สามารถเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ระบบ glutathione-S-transferase (GST) gene fusion system ซึ่งส่วนใหญ่เตรียมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ในการเตรียมโปรตีน E6 พบว่าอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลดีกว่า โปรตีน E6 สร้างและละลายอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ส่วนโปรตีน L1 จะอยู่ใน inclusion body ดังนั้นวิธีการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนทั้งสองนี้จึงใช้วิธีที่ต่างกัน นอกจากความพยายามในการเตรียมโปรตีน HPV-16E6 และ โปรตีน L1 แล้ว ยังได้เตรียมเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน HPV-16E6 ได้ด้วย (รูปที่ 23 และ 24) เซลล์ที่เตรียมได้นี้ จะมีประโยชน์ในการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน HPV-16E6 ในการเปลี่ยนแปลงเซลล์เป็นเซลล์มะเร็งได้ต่อไป

เพราะสามารถเตรียมโปรตีน HPV-16E6 และ โปรตีน L1 บริสุทธิ์ได้ จึงทำการพัฒนาวิธีการตรวจหาโปรตีน HPV-16E6 ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ (รูปที่ 27) และได้ทดลองนำร่องทดสอบกับสารสกัดจากเซลล์ CaSki ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่มีสารพันธุกรรมไวรัสแปปิโลมาอยู่ประมาณ 600 copies และมีการแสดงออกของ HPV-16E6 ปริมาณสูง (34) ซึ่งผลการตรวจสอบพบว่าสามารถตรวจได้ และวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มี ความจำเพาะกับ HPV-16 สูงเพราะเมื่อได้ทดสอบความจำเพาะของวิธีนี้กับจุลชีพแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ และ เซลล์ Hep-2 ซึ่งไม่มีสารพันธุกรรมไวรัสแปปิโลมา พบว่าไม่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนได้ (ตารางที่ 8) อย่างไรก็ตามในโครงการวิจัยนี้การพัฒนาวิธีการตรวจหา HPV-16E6 และ HPV-16L1 เป็นโครงการนำร่อง ซึ่งต้องมีการประเมินวิธีการตรวจต่อไป เพื่อใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยและพยากรณ์โอกาสการกลายเป็น มะเร็งปากมดลูกของผู้ป่วย

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

โครงการวิจัยนี้สามารถพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองที่มีก้อนเนื้อมะเร็งปากมดลูกได้ โมเดลนี้สามารถนำไปใช้เพื่อทำการทดสอบหายารักษามะเร็งได้ ซึ่งขณะนี้กำลังดำเนินการทดสอบสมุนไพรรักษาแผลหมอ (งานวิจัยนี้ รศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช เป็นผู้วิจัยหลัก)

เซลล์เกมมาเซลล์ที่เซลล์ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยยา Pamidronate มีประโยชน์มากในการนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด แต่เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ยังจำเป็นต้องทำการแยกเซลล์ที่จำเพาะ (T cell cloning) และศึกษาคุณสมบัติให้สมบูรณ์ก่อน และต้องทดสอบในหนูทดลองให้ได้ข้อมูลกลไกของยาอย่างชัดเจนก่อนนำไปใช้กับคน

และเนื่องจากสามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาโปรตีน HPV-16E6 และ HPV-16L1 ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำได้ แต่ยังไม่ได้ทำการประเมินคุณภาพของวิธีการตรวจกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจริง ซึ่งขณะนี้ ได้ดำเนินการขอทุนวิจัยของสภาวิจัยแห่งชาติ ปีพ.ศ. 2555 อยู่ระหว่างรอผลการพิจารณา

ส่วนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ HPV-16E6 สามารถนำมาศึกษาคุณสมบัติการเจริญเติบโตและความสามารถในการต่อต้าน apoptosis และกลไกการก่อมะเร็งของโปรตีน E6

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

1. การหายารักษาโรคติดเชื้อไวรัสแปปีโลมา และมะเร็งปากมดลูก โดยใช้โมเดลสัตว์ทดลองที่มีเซลล์มะเร็งของไวรัสแปปีโลมาเจริญเติบโต
2. วิธีการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดด้วยเซลล์แกมมาเดลตาทีเซลล์
3. วิธีการตรวจหาโปรตีน HPV-16E6 เพื่อบ่งชี้โอกาสการกลายเป็นมะเร็ง หรือเพื่อพยากรณ์ระยะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ติดเชื้อไวรัสแปปีโลมา
4. วิธีการตรวจหาโปรตีน HPV-16L1 เพื่อบ่งชี้การติดเชื้อและการเพิ่มจำนวนของไวรัสแปปีโลมา
5. องค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกการเกิดมะเร็งที่เกิดจากโปรตีน HPV-16E6

บรรณานุกรม

1. National Cancer Institute. Annual report 1997. Department of Medical Service, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand.
2. Cates, W., and the American Social Health Association Panel 1999. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. *Sex. Transm. Dis.* 26: s2-s7.
3. Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. 1999. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 80: 827-841.
4. Pisani, P., Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. 1999. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83: 18-29.
5. Parkin, D.M., Laara, E., Muir, C.S. 1998. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 41: 184-197.
6. Burd, E.M. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 16: 1-17.
7. Kubbutat, M.H.G., Vousden, K.H. 1996. Role of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced anogenital malignancies. *Semin Virol* 17: 295-304.
8. zur Hausen, H. 1991. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virol* 184: 9-13.
9. Kawana, K., Yasugi, T., Kanda, T., Kawana, Y., Hirai, Y., Yoshikawa, H., Taketani, Y. 2002. Neutralizing antibodies against oncogenic human papillomavirus is a possible determinant of the fate of low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Biochem Biophys Res Commun* 296:102-105.
10. Nagakiwa, M., et al. 1997. Cytotoxic T lymphocyte responses to E6 and E7 proteins of human papillomavirus type 16: Relationship to cervical intraepithelial neoplasia. *J Infect Dis* 175:927-934.
11. Zhou, J., Sun, X.Y., Stenzel, D.J., Frazer, I.H. 1999. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF protein in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virol* 185: 251-257.
12. Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., Schiller, F.T. 1992. Papillomavirus L1 Major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12180-12184.

13. Stanley, M. 2005. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine; article inpress*: available online at www.sciencedirect.com.
14. Scott, M., Nakagawa, M., Moscicki, A.B. 2001. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clin Diag Lab Immunol* 8: 209-220.
15. Torrens, I., Mendoza, O., Batte, A., Reyes, O., Fernandez, L.E., Mesa, C., Guillen, G. 2005. Immunotherapy with CTL peptide and VSSP eradicate established human papillomavirus (HPV) type 16 E7- expressing tumors. *Vaccine; article inpress*: available online at www.sciencedirect.com.
16. Wu, T., Hsieh, S.T., Purow, B.W., Kurman, R.J. 1997. Demonstration of human papillomavirus (HPV) genomic amplification and viral-like particles from CaSki cell line in SCID mice. *J Virol Methods* 65: 287-298.
17. Duan, J., et al. 2004. A novel model of HPV infection in meshed human foreskin grafts. *Antiviral Res* 64: 179-188.
18. Husnjak, K., et al. 2000. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 88(2): 125-134.
19. Bouet-Toussaint, F., et al. 2008. Vgamma9Vdelta2 T cell-mediated recognition of human solid tumors. Potential for immunotherapy of hepatocellular and colorectal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 57(4): 531-539.
20. Kunzmann, V., et al. 2000. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 96(2): 384-392.
21. Ericsson, P.O., et al. 1991. In vivo induction of gamma/delta T cells with highly potent and selective anti-tumor cytotoxicity. *Eur J Immunol* 21(11): 2797-2802.
22. Viey, E., et al. 2005. Phosphostim-activated gamma delta T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma. *J Immunol* 174(3): 1338-1347.
23. Gober, H.J., et al. 2003. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 197(2): 163-168.
24. Wilhelm, M., et al. 2003. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 102(1): 200-206.

25. Mattarollo, S.R., et al. 2007. Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to Vgamma9Vdelta2 T cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 56(8): 1285-1297.
26. Sato, K., et al. 2005. Cytotoxic effects of gammadelta T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int J Cancer* 116(1): 94-99.
27. Corvaisier, M., et al. 2005. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J Immunol* 175(8): p. 5481-5488.
28. Braza, M.S., et al. 2011. {gamma}{delta} T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica* 96(3): p. 400-407.
29. Shires, J., E. Theodoridis, A.C. Hayday. 2001. Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalphabeta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). *Immunity* 15(3): p. 419-434.
30. Sehr, P., Muller, M., Hopfl, R., Widschwendter, A., Pawlita, M. 2002. HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione S-transferase. *J Virol Methods* 106(1) : p. 61-70.
31. Chen, X.S., Casini, G., Harrison, S.C., Garcea, R.L. 2001. Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol* 16 (307): p. 173-182.
32. Kirnbauer, R., et al. 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 67(12): p. 6929-6936.
33. Biemelt, S., Sonnewald, U., Galmbacher, P., Willmitzer, L., Muller, M. 2003. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol* 77(17): p. 9211-9220.
34. Woodman, C.B., Collins, S.I., Young, L.S. 2007. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7(1): p. 11-22.

ภาคผนวก

ประวัตินักวิจัยและคณะ

1. หัวหน้าโครงการวิจัย (ไทย) นางสาว ภาวพันธ์ ภัทรโกศล

(อังกฤษ) Miss Parvapan Bhattarakosol

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ 9

สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ทำงาน ถนนพระรามสี่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 0-2252-8181 ต่อ 3628 โทรสาร 0-2252-5952

e-mail parvapan@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปีพ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษา
ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับ 2	2524	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	2527	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	2533	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
Certificate of “Basic Procedure in Medical Virology”	2537	School of Medicine Nagoya University, Japan
Research on Signal transduction by oncogene that encode tyrosine kinase	2538	School of Medicine Nagoya University, Japan
Research on Tyrosine kinase protein prepared from Baculovirus expression	2540	School of Medicine Nagoya University, Japan

ผลงานวิชาการ (ตั้งแต่ปี 2000 จนถึงปัจจุบัน)

1. Pancharoen C, Chansongsakul T, **Bhattarakosol P.** Causes of fever in children with first febrile seizures: How common are human herpesvirus-6 and dengue virus infections?. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31; 521-3.

2. Limpai boon T, Pooart J, **Bhattarakosol P**, Niruthisard S, Chantratita W, Lulitanond V. p53 status and human papillomavirus infection in Thai women with cervical carcinoma. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31; 66-71.
3. Pancharoen C, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Infectious mononucleosis and seroprevalence of Epstein-Barr virus infection in Children. *Thai J Pediatrics* 2000; 39; 115-9.
4. **Bhattarakosol P**, Punnarugsa V, Mungmee V. Evaluation of an in-house ELISA for detecting herpes simplex virus antigen in comparison to conventional cell culture, shell vial cell culture and a commercial ELISA kit. *Chula Med J* 2001; 45; 11-9.
5. Mungmee V, Thammaborvorn R, Semboonlor L, Punnarugsa V, **Bhattarakosol P**. Situation of viral infectious diseases in King Chulalongkorn Memorial Hospital during 1993-1997. *Chula Med J* 2001; 45; 3-9.
6. **Bhattarakosol P**, Puncharoen C, Mekmullica J, Bhattarakosol P. Seroprevalence of anti-human herpesvirus-6 IgG antibody in children of Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001; 32(1); 143-7.
7. Puncharoen C, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Seroprevalence of Epstein-Barr virus infection in Thai children. *J Med Assoc Thai* 2001; 84(6); 850-4.
8. Kowitdamrong E, Thammaborvorn R, Semboonlor L, Mungmee V, **Bhattarakosol P**. Detection of Dengue HI and IgM antibody : Is it diagnostically useful ? When and how ? *J Med Assoc Thai* 2001; 84 (Suppl 1); s148-53.
9. Vilaichone R, Mahachai V, Eiam-Ong S, Kullavanijaya P, Wisedopas N, **Bhattarakosol P**. Necrotizing ileitis caused by cytomegalovirus in patient with systemic lupus erythematosus: case report. *J Med Assoc Thai* 2001; 84 (Suppl 1); s469-73.
10. Pancharoen C, Mekmullica J, Chinratanapisit S, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Seroprevalence of Epstein-Barr virus antibody among children in various age groups in Bangkok, Thailand. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2001; 19; 135-7.
11. **Bhattarakosol P**, Chirathaworn C, Chamma P. Replication of herpes simplex virus in T lymphocytes. *J Med Assoc Thai* 2002; 85(Suppl 1); s399-406.

12. **Bhattarakosol P**, Lertworapreecha M, Kitkumthorn N, Triratana chai S, Niruthisard S. Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women. *J Med Assoc Thai* 2002; 85(Suppl 1); s360-5.
13. **Bhattarakosol P**, Wiwanitkit V, Boonchalermvichian C, Nuchprayoon I. Human herpes virus 6 antibodies in beta-thalassemia/hemoglobin E pediatric patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2002;33 Suppl 3:149-51.
14. Noppornpanth S, Haagmans BL, Bhattarakosol P, Ratanakorn P, Niesters HGM, Osterhaus ADME, Poovorawan Y. Molecular epidemiology of gibbon hepatitis B virus transmission. *J Gen Virol* 2003; 84; 147-55.
15. Tulvatana W, **Bhattarakosol P**, Sansopha L, Sipivarak W, Kowitdamrong E, Paisuntornsug T, Karnsawai S. Risk factors for conjunctival squamous cell neoplasia: a matched case-control study. *Br J Ophthalmol*. 2003 Apr;87(4):396-8.
16. Khongphatthanayothin A, Suesawalak M, Muangmingsook S, **Bhattarakosol P**, Pancharoen C. Hemodynamic profiles of patients with dengue hemorrhagic fever during toxic stage: an echocardiographic study. *Intensive Care Med*. 2003 Apr;29(4):570-4.
17. Sakulwira K, Vanapongtipagorn P, Theamboonlers A, **Bhattarakosol P**, Wananukul S, Poovorawan Y. Detection and differentiation of human herpesviruses 1-5 by consensus primer PCR and RFLP. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2003; 21:55-61.
18. Likitnukul S, **Bhattarakosol P**, Poovorawan Y. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in children born to HIV-1 infected women. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2003 Jun;21(2):127-30.
19. Sridulyakul P, Chakraphan D, **Bhattarakosol P**, Patumraj S. Endothelial nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary circulation of streptozotocin induced diabetic rats: comparison using image analysis. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2003;29(3-4):423-8.
20. **Bhattarakosol P**, Pancharoen C, Kowitdamrong E, Thammaborvorn R, Mungmee V. Prevalence of parvovirus B19 infection in Thai young adults. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003; 34:585-8.
21. **Bhattarakosol P**, Pancharoen C, Mungmee V, Thammaborvorn R, Semboonlor L. Seroprevalence of anti-RSV IgG in Thai children aged 6 months to 5 years. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2003; 21:269-71.

22. Pancharoen C, Likitnukul S, Chongsrisawat V, Vivatvekin B, **Bhattarakosol P**, Suwangool P, Thisayakorn U. Rectal prolapse associated with cytomegalovirus pseudomembranous colitis in a child infected by human immunodeficiency virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34(3): 583-4.
23. Chimma P, Chirathaworn C, **Bhattarakosol P**. Increased susceptibility of HSV-1 growth in PHA activated T-lymphocyte caused by upregulating of HveA mRNA expression. *Intervirology* 2004; 47: 14-8.
24. Sakulwira K, Theamboonlers A, Oraveerakul K, Chaiyabutr N, **Bhattarakosol P**, Poovorawan Y. Orangutan herpesvirus. *J Med Primatol* 2004;33:1-5.
25. Tuksinvaracharn R, Tanayapong P, Pongrattanaman S, Hansasuta P, **Bhattarakosol P**, Siriyasatien P. Prevalence of dengue virus in aedes mosquitoes during dry season by semi-nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (semi-nested RT-PCR). *J Med Assoc Thai* 2004; 87 (Suppl 2):S129-133.
26. Hansasuta P, Incomserb P, Buranapraditkul S, **Bhattarakosol P**. Establishment of cytotoxic T lymphocytes specific for autologous Epstein-Barr virus in HIV-infected patients: The feasibility study of EBV-specific immunotherapy for patients with EBV-associated lymphoma. *J Med Assoc Thai* 2004; 87 (Suppl 2):S146-151.
27. Pongpanich A, **Bhattarakosol P**, Chirathaworn C. Induction of apoptosis by herpes simplex virus in Jurkat cells is partly through caspase-3, -8, and -9 activation. *J Med Assoc Thai* 2004; 87 (Suppl 2):S140-145.
28. Visaprom S, Chindamporn A, Chantratita A, **Bhattarakosol P**. Intratypic variations among Thai herpes simplex virus (HSV) isolates determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Submitted to *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005; 36(4): 910-6.
29. Yoysungnoen P, Wirachwong P, **Bhattarakosol P**, Niimi H, Patumraj S. Antiangiogenic activity of curcumin in hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. *Clinical Hemorheology Micro*, 2005; 33(2):127-35.
30. **Bhattarakosol P**, Visaprom S, Sangdara A, Mungmee V. Increase of Genital HSV-1 And Mixed HSV-1 and HSV-2 Infection in Bangkok, Thailand. *J Med Assoc Thai*, 2005; 88 (Suppl4):S300-4.

31. Incomserb P, **Bhattarakosol P**, Kulwichit W, Chatratita W, Hansasuta P. Establishment of real-time polymerase chain reaction-based assay for quantitation of Epstein-Barr virus DNA in healthy donors and in patients with EBV associated lymphoma. *J Med Assoc Thai*, 2005;88(Suppl4): S280-6.
32. Kovitdamrong E, Pancharoen C, Thammaborn R, **Bhattarakosol P**. The prevalence of varicella-zoster virus infection in normal healthy individuals aged above 6 months. *J Med Assoc Thai*, 2005;. 88(Suppl4)S7-11.
33. Boonyod D, Poovorawan Y, **Bhattarakosol P**, Chirathaworn C. Lip32, an outer membrane protein of *Leptospira*, as an antigen in dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2005; 23:133-141.
34. Yoysungnoen P, Wirachwong P, **Bhattarakosol P**, Niimi H, Patumraj S. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;34(1-2):109-15.
35. Chutinimitkul S, **Bhattarakosol P**, Srisuratanon S, Eiamudomkan A, Kongsomboon K, Damrongwatanapokin S, Chaisingh A, Suwannakarn K, Chieochansin T, Theamboonlers A, Poovorawan Y. H5N1 influenza A virus and infected human plasma. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jun;12(6):1041-3.
36. Chantaraarphonkun S, **Bhattarakosol P**. Intra and Intergenotypic Variations among Human Cytomegalovirus (HCMV) gB Genotypes in Clinical Samples. *Intervirology*. 2007;50:78-84.
37. Thammabovorn T, Mungmee V, Thammachotruja L, Kowitdamrong E, **Bhattarakosol P**. Prevalence of viral infections in clinical specimens at Virology Laboratory Unit during the year 1998 to 2004. *Chula Med J* 2007; 51: 229-39.
38. **Bhattarakosol P**, chantaraarphonkun S. Prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) gB genotypes in Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 835-40.
39. Duansak N, Yoysungnoen P, Somchaichana J, **Bhattarakosol P**, Wirachwong P, Patumraj S. Correlation between hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor expression under tumor neovascularization in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Asian Biomedicine* 2007, 1 (4) ;399-406.
40. Sangdara A, **Bhattarakosol P**. Acyclovir susceptibility of herpes simplex virus isolates at King Chulalongkorn Hospital, Bangkok. *J Med Assoc Thai* 2008 91(6):908-12.

41. Lertworapreecha M, Thammachotruja L, **Bhattarakosol P**. Prevalence and distribution of HPV type in Thai women. *Chula Med J* 2008; 52:161-7.
42. Theamboonlers A, **Bhattarakosol P**, Chongsrisawat V, Sungkapalee T, Wutthirattanakowit N, Poovorawan Y. Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during 2004-2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and a rare G3P[19] strain. *Virus Genes* 2008;36:289-98.
43. Lertworapreecha M, Patumraj S, Niruthisard S, Hansasuta P, **Bhattarakosol P**. Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. *Indian J Exp Biol* 2009;47:327-32.
44. Muangsub T, Khemachaiithanyarot N, Mungmee V, Ammaranond P, **Bhattarakosol P**. Stability of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) during Specimen Collection and Transport. *J Med Tech Assoc Thailand* 2009; 32(2):2819-26. (Thai)
45. Boonyasuppayakorn S, Kowitdamrong E, **Bhattarakosol P**. Molecular and demographic analysis of respiratory syncytial virus infection in patients admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand, 2007. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 2010; 4(5): 313–323.
46. Kuncharin Y, Sangphech N, Kueanjinda P, **Bhattarakosol P**, Palaga T. MAML1 regulates cell viability via the NF- κ B pathway in cervical cancer cell lines. *Exp Cell Res*. 2011 Aug 1;317(13):1830-40.
47. **Bhattarakosol P**, Kovitdamrong E, Prisuwan P. HIV infection may not increase the intrauterine transmission rate of CMV and HSV in patients with co-infection. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* 2011; 6:103-110.

2. ผู้ร่วมโครงการ (ไทย) นางสุทธิลักษณ์ ปทุมราช

(อังกฤษ) Mrs. Suthiluk Patumraj

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ 9

สถานที่ทำงาน ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ทำงาน ถนนพระรามสี่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 0-22564267 โทรสาร 0-22527854

e-mail medspr@hotmail.com, suthilukp@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปีพ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษา
ปริญญาตรี สาขาชีวเคมี	2524	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาโท สาขา Biomedical Engineering	2528	New Jersey Institute of Technology, USA
ปริญญาเอก สาขาสัตววิทยา	2533	University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA.

ผลงานวิชาการ (ตั้งแต่ปี 2000 จนถึงปัจจุบัน)

- Somboonwong J, Thanamitramanee S, Jariyapongskul A, **Patumraj S**. Therapeutic effects of Aloe vera on Cutaneous Microcirculation and Wound Healing in Second Degree Burn Model in Rats. *J Med Assoc Thai* 2000;83:417-25.
- Patumraj S**, Tewit S, Amatyakul S, Maneesri S, Jariyapongskul A, Kasantikul V, Shepro D. Comparative Effects of Garlic and Aspirin on Diabetic Cardiovascular Complication. *Drug Delivery* 2000; 7:1-6.
- Futrakul N, Panichakul T, Chaisuriya P, Sirisinha S, Futrakul P, **Patumraj S**. Endothelial Cell Cytotoxicity Induced by Nephrotic Serum. The Second Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania. Editors, Sirisinha S., Chaiyaroj S., Tapchaisri, P. Jan. 2000. Monduzzi Edi. S.p.A.
- Futrakul N, Panichakul T, Chaisuriya P, Sirissinha S, **Patumraj S**, Futrakul P. Endothelial cell cytotoxicity and renal hypoperfusion in idiopathic nephrotic syndrome. *Nephron* 2000;86: 241-2.
- Futrakul N, Bulthep P, **Patumraj S**, Futrakul P. Glomerular endothelial dysfunction and altered cytokines in severe nephrosis, *Nephron*. 2000;86:199.
- Wattanachon U., Covavisaruch N., **Patumraj S**. A measuring tool for vascular wall thickness : an image analysis approach. *Proc. The 4th National Computer Science and Engineering*. Nov. 16-17,2000.
- Amatyakul S., **Patumraj S**., Niimi H. Effects of adrenomedullin on the cardiac performance and coronary flow in an isolated perfused rat heart model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 23 (2000):269-75.
- Srikiatkachorn A, Anuntasethakul T., Maneesri S., Phansuwan-Pujito P., **Patumraj S**, and Kasantikul V. Hyposerotonin-induced nitric oxide supersensitivity in the cerebral microcirculation. *Headache* 2000 Apr; 40(4): 267-75.
- Udayachalerm W., Vechakarn O., **Patumraj S**. Effects of ACE-I on Diabetic Cardiovascular complications : Anti-Hypertensive and Non-Anthihypertensive Doses. *J Med Assoc Thai* 2001;84 (Suppl 1): S306-S13.

10. Chakraphan D., Thipakorn B., **Patumraj S.** Changes of mesenteric microcirculation in chronic diabetic rats: A pilot study using invital fluorescense microscopy. *Proc. 7th World Congress for Microcirculation. Aug. 19-22, 2001.*
11. Srikiatkachorn A, Anuntasethakul T., Phansuwan-Pujito P., **Patumraj S.**, Kasantikul V. Effect of serotonin depletion on nitric oxide induced cereberovascular nociceptive response. *Neuroreport 2001 Apr; 12(50): 967-71.*
12. Jariyapongskul A, **Patumraj S.**, Yamaguchi S, Niimi H. The effect of long-term supplementation of vitamin C on leukocyte adhesion to the cerebral endothelium in STZ- induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation 2002; 27(1): 67-76.*
13. Futrakul N, Tosukhowong P, Valyapongichit Y, Tipprukmas N, Futrakul P, **Patumraj S.** Oxidative stress and hemodynamic maladjustment in chronic renal disease : A therapeutic implication. *Ren Fail 2002 Jul ; 24(4) : 433-45.*
14. Futrakul N, Boongen M, Tosukhowong P, **Patumraj S.**, Futrakul P. Treatment with vasodilators and crude extract of *Ganoderma lucidum* suppresses proteinuria in nephrosis with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron. 2002 ; 92(3) : 719-20.*
15. Futrakul N, Tohsukhowong P, **Patumraj S.**, Siriviriyakul P, Tipprukmas N, Futrakul P. Treatments of hemodynamic maladjustment and oxidative stress prevent renal disease progression in chronically severe glomerulonephritides. *Ren Fail. 2003 Sep;25(5):839-44.*
16. Khemapech S., Monsiri K, **Patumraj S.**, Siriviriyakul P. Genistein replacement therapy for vasodilation disorder in bilateral ovariectomized rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press. 2003; 29: 271-78.*
17. Futrakul N, Boongen M, **Patumraj S.**, Siriviriyakul P, Tosukhowong P, Futrakul P. Treatment of glomerular endothelial dysfunction steroid-resistant nephrosis with *Ganoderma lucidum*, vitamins C, E, and vasodilators. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press. 2003; 29: 205-10.*
18. Sridulyakul P, Chakraphan D, Bhattarakosol P, **Patumraj S.** Endothelial nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary circulation of streptozotocin induced diabetic rats : comparison using image analysis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press. 2003; 29: 423-28.*
19. Futrakul N, Siriviriyakul P, Panichakul T, Butthep P, **Patumraj S.**, Tosukhowong P, Futrakul P. Glomerular endothelial cytotoxicity and dysfunction in nephrosis with focal segmental glomerulosclerosis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press. 2003; 29: 469-77.*
20. Futrakul P, Siriviriyakul P, Kulaputana O, **Patumraj S.**, Bunnag S.C., Futrakul N. A hemodynamically mediated mechanism of renal disease progression in severe glomerulonephritides or nephrosis. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press. 2003; 29: 183-8.*

21. Duansak D, Somboonwong J., **Patumraj S.** Effects of *Aloe vera* on leukocyte adhesion and TNF-alpha and IL-6 levels in burn wounded rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press. 2003; 29: 239-46.*
22. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotpaibulpan S, **Patumraj S.** The effect of long- term supplementation of vitamin C on pupal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation , IOS Press. 2003; 29: 313-20.*
23. Jariyapongskul A, **Patumraj S,** Niimi H. Cerebral endothelial dysfunction in diabetes: intravital microscopical analysis using streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation, IOS Press. 2003; 29: 331-5.*
24. Molsiri K, **Patumraj S,** Siriviriyakul P. Preventive mechanism of genistein on coronary endothelial dysfunction in ovariectomized rats : An isolated arrested heart model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.31 (2), 2004*
25. Chakraphan D, Sridulyakul P, Thipakorn B, Bunnag S.C, Huxley VA. **Patumraj S :** Attenuation of Endothelial Dysfunction by Exercise Training in STZ-Induced Diabetic Rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.32, 2005 :217-26.*
26. **Patumraj S,** Yoysungnoen P, Kachonrattanadet P., Wirachwong P. Tumor Neocapillary Density in hepatocellular carcinoma cells Implanted Nude Mice Model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.33, 2005 :137-44.*
27. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, **Patumraj S.** Antiangiogenic activity of curcumin in Hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.33, 2005 :127-36.*
28. Eamlamnam K, **Patumraj S,** Visedopas N, Thong-Ngam D. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. *World J Gastroenterology ISSN1007-9327 vol 12, 2006 : 2035-40.*
29. Prabjone R, Thong-Ngam D, Wisedopas N, Chatsuwana T, **Patumraj S.** Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* on leukocyte–endothelium interaction in the gastric microcirculation of *Helicobacter pylori*-infected rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.33, 2006 :9:56.*
30. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, **Patumraj S.** Effects of curcumin on tumor antiangiogenesis and biomarkers : COX-2 and VEGF *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.34, number 1,2, 2006 :109-16.*
31. Niimi H, **Patumraj S,** J.-Y.Han. Asian traditional medicine (ATM) : Recent progress based on scientific evidences. *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.34, number 1,2, 2006 : 85 - 8.*
32. Siriviriyakul P, Khemapech S., Monsiri K, **Patumraj S.** The vascular effect of genistein : What is its mechanism, nitric oxide or PGL₂? *Clinical Hemorheology and Microcirculation vol.34, number 1,2, 2006 : 97 – 101.*

33. Jariyapongskul A , **Patumraj S**, Niimi H. Effects of Yahom on the regional cerebral blood flow in rat using fluorescence videomicroscopy. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 139 – 44.
34. Futrakul N, Butthep P, **Patumraj S** , Siriviriyakul P, Futrakul P. Microvascular disease and endothelial dysfunction in chronic kidney disease : Therapeutic implication. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 265 – 71.
35. Jariyapongskul A , Rungjaroen T, Kasetsuwan N, **Patumraj S**, Niimi H. Chronic changes of the iris microvasculature of streptozotocin – induced diabetic rats using fluorescence videomicroscopy. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 283 - 93.
36. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotpaibulpan S, **Patumraj S**. Role of exercise training on pupal blood flow in diabetic rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 295 - 301.
37. Chanawirat A, Khemapech S, **Patumraj S**, Siriviriyakul P. Genistien replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 309 - 14.
38. Sridulyakul P, Chakraphan D, **Patumraj S**. Vitamin C supplementation could reverse diabetes-induced endothelial cell dysfunction in mesenteric microcirculation in STZ-rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* vol.34, number 1,2, 2006 : 315 - 21.
39. Jariyapongskul A , Rungjaroen T , Kasetsuwan N , **Patumraj S**, Seki J , Niimi H. Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats. *Microvasc Res.* 2007 Mar 23;174:677-47.
40. **Patumraj S**, Wongeakin N, Jariyapongskul A, Futrakul N, Bunnag S Combined effects of curcumin and vitamin C to protect endothelial dysfunction in the iris tissue of STZ-induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35:481-89.
41. Thaveeratitham P., Plengpanich W., Naen-Udorn W., **Patumraj S.**, Khovidhunkit W. Effects of human apolipoprotein A-I on endotoxin-induced leukocyte adhesion on endothelial cells *in vivo* and on the growth of *Escherichia coli in vitro* *J. Endotoxin. Research. Volume 13, Number 1 / 2007: 54-58.*
42. Thaveeratitham P., W. Khovidhunkit, **S. Patumraj.** High-density lipoproteins (HDL) inhibit endotoxin-induced leukocyte adhesion on endothelial cells in rats: Effect of the acute-phase HDL *Clinical Hemorheology and Microcirculation, Volume 36, Number 1 / 2007: 1 – 12.*
43. Chakraphan D., Sridulyakul P., Thipakorn B., Bunnag S., Virginia H., **Patumraj S.** Leukocyte-endothelial cell interaction is attenuated by low-intensity exercise training and vitamin C supplementation in diabetic rats. *Asian Biomed Journal.* 2007;1: 67-75.
44. **Patumraj S**, Yoosungneon P. *Review Article.* Curcumin as a therapeutic agent against cancer. *Asian Biomed Journal Vol. 1 No. 3 October 2007;239-52.*

45. Kasiyaphat A, Siriviriyakul P, **Patumraj S**. *Technical report*. A novel femur window chamber for *in vivo* studies of bone microcirculation. *Asian Biomed Journal Vol. 1 No. 3 October 2007*;301-305.
46. Duansak N, Yoysungnoen P, Somchaichana J, Bhattarakosol P, Wirachwong P, **Patumraj S**. Correlation between hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor expression under tumor neovascularization in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Asian Biomedicine*. 2007. Vol. 1 No. 4 December;399-406.
47. Kasiyaphat A., Siriviriyakul P, **Patumraj S**. Preventive effects of genistein on leukocyte adhesion in femur venules and on bone-loss induced in ovariectomized female rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*.38;4. 2008:235-43.
48. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Changtam C, Suksamrarn A, **Patumraj S**. Suppression of tumor neocapillarization induced by HepG2 cells in nude mice supplemented with curcumin or tetrahydrocurcumin: an *in vivo* comparative study. *Asian Biomedicine Vol. 2 No. 1 February 2008*;77-82.
49. Jariyapongskul A, **Patumraj S**, Suksamrarn, A. Long-term effect of tetrahydrocurcumin supplementation on cerebral blood flow and endothelial cells in streptozotocin- induced diabetic rats. *Asian Biomedicine*. 2008, vol. 2, no.2,151-5.
50. Sridulyakul P, Wongeak-in N, **Patumraj S**. Increased nitric oxide level in diabetic rats from vitamin C supplementation: an *in vivo* detection using diaminofluorescein. *Asian Biomedicine Vol. 2 No. 5 October 2008*;371-9.
51. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Changtam C, Suksamrarn A, **Patumraj S**. Anti- cancer and anti- angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J Gastroenterol*. 2008;14(13):2003-9.
52. Lertworapreecha M, **Patumraj S**, Niruthisard S, Hansasuta P, Bhattarakosol P. Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. *Indian J Exp Biol*. 2009;47:327-32.
53. Wongeakin N, Sridulyakul P, Jariyapongskul A, Suksamrarn A, **Patumraj S**. Effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on diabetes induced endothelial dysfunction. *African Journal of Biochemistry Research* 2009, Vol.3 (5):259-65.
54. Viboolvorakul S, Niimi H, Wongeak- in N, Eksakulkla S, **Patumraj S**. Increased Capillary Vascularity in the Femur of Aged Rats by Exercise Training. *Microvascular Research*., 2009 (78): 459–63.
55. Eksakulkla S, Suksom D, Siriviriyakul P, **Patumraj S**. Increased NO bioavailability in aging male rats by genistein and exercise training: using 4, 5-diaminofluorescein diacetate. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7: 93.
56. Rungseesantivanon S, Thenchaisri N, Ruangvejvorachai P, **Patumraj S**. Curcumin supplementation could improve diabetes-induced endothelial dysfunction associated with decreased vascular superoxide production

and PKC inhibition. *BMC Complementary and Alternative medicine* 2010; 10:57

<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/10/57>.

57. Rungseesantivanon S, Thenchaisri N, Ruangvejvorachai P, **Patumraj S**. Curcumin improves prostanoid ratio in diabetic mesenteric arteries associated with cyclooxygenase-2, and NF-kB suppression. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2010; 3; 421 – 9.

3. ผู้ร่วมโครงการ (ไทย) นายสมชาย นิรุทธิศาสตร์

(อังกฤษ) Mr. Somchai Niruthisard

ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์ 9

สถานที่ทำงาน ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ทำงาน ถนนพระรามสี่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 0-22564167

e-mail fmedsnr@md.chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.บ.	วิทยาศาสตร์การแพทย์	2519
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พบ.	แพทยศาสตร์	2521
แพทยสภา	วุฒิบัตร	สูติศาสตร์นรีเวชวิทยา	2525

ผลงานวิชาการ (ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 จนถึงปัจจุบัน)

1. Lertworapreecha M, Patumraj S, **Niruthisard S**, Hansasuta P, Bhattarakosol P Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. *Indian J Exp Biol.* 2009 May;47(5):327-32.
2. Tantbirojn P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, **Niruthisard S**. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in borderline ovarian tumors: an immunohistochemical study. *J Med Assoc Thai.* 2009 Mar;92(3):308-14.
3. Tantbirojn P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, **Niruthisard S**. Comparison between adenocarcinoma in both endocervical and endometrial specimens from fractional curettage and

- pathologic findings in subsequent hysterectomy specimens. *J Med Assoc Thai.* 2008 Sep;91(9):1313-7
4. Tantbirojn P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, **Niruthisard S.** Detection of PTEN immunoreactivity in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *J Med Assoc Thai.* 2008 Aug;91(8):1161-5.
 5. Sirayapiwat P, Suwajanakorn S, Triratanachat S, **Niruthisard S.** The effects of GnRH antagonist on the endometrium of normally menstruating women. *J Assist Reprod Genet.* 2007 Dec;24(12):579-86.
 6. Manchana T, Sirisabya N, Triratanachat S, **Niruthisard S,** Tannirandom Y. Pyomyoma in a perimenopausal woman with intrauterine device. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;63(3):170-2.
 7. Triratanachat S, **Niruthisard S,** Trivijitsilp P, Tresukosol D, Jarurak N. Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and early-staged uterine cervical squamous cell carcinoma: clinical significance. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Mar-Apr;16(2):575-80.
 8. Kitkumthorn N, Yanatatsanajit P, Kiatpongsan S, Phokaew C, Triratanachat S, Trivijitsilp P, Termrungruenglert W, Tresukosol D, **Niruthisard S,** Mutirangura A. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. *BMC Cancer.* 2006 Mar 8;6:55.
 9. Kiatpongsan S, **Niruthisard S,** Mutirangura A, Trivijitsilp P, Vasuratna A, Chaithongwongwatthana S, Lertkhachonsuk R. Role of human papillomavirus DNA testing in management of women with atypical squamous cells of undetermined significance. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Jan-Feb;16(1):262-5.
 10. Bhattarakosol P, Lertworapreecha M, Kitkumthorn N, Triratanachai S, **Niruthisard S.** Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women. *J Med Assoc Thai.* 2002 Jun;85 Suppl 1:S360-5
 11. Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruenglert W, Voravud N, **Niruthisard S,** Mutirangura A. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC Cancer.* 2001;1:2.

12. Limpiboon T, Pooart J, Bhattarakosol P, **Niruthisard S**, Chantratita W, Lulitanond V. p53 status and human papillomavirus infection in Thai women with cervical carcinoma. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2000 Mar;31(1):66-71.
13. Lertworapreecha M, Bhattarakosol P, **Niruthisard S**. Detection and typing of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia grade III in Thai women. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1998 Sep;29(3):507-11.
14. Reinprayoon D, Taneepanichskul S, **Niruthisard S**, Suwajanakon S. Uterine histopathologic changes after Cu-Fix intrauterine device insertion. *Contraception*. 1999 Jan;59(1):63-5
15. Charuruks N, Voravud N, Termrungruanglert W, Lertsanguansinchai P, Tresukosol D, **Niruthisard S**, Sirisabya N. 13-cis-retinoic acid and interferon-alpha 2a therapy in locally advanced squamous cell carcinoma of the cervix: p53 alteration, proliferating cell nuclear antigen expression and angiogenesis response. *J Obstet Gynaecol Res*. 1998 Oct;24(5):335-41.
16. Mutirangura A, Sriuranpong V, Termrungruanglert W, Tresukosol D, Lertsanguansinchai P, Voravud N, **Niruthisard S**. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions. *Br J Cancer*. 1998 Oct;78(7):933-9
17. Van Damme L, **Niruthisard S**, Atisook R, Boer K, Dally L, Laga M, Lange JM, Karam M, Perriens JH. Safety evaluation of nonoxynol-9 gel in women at low risk of HIV infection. *AIDS*. 1998 Mar 5;12(4):433-7.
18. Bhattarakosol P, Poonnanti A, **Niruthisard S**. Detection and typing of human papillomavirus in cervical cancer in the Thai. *J Med Assoc Thai*. 1996 Dec;79 Suppl 1:S56-64.
19. Hemachudha T, Niruthisard S, Sirivichayakul S, Chomchey P, Wilde H. HTLV-1 has reached Thailand via a heterosexual route. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1992 Jul-Aug;86(4):434.
20. **Niruthisard S**, Roddy RE, Chutivongse S. Use of nonoxynol-9 and reduction in rate of gonococcal and chlamydial cervical infections. *Lancet*. 1992 Jun 6;339(8806):1371-5.
21. **Niruthisard S**, Trisukosol D. Male sexual behavior as risk factor in cervical cancer. *J Med Assoc Thai*. 1991 Nov;74(11):507-12.
22. **Niruthisard S**, Roddy RE, Chutivongse S. The effects of frequent nonoxynol-9 use on the vaginal and cervical mucosa. *Sex Transm Dis*. 1991 Jul-Sep;18(3):176-9.

4. ผู้ร่วมโครงการ (ไทย) นายปกรัฐ หังสสุต

(อังกฤษ) Mr. Pokrath Hansasuta

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ 7

สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ทำงาน ถนนพระรามสี่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 0-22528181 ต่อ 3628 โทรสาร 0-22525952

e-mail fmedphs@md.chula.ac.th, pokrath.h@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพ.ศ. ที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	สัตววิทยา	๒๕๓๑
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	๒๕๓๖
University of Oxford	Doctor of Philosophy*	Clinical Medicine	๒๕๔๔

**Under supervision of Professor S.L. Rowland-Jones*

ผลงานวิชาการ

- Hansasuta, P**, Suebsing R, , Trivijitsilp, P and Bhattarakosol P Variation of HPV E5, E6 and E7 in Thai patients with HPV infection. (Manuscript in preparation)
- Hansasuta P**, Incomserb P, Bhattarakosol P, Buranapraditkul S, Ruxrungtham K, and Rickinson A. Detection of EBV-specific CD8+ T cell responses in HIV-infected patients. (Manuscript in preparation)
- Hansasuta P**, Buranapraditkul S, Ruxrungtham K, and Rowland-Jones SL. Synthesis of HLA-A*1101-QVPL tetrameric complexes for monitoring T cell responses in Thai patients. (Manuscript in preparation)
- Hansasuta P**, Buranapraditkul S, Sanruk J, Hanke T, McNicholl J, de Groot A, Phanuphak P, McMichael AJ, Ruxrungtham K, and Rowland-Jones SL. Cross clade HIV-specific CD8+ T cell responses in Thai patients. (Manuscript in preparation)
- Spina C[♣], **Hansasuta P[♣]**, Wong J, Ogg G, Little SD, Havlir D, Richman DD, and Rowland-Jones SL. Predominance of nef-specific CD8 cell responses in acute HIV infection and persistence of HIV-specific CD8 memory cells during viral suppression. (Manuscript in preparation)

[♣] *Joint first author*

6. Carla A. Herberts, Assan Jaye, Jacqueline van Gaans-van den Brink, Martien C.M. Poelen, Claire J. Boog, **Pokrath Hansasuta**, Peter Hoogerhout, Sarah Rowland-Jones, Rob van Binnendijk, Hilton Whittle, Cécile A.C.M. van Els. Ex vivo analysis of measles virus epitope specific CD8+ T cells in peripheral blood using IFN γ ELISPOT and MHC-tetramers. (Manuscript in preparation)
7. Incomserb P, Bhattarakosol P, Kulwichit W, Chantratita and **Hansasuta P**. Establishment of Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Assay for Quantitation of Epstein-Barr Virus DNA in Healthy Donors and in Patients with EBV Associated Lymphoma. *J Med Assoc Thai* 2005; 88(Suppl4): S280-6.
8. Tuksinvaracharn R, Tanayapong P, Pongrattanaman S, **Hansasuta P**, Bhattarakosol P and Siriyasatien P. Prevalence of Dengue Virus in Aedes Mosquitoes by Semi-nested Polymerase Chain Reaction (Semi-nested PCR). *J Med Assoc Thai* 2004; 87(Suppl2): S129-33.
9. **Hansasuta P**, Incomserb P, Buranapraditkun S and Bhattarakosol P. Establishment of Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Autologous Epstein-Barr Virus in HIV-infected Patients: The Feasibility Study of EBV-specific immunotherapy for Patients With EBV-associated Lymphoma. *J Med Assoc Thai* 2004; 87(Suppl2): S146-51.
10. **Hansasuta P**, Dong T, Thananchai H, Weekes M, Willberg C, Aldemir H, et al. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol* 2004;34(6):1673-9.
11. Appay V, Papagno L, Spina CA, **Hansasuta P**, King A, Jones L, et al. Dynamics of T cell responses in HIV infection. *J Immunol* 2002;168(7):3660-6.
12. Appay V, **Hansasuta P**, Sutton J, Schrier RD, Wong JK, Furtado M, et al. Persistent HIV-1-specific cellular responses despite prolonged therapeutic viral suppression. *Aids* 2002;16(2):161-70.
13. **Hansasuta P** and Rowland-Jones, SL. HIV-1 infection and acute HIV-1 infection. *British Medical Bulletin* 2001;58:109-27.
14. Rowland-Jones SL, Pinheiro S, Kaul R, **Hansasuta P**, Gillespie G, Dong T, Plummer FA, Bwayo JB, Fidler S, Weber J, McMichael A, Appay V. How important is the 'quality' of the cytotoxic T Lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection? *Immunol Lett.* 2001 Nov 1;79(1-2):15-20.

15. **Hansasuta, P** and Rowland-Jones, S.L. What makes some people resistant to HIV infection? *Current Medical Literature-Infectious Diseases* 2000;14:85-91.
16. Rowland-Jones SL, Dong T, Dorrell L, Ogg G, **Hansasuta P**, Krausa P, Kimani J, Sabally S, Ariyoshi K, Oyugi J, MacDonald KS, Bwayo J, Whittle H, Plummer FA, McMichael AJ. Broadly cross-reactive HIV-specific cytotoxic T-lymphocytes in highly-exposed persistently seronegative donors. *Immunol Lett.* 1999 Mar;66(1-3):9-14.
17. Tan R, Xu X, Ogg GS, **Hansasuta P**, Dong T, Rostron T, Luzzi G, Conlon CP, Screaton GR, McMichael AJ, Rowland-Jones S. Rapid death of adoptively transferred T cells in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood.* 1999 Mar 1;93(5):1506-10.
18. Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, **Hansasuta P**, O'Callaghan CA, Rowland-Jones S, McMichael AJ, Rickenson AB, Callan MF. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol.* 1999 Feb 1; 162(3):1827-35.
19. Ogg GS, Dong T, **Hansasuta P**, Dorrell L, Clarke J, Coker R, Luzzi G, Conlon C, McMichael AP, Rowland-Jones S. Four novel cytotoxic T-lymphocyte epitopes in the highly conserved major homology region of HIV-1 Gag, restricted through B*4402, B*1801, A*2601, B*70 (B*1509) *AIDS.* 1998 Aug 20;12(12):1561-3.

5. ผู้ร่วมโครงการ (ไทย) นายมณฑล เลิศวรปรีชา

(อังกฤษ) Mr. Monthon Lertworapreecha

ตำแหน่ง อาจารย์ 5

สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

ที่อยู่ทำงาน ต.เขารูปช้าง อ. เมือง จ.สงขลา 90000

โทรศัพท์ 0-65004120

e-mail monthon@tsu.ac.th, worapreecha@yahoo.com

ประวัติการศึกษา:

คุณวุฒิ	ปีค.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษา
B.Sc. Animal Health Science	1994	Rajamangala Institute of Technology
M.Sc. Medical Microbiology	1998	Chulalongkorn University

ผลงานวิชาการ

1. Bhattarakosol P., A. Poonnaniti , **M. Lertworapreecha** and S. Niruthisard. Human papilloma virus infection in CIN III and cervical cancer in Thai woman. ICMR Annals, Kobe, Japan, 1997.
2. **Lertworapreecha M.**, P. Bhattarakosol, and S. Niruthisard. Detection and typing of human pillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia grade III in Thai women. Southeast Asian J Trop Med Public Health, Sep 1998; 29(3): 507-11.
3. Bhattarakosol P., **M. Lertworapreecha**, N. Kitkumthorn, S. Triratanachai, and S. Niruthisard. Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women. J Med Assoc Thai, Jun 2002; 85 Suppl 1: S360-5.
4. Chalermchaikit T., **M. Lertworapreecha**, J. Sasipreeyajan, S. Lueangyoslurchakul, P. Assawacheep, S. Wattanapunsk, T. Kiensaew, and K. Poossiri. Prevalence of Antimicrobial Resistance of Salmonella in chickens and pigs in Thailand : Reflection of the Overuse of Antimicrobial Drugs. International Conference on Emerging Infectious Disease 2002,Atlanta, USA. 24-27 March 2002.
5. Chalermchakit T., K. Poonsook, K. Dangprom, **M. Lertworapreecha** and K. Jotisakulratana Efficiency of Antimicrobial Residue Screening Test Kit for Meat “CM-Test” Agricultural Sci. J. 2002; 33 : 6 (Suppl) 336-379.
6. Jareporn N., C. Bantaokul,N. Tipmongkolsilp, **M. Lertworapreecha**, J. Wongtavachai. Antimicrobial susceptibility test on Vibrio pathogens from Black Tiger Shrimp *Penaeus Monodon*. Thai J. Vet. Med. June 2003; 33(2) 71-78.
7. Aarestrup F. M., **M. Lertworapreecha**, M. C. Evans, A. Bangtrakulnonth, T. Chalermchaikit, R.S.H., H.C. Wegener. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. J. Antimicrob. Chemother. 2003 52, 715-718.
8. **Lertworapreecha, M.**, Thammachotruja, L., Bhattarakosol, P. Prevalence and distribution of HPV type in Thai women. Chula. Med. J. 2008; 52:161-7.
9. **Lertworapreecha, M.**, Patumraj, S., Niruthisard, S., Hansasuta, P., Bhattarakosol, P. Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. Indian. J. Exp. Biol. 2009;47:327-32.