

## บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบได้ เป็นอันดับต้นๆ ในสตรีทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งรวมประเทศไทยด้วย จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (1) มะเร็งปากมดลูกจัดเป็นมะเร็งอันดับหนึ่งที่พบได้ในผู้หญิงไทย ซึ่งนับว่าเป็น โรคที่ก่อปัญหาทางสาธารณสุขและส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ จากรายงานการศึกษาถึงสาเหตุ ของมะเร็งปากมดลูกจำนวนมากทั่วโลก (2,3,4,5) มีข้อมูลที่ได้รับการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์อย่างชัดเจนว่าสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูกเกิดจากการติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) ซึ่งจัดเป็นเชื้อไวรัสที่สามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ (Sexual transmitted disease) HPV เป็นไวรัสใน 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 มีโอกาสพัฒนาเป็นเป็นมะเร็งได้น้อย สายพันธุ์ที่สำคัญในกลุ่มนี้ เช่น HPV 6 และ 11
2. High risk HPV type การติดเชื้อไวรัสในกลุ่มนี้จะมีการโอกาสพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้สูง เชื้อสายพันธุ์ที่สำคัญที่พบมีกระบาดในประเทศไทย เช่น HPV-16 และ HPV - 18

กลไกสำคัญที่ทำให้เกิดมะเร็ง พบว่าสารพันธุกรรมของไวรัสสามารถสอดแทรกเข้าไปในพันธุกรรมของเซลล์เจ้าบ้าน การสอดแทรกนี้มีผลทำให้มีการสร้างโปรตีน 2 ชนิดออกมาจำนวนมากคือ 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 เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา พบว่าระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายก็มีการตอบสนอง แต่แตกต่างกันไปในแต่ละบุคคล ในผู้หญิงส่วนมากหลังการติดเชื้อไวรัสแปปิโลมาพบว่าร่างกายสามารถกำจัดไวรัสออกไปได้เองภายใน 6 เดือน แต่ก็มีส่วนหนึ่งที่ไม่สามารถกำจัดไปได้ และทำให้เกิดภาวะการติดเชื้อระยะยาว ซึ่งกลุ่มนี้จะมีโอกาสเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ แอนติบอดีที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อที่เรียกว่า Neutralizing antibody ซึ่งจำเพาะต่อส่วนของ L1 นั้น มีรายงานว่ามียับยั้งบทบาทสำคัญในการควบคุมไวรัสและลดความเสี่ยงของการพัฒนาเซลล์ติดเชื้อเป็นเซลล์มะเร็ง (9) การตอบสนองของเซลล์ในการทำลายสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะ มีรายงานบทบาทของ cytotoxic T lymphocyte (CTL) ที่จำเพาะต่อไวรัสแปปิโลมา 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 ซึ่งผลการศึกษาเหล่านี้นำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันบำบัด (immunotherapy) แต่ปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและวิธีในการรักษามะเร็งโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันบำบัด คือ โมเดลที่จะใช้ในการศึกษาในสัตว์ทดลอง ทั้งนี้เป็นเพราะว่า เชื้อ HPV เป็น ไวรัสที่ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงใน 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 ดังนั้นการวัดผลที่ได้จากการศึกษาอาจทำให้เกิดมีความคลาดเคลื่อนจากความ เป็นจริงไปได้

ดังนั้น วัตถุประสงค์สำคัญในการศึกษานี้เพื่อ พัฒนาโมเดลสัตว์ทดลอง โดยการปลูกถ่าย เซลล์มะเร็งปากมดลูกที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาวิธีการรักษาโดยวิธี ภูมิคุ้มกันบำบัด

## วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

### วัตถุประสงค์หลัก

1. เพื่อพัฒนาการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกของคนในสัตว์ทดลอง
2. เพื่อศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (T cell) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกใน สัตว์ทดลอง

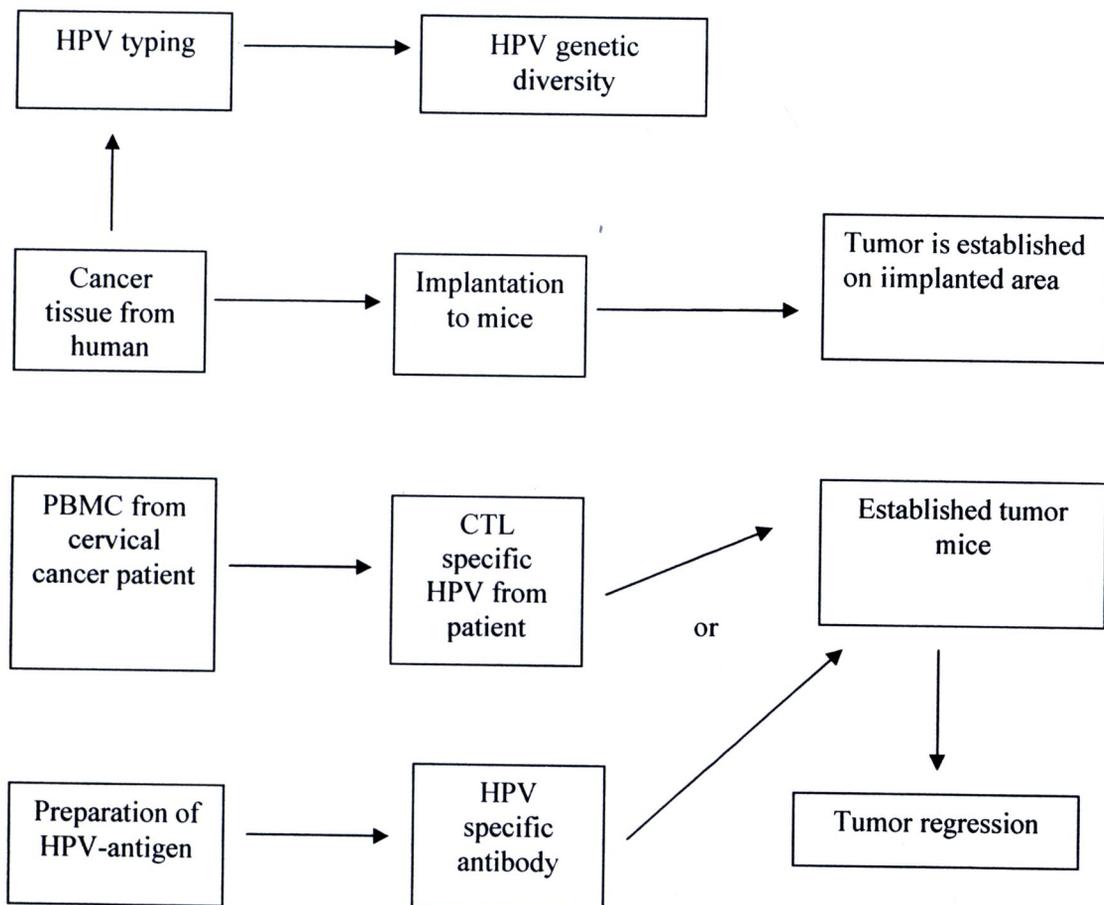
### วัตถุประสงค์รอง

1. สามารถเตรียมแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัย ทางห้องปฏิบัติการ

## ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการศึกษานี้ จะใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือดจากผู้ป่วยเฉพาะที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์เท่านั้น การทดลองในสัตว์ จะทำที่ศูนย์สัตว์ทดลอง ดิศริรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โดยส่ง สัตว์ทดลองจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา การวิจัยนี้จะเริ่มดำเนินการหลังจากผ่านการ พิจารณาจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ 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 สูงไม่พบว่ามี การติดเชื้อไวรัสข้ามสายพันธุ์ (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 โมเดลสำคัญที่ทำให้สามารถนำมาใช้ศึกษาพยาธิกำเนิดของโรคได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาโดยการใช้เนื้อเยื่อของหู 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 ซึ่งอาจจะมีความแตกต่างไปจากเซลล์มะเร็งที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง หรือการใช้ HPV ที่เป็น low risk ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่น้อย ในขณะที่บางการศึกษาใช้เซลล์ปกติที่ถูก transformed ด้วยโปรตีนของ HPV เหล่านี้อาจทำให้ผลการศึกษานั้นมีความคลาดเคลื่อนไปได้ เมื่อเทียบกับการใช้เซลล์มะเร็งที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยตรง นำมาปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง ซึ่งปัจจุบันยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อน ดังนั้นหากสามารถพัฒนาโมเดลนี้ได้ จะทำให้สามารถทำการศึกษาทั้งทางด้านพยาธิกำเนิด และ การรักษา หรือการทดสอบวัคซีน ได้ผลน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

### 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 ดิถีสรีรวิทยา 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

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

#### การจัดการสัตว์ทดลองหลังสิ้นสุดการศึกษา

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

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดลิตธิ์บัตร์ ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

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