

ผลการวิจัย

ส่วนที่ 1

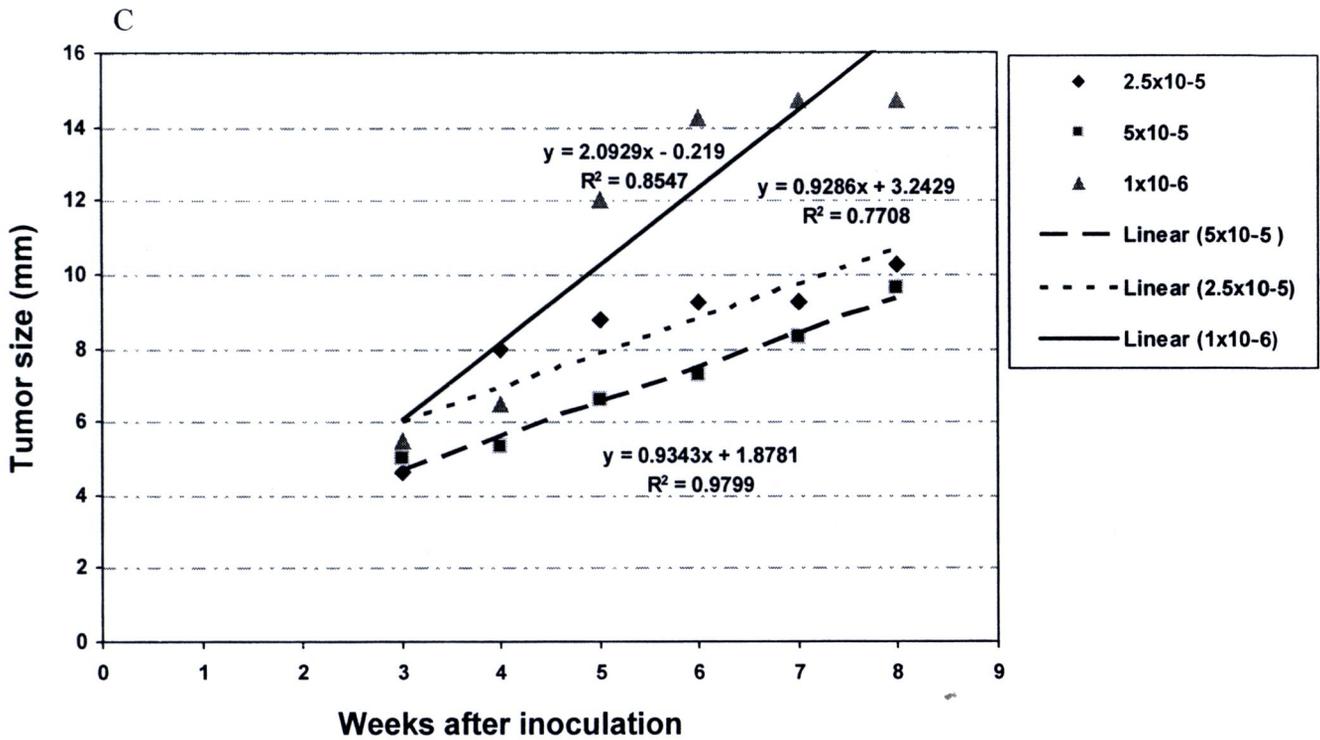
การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองโดยการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกของคนในสัตว์ทดลอง

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

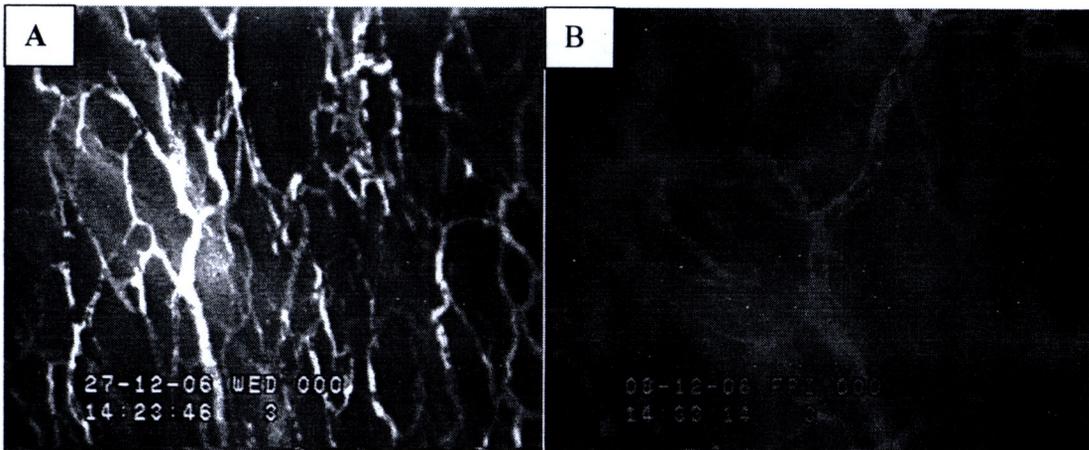
No. HeLa cells No of mice with tumor (%)		Week (s) after implantation								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
2.5×10^5 4/5 (80)	Size (mm)	0	0	0	4.6 ± 1.70	8.0 ± 2.30	8.75 ± 1.5	9.25 ± 1.5	9.25 ± 1.5	10.25 ± 2.87
	Body weight (g)	23.24 ± 1.61	24.06 ± 0.64	24.26 ± 0.42	25.32 ± 1.23	26.16 ± 1.31	25.84 ± 1.24	25.82 ± 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) ลักษณะของหนูที่เกิดตุ่มนูนคล้าย papillomatosis บริเวณที่มีการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง (C) กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ HeLa ที่ปลูกถ่าย ขนาดของก้อนเนื้อและระยะเวลา

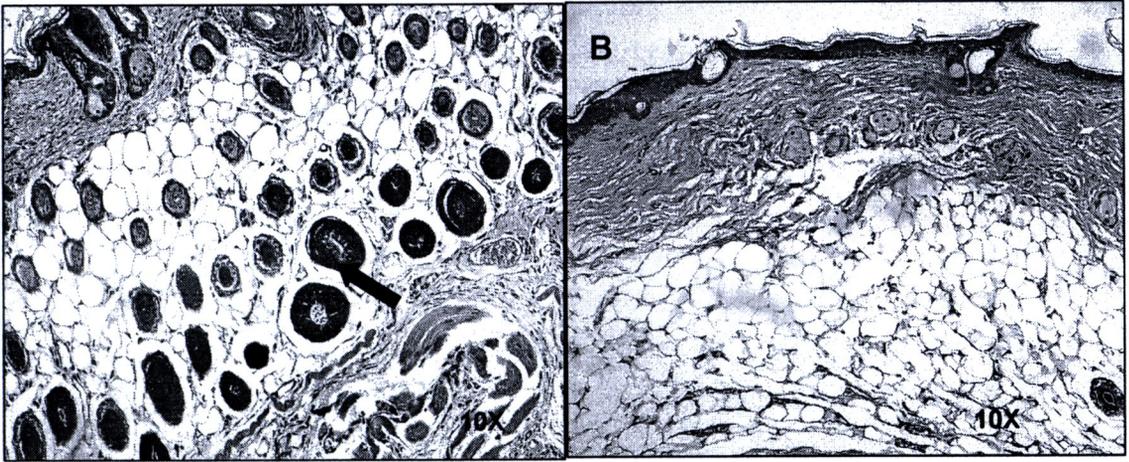
2. การตรวจดูการเพิ่มขึ้นของหลอดเลือด

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)

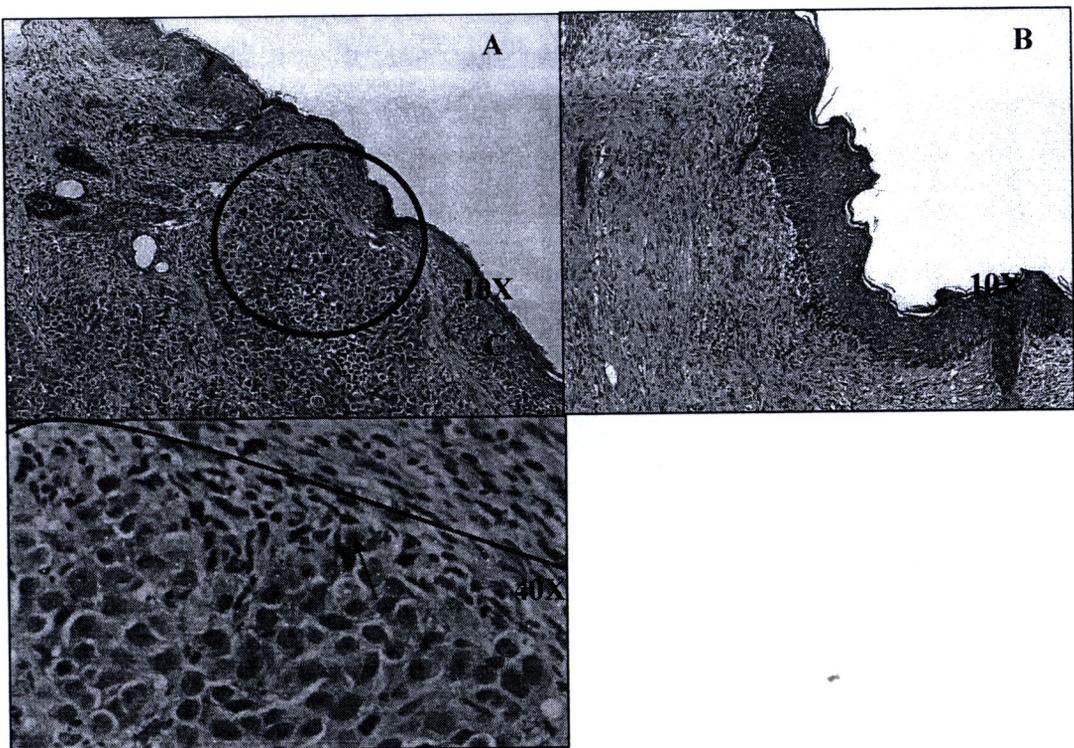


รูปที่ 4 ลักษณะทางเซลล์วิทยาที่พบการเพิ่มขึ้นของเส้นเลือดในชั้นเนื้อของหนูที่ทำการศึกษา

- 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)



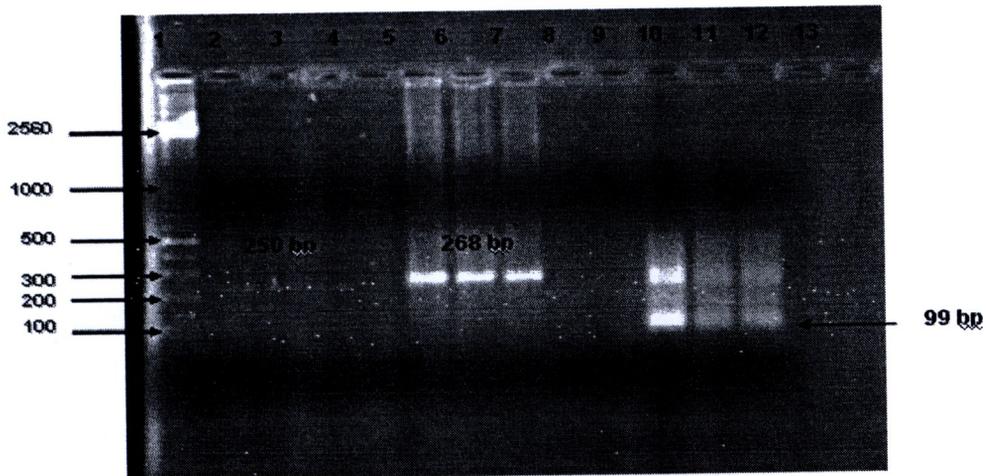
รูปที่ 5 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในหนูทดลอง

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

4. การตรวจหาสารพันธุกรรมไวรัสแปปิโลมาในก้อนเนื้อ

เพื่อยืนยันว่าบริเวณที่มีพยาธิสภาพก้อนเนื้อนั้นเกิดจากเซลล์ HeLa ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบ ยืนยัน 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 จากบริเวณรอยโรคที่ได้จากเนื้อเยื่อหนูที่ได้รับ การ 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)

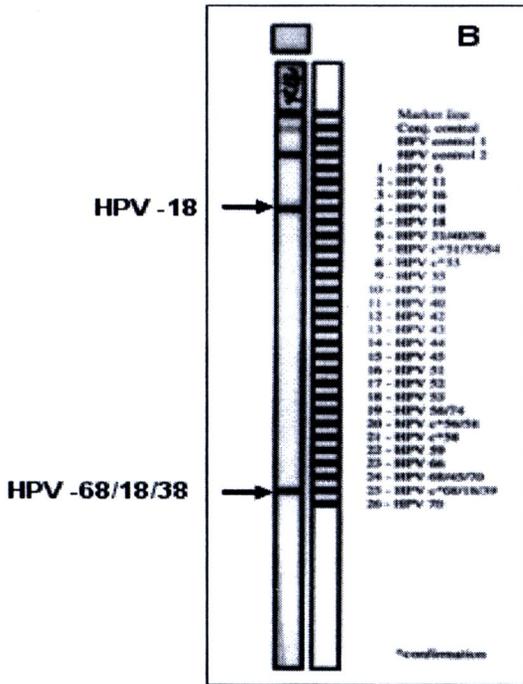
Lane 10. HeLa DNA (GAPDH- primers)

Lane 11. X4 DNA (GAPDH- primers)

Lane 12. X5 DNA (GAPDA- primers)

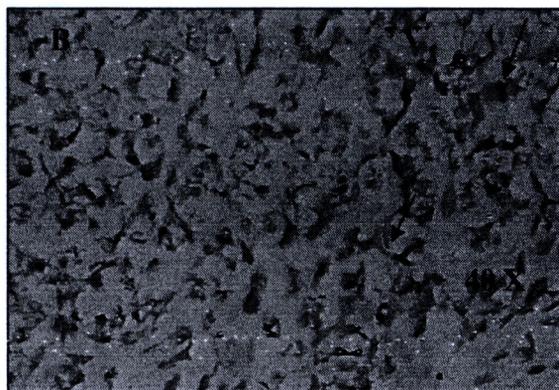
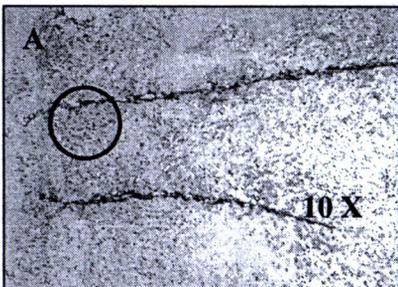
Lane 13. Normal mouse DNA (GAPDH- primers)

เมื่อตรวจจำแนกไทป์พบเป็น HPV type 18 ซึ่งสอดคล้องกับไทป์ของ HPV ที่สอดแทรกอยู่ในโครโมโซม ของเซลล์ 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

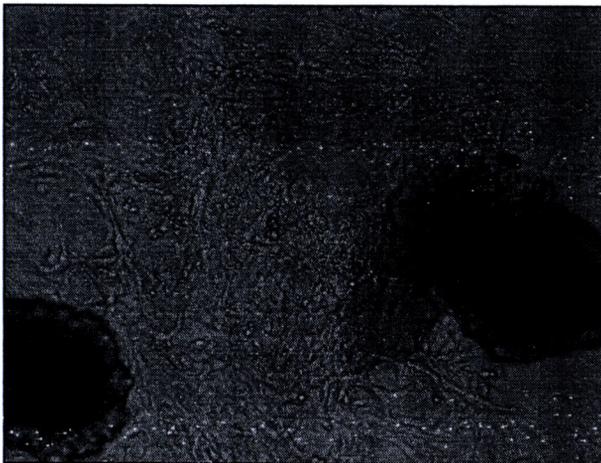
- A. บริเวณที่ตรวจพบเซลล์ที่มีสารพันธุกรรม HPV-18 กำลังขยาย 10X
- B. ภาพขยายแสดงเซลล์ที่ให้ผลบวกจะติดสีน้ำตาลภายในนิวเคลียส (ลูกศร) กำลังขยาย 40X

5. การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งจากผู้ป่วย

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้เซลล์มะเร็งที่แยกได้จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกทำการปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง จึงได้ทดลองนำเซลล์จากผู้ป่วยมาทำการเพาะเลี้ยงและปลูกถ่ายลงในสัตว์ทดลอง

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

ได้พยายามที่จะเพาะแยกเซลล์มะเร็งปากมดลูกจากเนื้อเยื่อผู้ป่วยโดยตรงต่อไปอีก แต่ก็ไม่ประสบผลสำเร็จ จึงได้ตัดสินใจล้มเลิกการใช้เซลล์มะเร็งโดยตรงจากผู้ป่วย และใช้เซลล์ HeLa แทนในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 8 เซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงได้จากเซลล์ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก

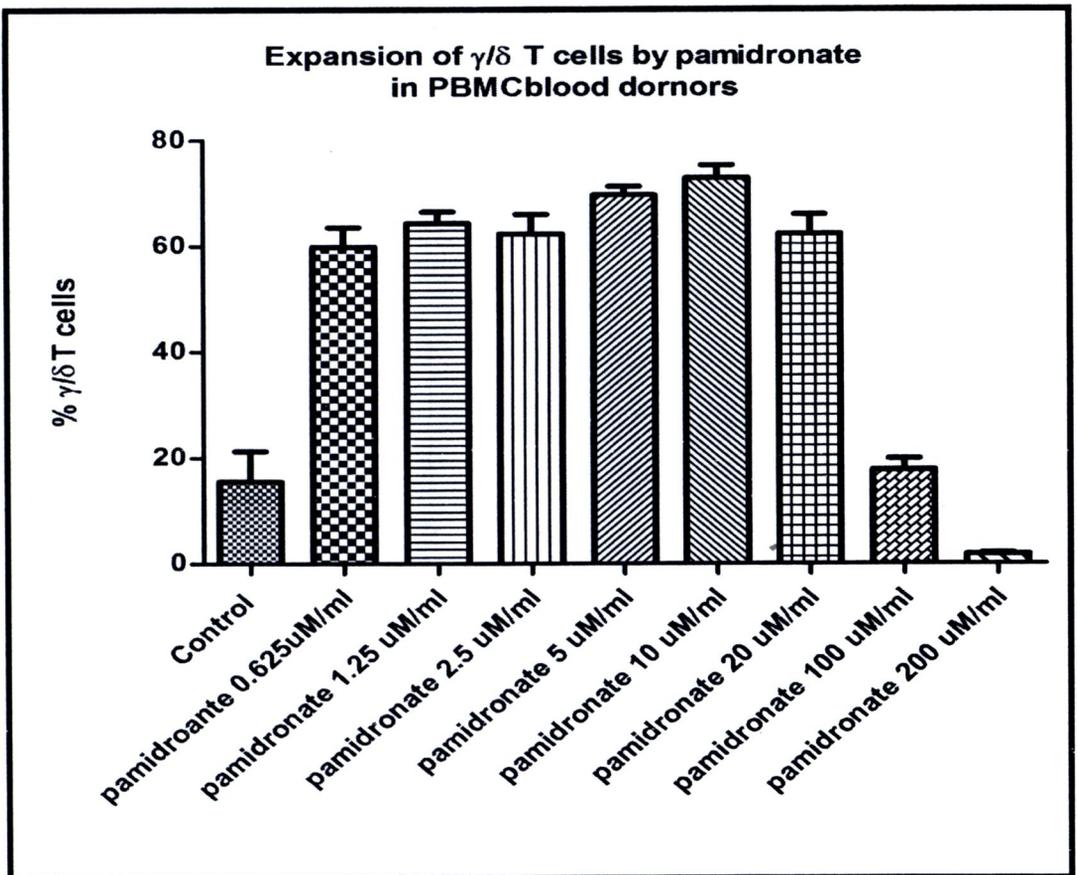
ส่วนที่ 2

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

1. การเตรียมเซลล์แกมมาเดลตาทีเซลล์ (gamma/delta T cell)

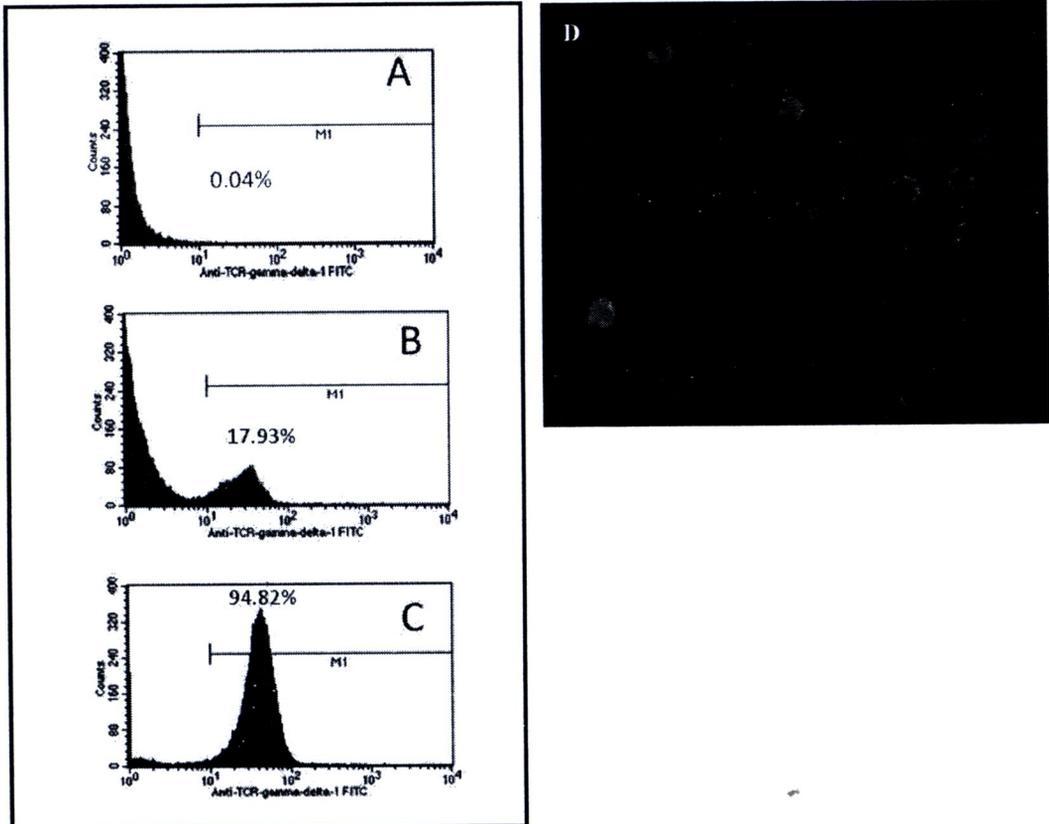
1.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ pamidronate ในการกระตุ้นแกมมาเดลตาทีเซลล์

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)

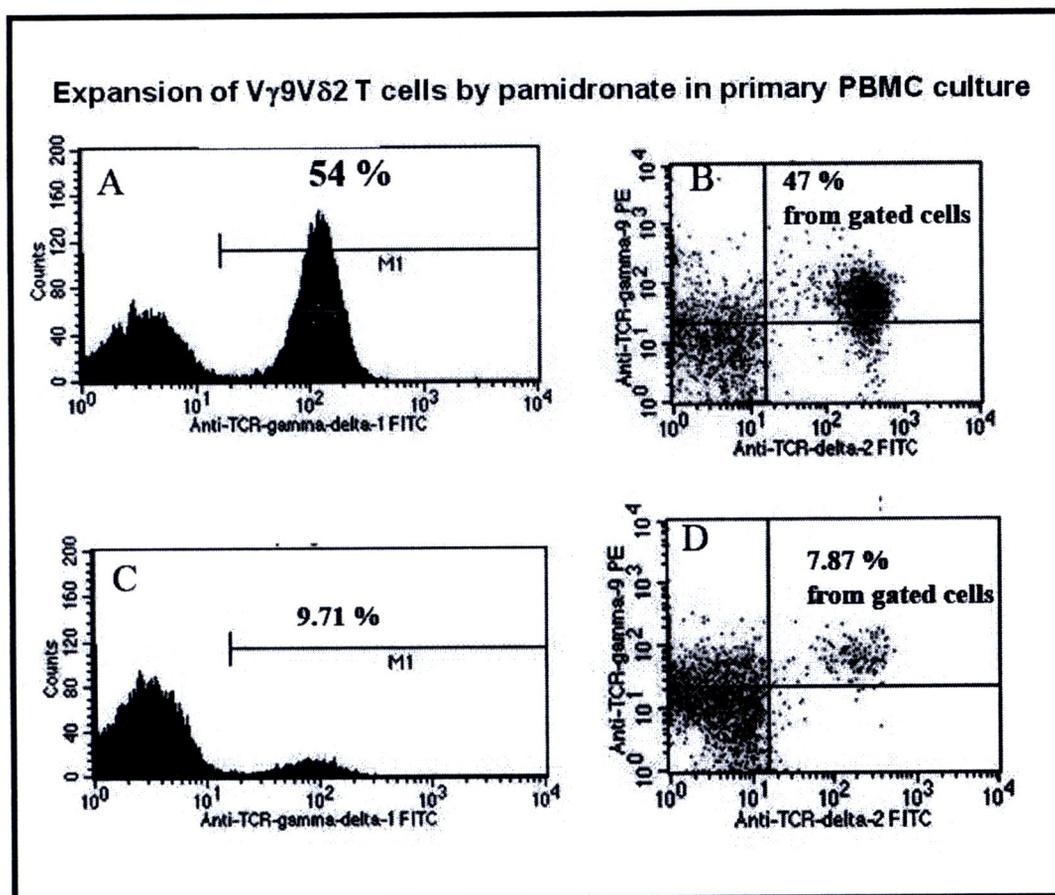


รูปที่ 9 ปริมาณร้อยละของแกมมาเดลตาทีเซลล์หลังจากการกระตุ้น PBMC ด้วย pamidronate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

1.2 ปริมาณแกมมาเดลตาทีเซลล์บริสุทธิ์ หลังจากกระตุ้นเซลล์ PBMC ใวนาน 14 วัน จึงนำมาทำการแยกแกมมาเดลตาทีเซลล์ ซึ่งผลของการทำให้บริสุทธิ์พบว่ามากถึงร้อยละ 90 (รูปที่ 10) และประชากรส่วนใหญ่ (ร้อยละ 87) ของแกมมาเดลตาทีเซลล์ที่แยกได้เป็น $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ 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 ผลการตรวจเกมมาเซลล์ที่เซลล์ที่ทำให้บริสุทธิ์และเชื่อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะชนิดต่าง ๆ ด้วย Flow cytometry

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

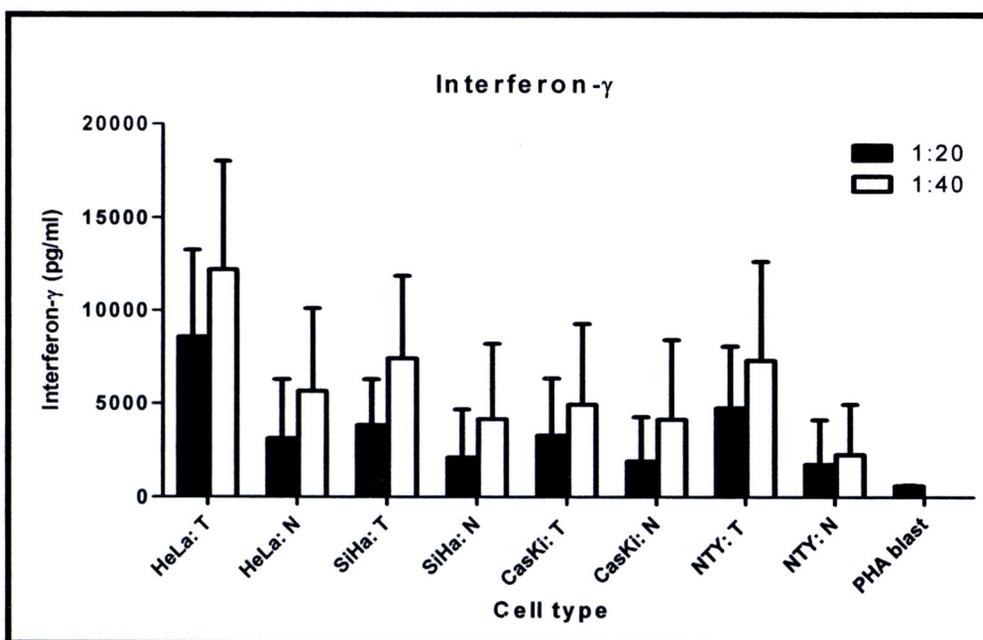
2. ความสามารถของแกมมาเดลตาทีเซลล์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูก นำแกมมาเดลตาทีเซลล์บริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีสารพันธุกรรมของไวรัสเปปปีโลมา สามชนิด คือ HeLa; HPV-18, SiHa; HPV-16 และ CaSki; HPV16 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 10 μ M/ml of pamidronate นาน 5 วันก่อนนำมาใช้ และไม่ได้รับการกระตุ้น ในอัตราส่วน 20:1 และ 40:1 ผลของแกมมาเดลตาทีเซลล์ของผู้บริจาคโลหิตจำนวน 5 คนให้ผลดังตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า แกมมาเดลตาทีเซลล์สามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสามชนิดได้ แต่ประสิทธิภาพในการทำลายแตกต่างกัน แกมมาเดลตาทีเซลล์สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ผ่านการกระตุ้นด้วย 10 μ M/ml of pamidronate ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งที่ไม่ได้รับการกระตุ้น เซลล์ที่ถูกทำลายได้ดีที่สุดคือ HeLa ตามด้วย SiHa และ CaSki อัตราส่วนแกมมาเดลตาทีเซลล์ต่อเซลล์มะเร็ง 40:1 มีประสิทธิภาพในการทำลายสูงกว่า 20:1 และมีความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นและไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยแกมมาเดลตาทีเซลล์

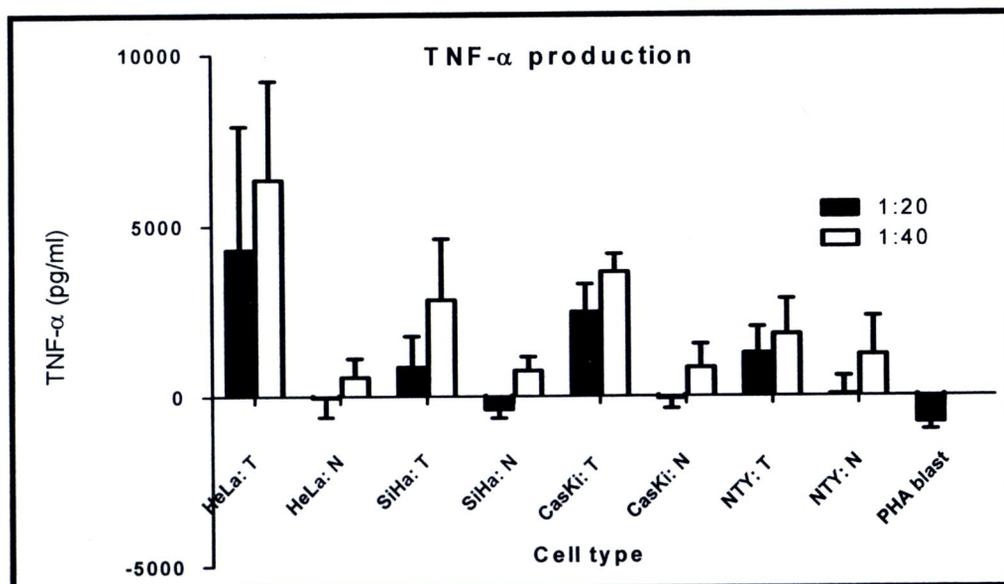
% Cytotoxicity (Mean \pm SD)				
Cells	E:T = 20:1	<i>P</i> value	E:T = 40:1	<i>P</i> value
HeLa: Treated	40.70 \pm 10.80	0.0041	51.52 \pm 16.56	NS
HeLa: Non-treat	20.38 \pm 11.31		34.85 \pm 13.52	
SiHa: Treated	31.31 \pm 15.49	NS	49.31 \pm 16.80	0.0038
SiHa: Non-treat	20.81 \pm 10.71		31.46 \pm 11.12	
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 แกมมาเดลตาทีเซลล์นอกจากสามารถทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกแล้ว ยังสามารถทำลายเซลล์ปกติ (NTY) ได้ด้วย แต่ไม่สามารถทำลายหรือฆ่าเซลล์ของผู้บริจาคโลหิตที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PHA (autologous cells)

3. การหลั่งไซโตไคน์จากแกมมาเซลล์ที่เซลล์ เพื่อเข้าใจกลไกในการฆ่าเซลล์มะเร็งของแกมมาเซลล์ที่เซลล์ จึงศึกษาความสามารถในการหลั่งไซโตไคน์ว่าเหมือนกับขบวนการฆ่าเซลล์ของ cytotoxic T cells อื่น ๆ หรือไม่ ผลการตรวจพบว่าเป็นปฏิกิริยาทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกของแกมมาเซลล์ที่เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 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) ที่หลั่งหลังจากแกมมาเซลล์ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง NYT และ autologous PHA blast ในอัตราส่วน 20:1 และ 40:1 ผลการทดลองมาจากการทำ 5 ครั้ง

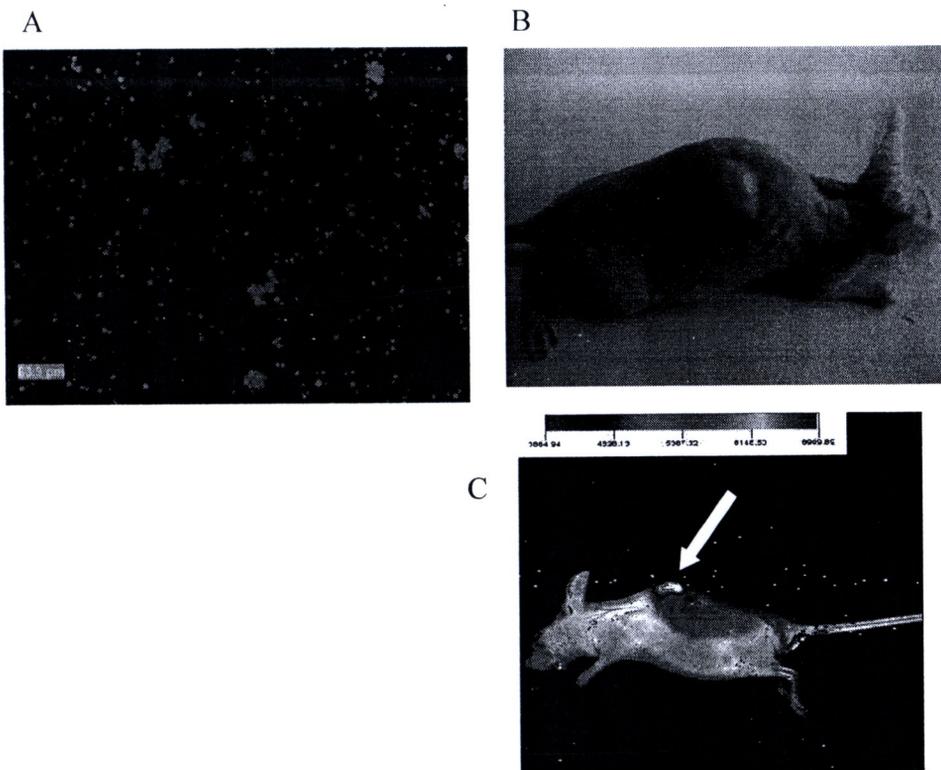


รูปที่ 13 ค่าเฉลี่ยปริมาณไซโตไคน์ TNF α (pg/ml, \pm SD) ที่หลั่งหลังจากแกมมาเคลตาทีเซลล์ทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง NYT และ autologous PHA blast ในอัตราส่วน 20:1 และ 40:1 ผลการทดลองมาจากการทำ 5 ครั้ง

4. การแสดงออกของ CD107 เพื่อพิสูจน์ว่าการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกของแกมมาเคลตาทีเซลล์ กระตุ้นผ่าน CD107 บนผิวแกมมาเคลตาทีเซลล์ ดังนั้นหลังทำปฏิกิริยาระหว่างเซลล์มะเร็งและแกมมาเคลตาทีเซลล์ ทำการย้อมเซลล์แกมมาเคลตาทีเซลล์ด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ CD107 และตรวจนับด้วย flow cytometry พบว่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสามชนิดที่ได้รับการกระตุ้นด้วย pamidronate สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ CD107 บนผิวแกมมาเคลตาทีเซลล์ 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

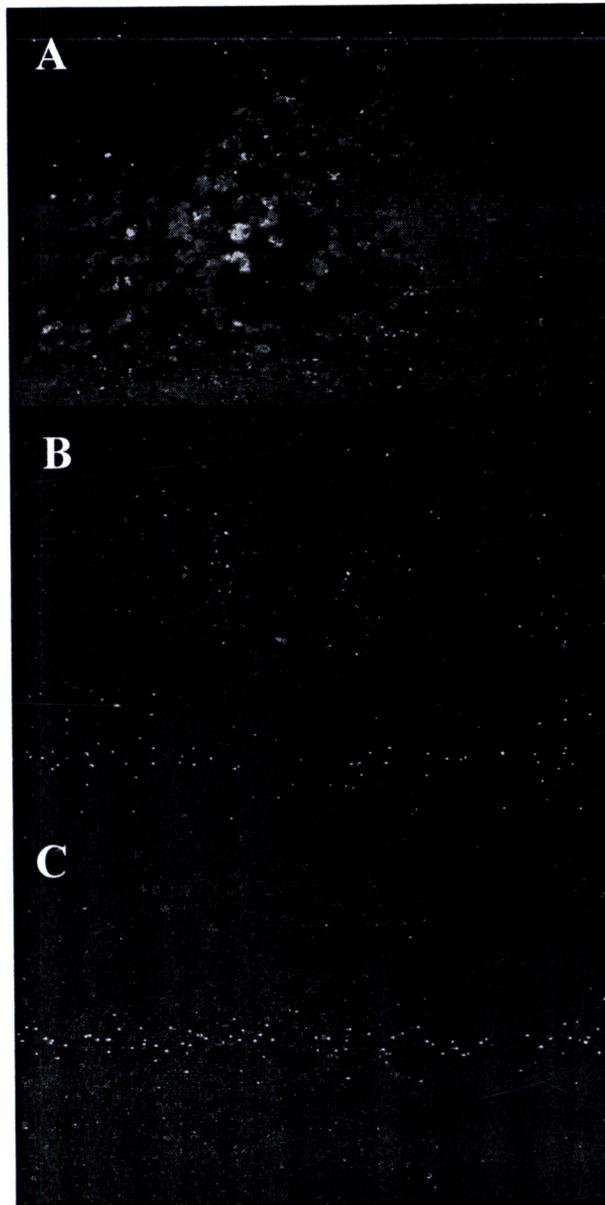
5. การทดสอบความสามารถของแกมมาเดลตาทีเซลล์ในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกในสัตว์ทดลอง

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



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

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



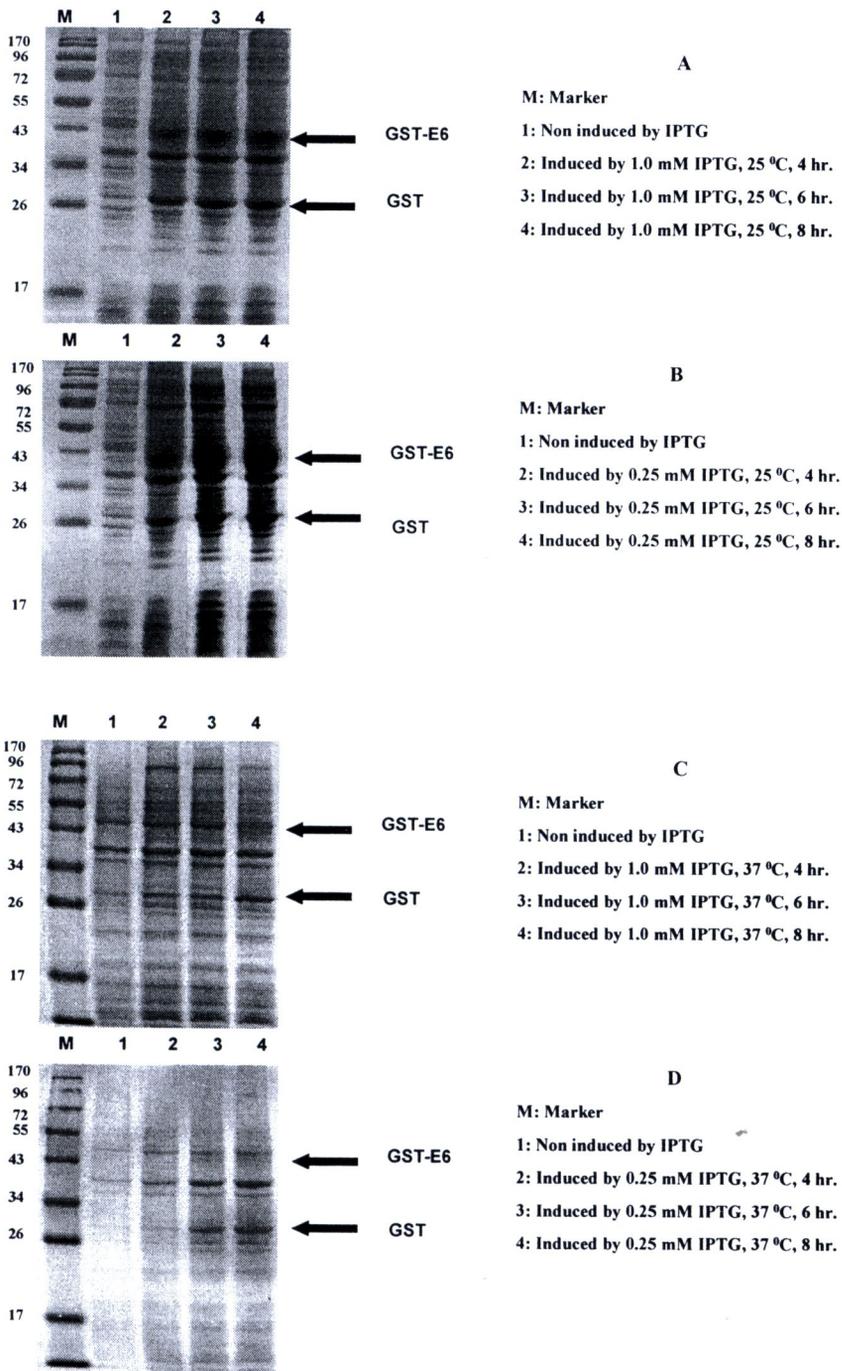
รูปที่ 15 ผลการฆ่าเซลล์มะเร็งในหนูทดลองของแกมมาเคลตาที่เซลล์ A) บริเวณที่เซลล์มะเร็งถูกทำลาย (ลูกศร) B) เซลล์ควบคุมบวก (มาพร้อมกับชุดน้ำยา) C) เซลล์ควบคุมลบ (เก็บจากหนูทดลองที่มีก้อนเนื้อออกแต่ไม่ได้ฉีดแกมมาเคลตาที่เซลล์) กำลังขยาย 200 เท่า

ส่วนที่ 3

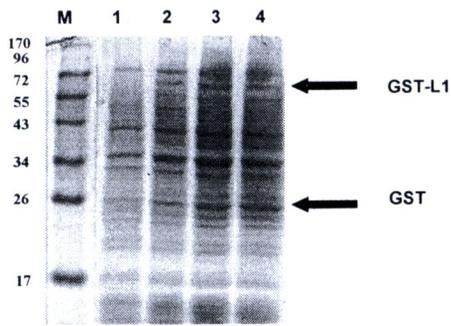
การเตรียมแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

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

- 5.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนจากพลาสมิดในแบคทีเรีย 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 ทำการหาสภาวะการกระตุ้นแบคทีเรียที่มีการแสดงออกของโปรตีน 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 ซึ่งผลพบว่า สภาวะที่ดีที่สุดของการแสดงออก E6 คือ 0.25 mM IPTG ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) นาน 6 ชั่วโมง (รูปที่ 16) ส่วนสภาวะที่ดีที่สุดของการแสดงออก 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)

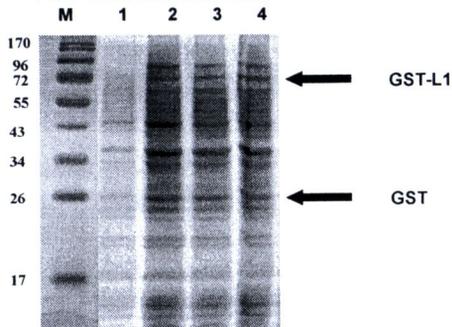


รูปที่ 16 ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue ของ GST-HPV16E6 fusion proteins ใน *E.coli* BL-21(DE3) ที่ภาวะการกระตุ้นต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG (0.25 mM และ 1 mM) อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส และ ระยะเวลาในการกระตุ้น คือ 4, 6 และ 8 ชั่วโมง



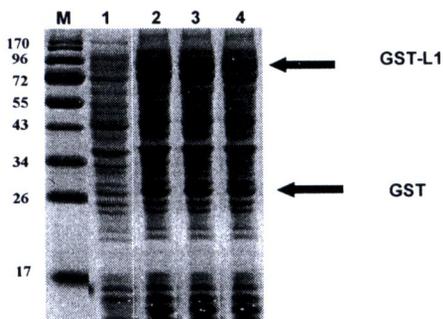
A

M: Marker
 1: Non induced by IPTG
 2: Induced by 1.0 mM IPTG, 25 °C, 4 hr.
 3: Induced by 1.0 mM IPTG, 25 °C, 6 hr.
 4: Induced by 1.0 mM IPTG, 25 °C, 8 hr.



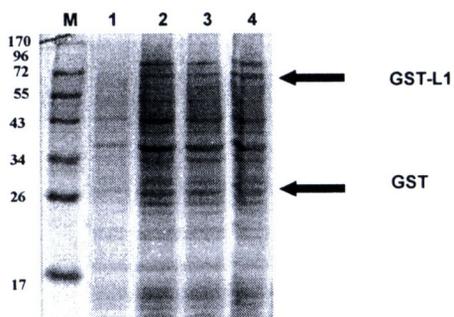
B

M: Marker
 1: Non induced by IPTG
 2: Induced by 0.25 mM IPTG, 25 °C, 4 hr.
 3: Induced by 0.25 mM IPTG, 25 °C, 6 hr.
 4: Induced by 0.25 mM IPTG, 25 °C, 8 hr.



C

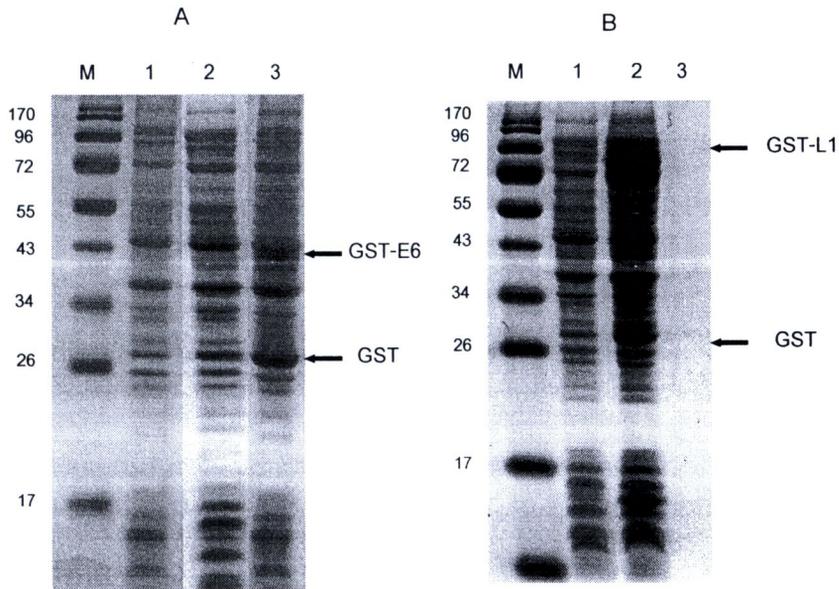
M: Marker
 1: Non induced by IPTG
 2: Induced by 1.0 mM IPTG, 37 °C, 4 hr.
 3: Induced by 1.0 mM IPTG, 37 °C, 6 hr.
 4: Induced by 1.0 mM IPTG, 37 °C, 8 hr.



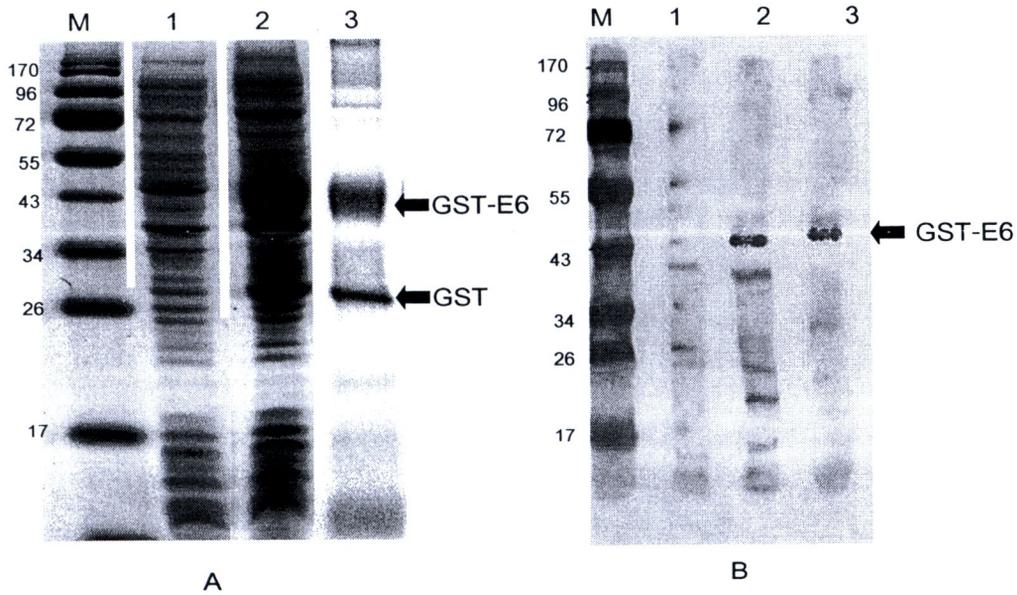
D

M: Marker
 1: Non induced by IPTG
 2: Induced by 0.25 mM IPTG, 37 °C, 4 hr.
 3: Induced by 0.25 mM IPTG, 37 °C, 6 hr.
 4: Induced by 0.25 mM IPTG, 37 °C, 8 hr.

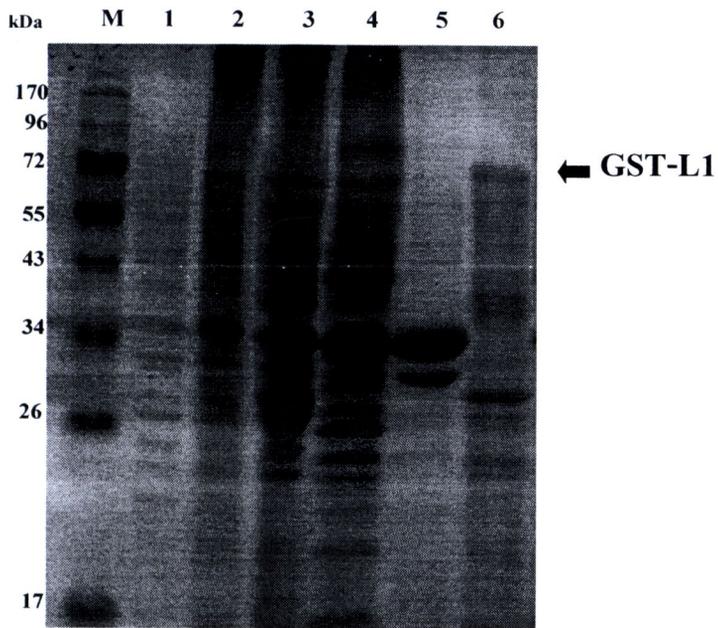
รูปที่ 17 ผลวิเคราะห์ SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี coomassie blue ของ GST-HPV16L1 fusion proteins ใน *E.coli* BL-21(DE3) ที่ภาวะการกระตุ้นต่าง ๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG (0.25 mM และ 1 mM) อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส และ ระยะเวลาในการกระตุ้น คือ 4, 6 และ 8 ชั่วโมง



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,



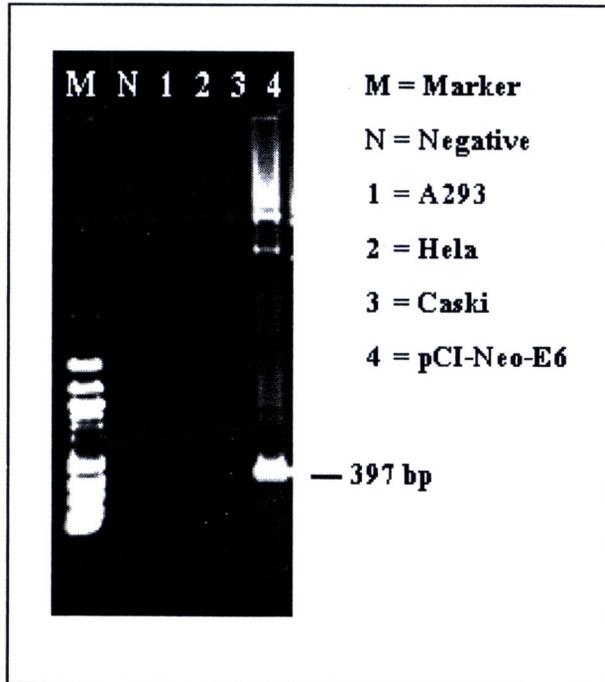
รูปที่ 19 SDS-PAGE and Western blot analysis ของ GST-HPV16E6. A: SDS-PAGE stained with coomassie blue and B: Western blotting, the purified GST-E6 was detected with mouse anti-E6 monoclonal antibody, lane1; whole cell lysate from *E.coli* BL-21(DE3) non-induced by IPTG, lane2; whole cell lysate from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

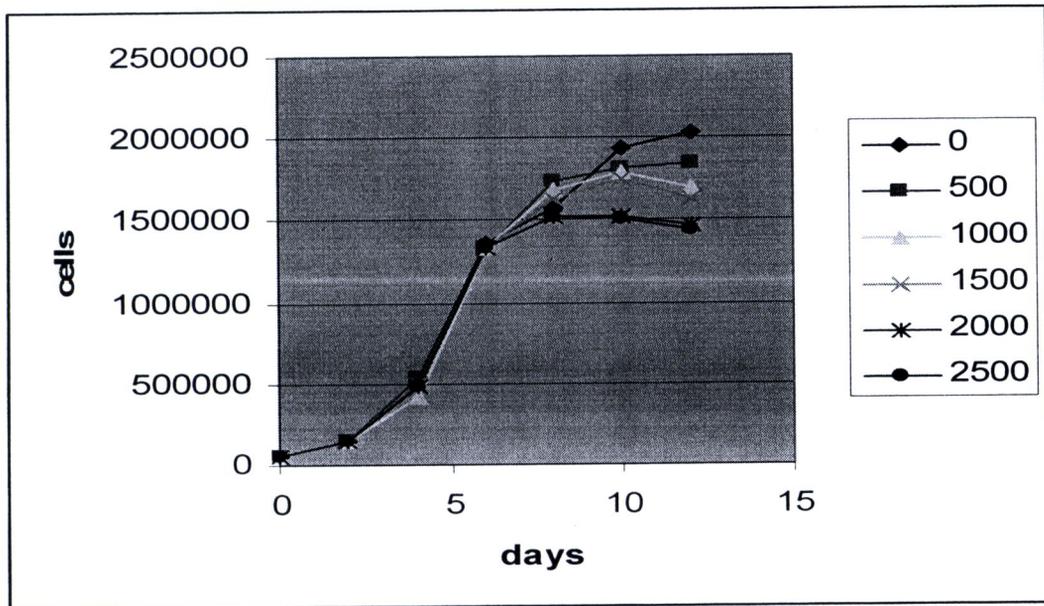
2. การพัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกของแอนติเจนของไวรัสแปปิโลมา

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



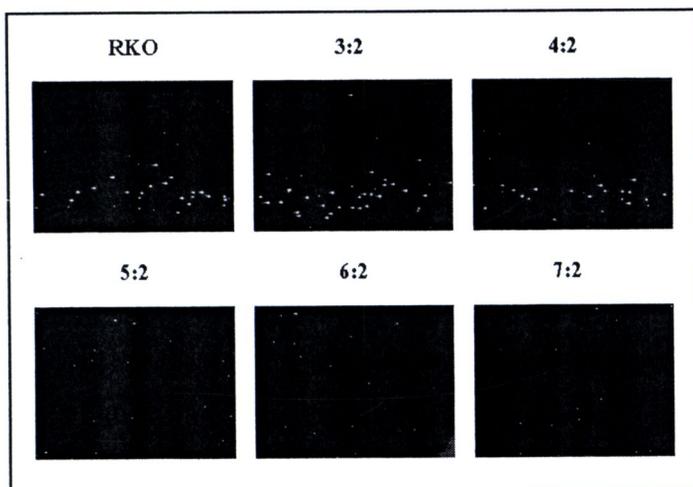
รูปที่ 21 ผลการเพิ่มจำนวนยีน HPV-16E6 แถว M เป็น 100 bp DNA ladder แถว N เป็นน้ำกลั่น แถวที่ 1 เป็นเซลล์ A293 ที่ไม่มีสารพันธุกรรม HPV แถวที่ 2 เซลล์ HeLa ที่มีสารพันธุกรรม HPV-18 แถวที่ 3 เซลล์ CaSki ที่มี HPV-16 แถวที่ 4 เป็นพลาสมิดที่สกัดได้จาก transformed *E. coli* DH5 α

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 $\mu\text{g/ml}$

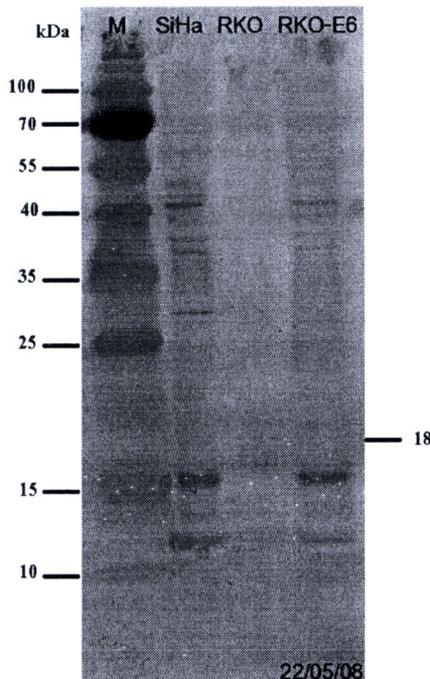
2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ transfection เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในการทำ transfection โดยใช้อัตราส่วนน้ำยากับปริมาณ DNA ของ pCI-Neo-E6 ต่าง ๆ กันคือ 3:2, 4:2, 5:2, 6:2 และ 7:2 (μl transfection reagent: μg DNA) พบว่าประสิทธิภาพของการเข้าสู่เซลล์ประมาณร้อยละ 10-30 หลังจากตรวจดูการแสดงออกของ HPV-16E6 ภายในเซลล์ด้วยวิธี 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 แม้จะใช้เซลล์มากถึง สิบล้านเซลล์ ดังรูปที่ 24



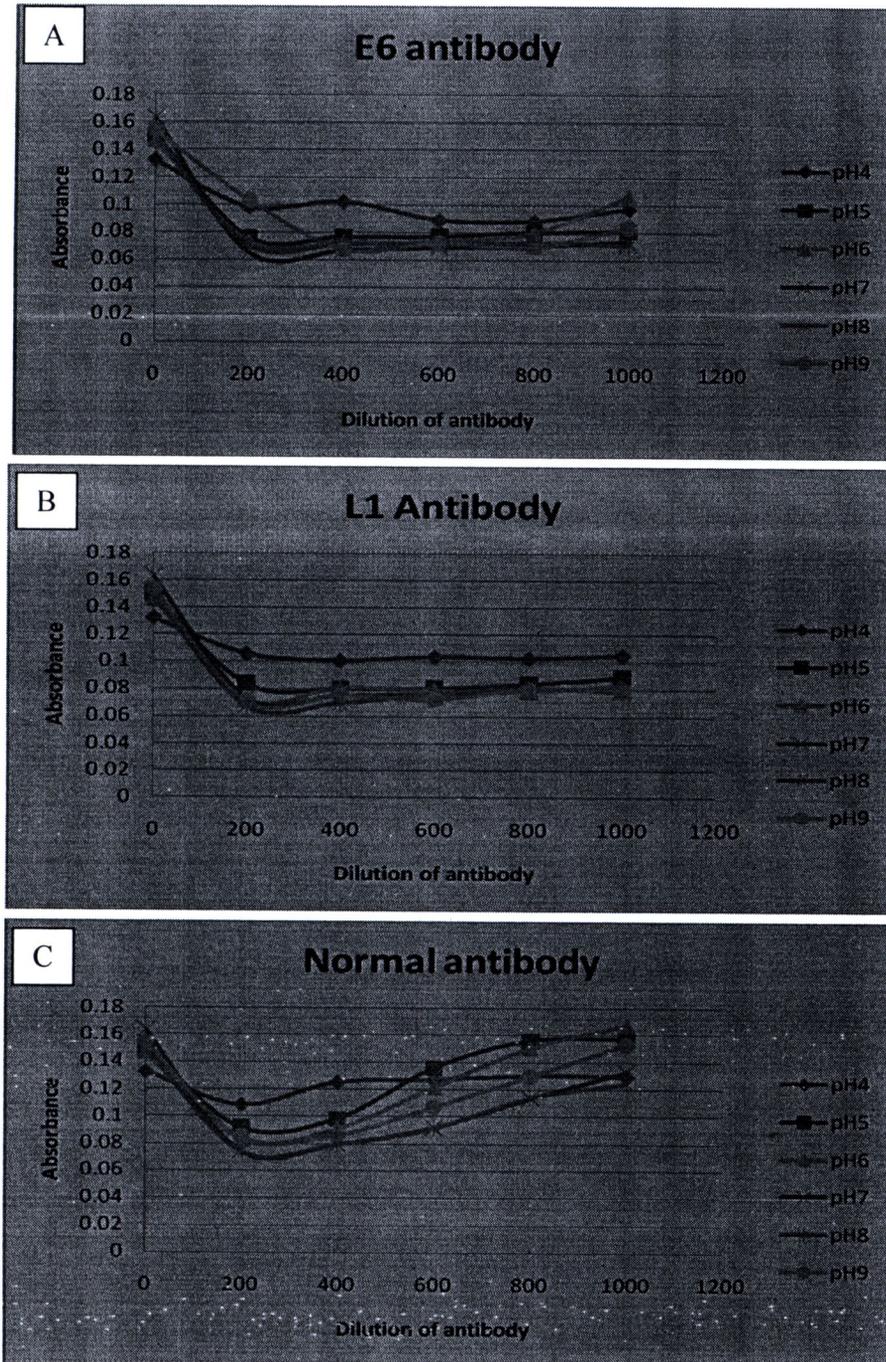
รูปที่ 24 การตรวจหาโปรตีน HPV16E6 ที่สกัดจากเซลล์ RKO-E6 (pCI-Neo E6 transfected RKO cells) M: Marker SiHa: เซลล์ควบคุมบวก RKO: เซลล์ที่ไม่มีพลาสมิด เป็นเซลล์ควบคุมลบ

ส่วนที่ 4

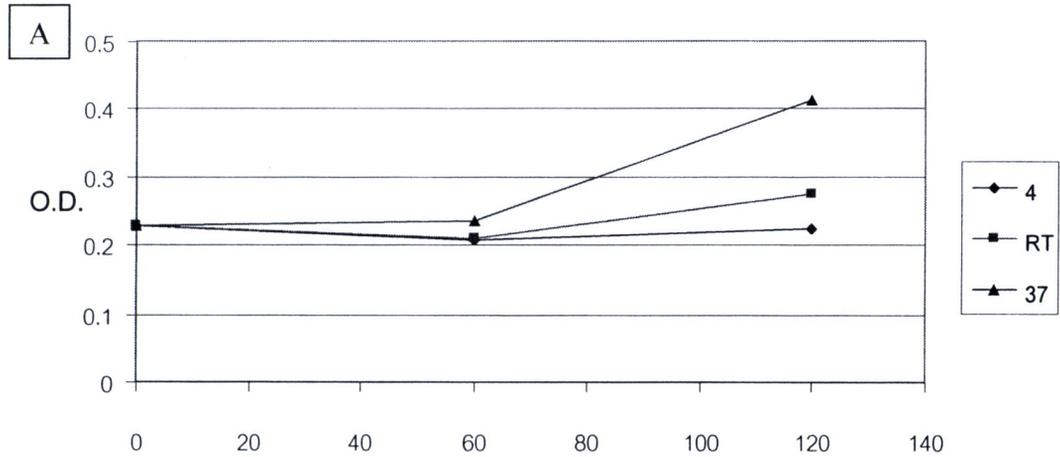
1. การพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ

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% HAuCl₄ ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำที่ 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

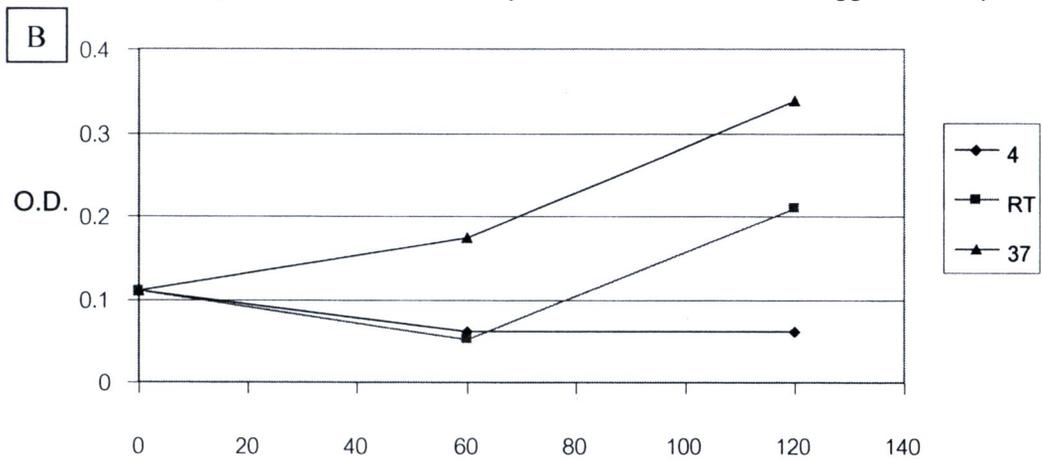
1.2 การทดสอบปฏิกิริยารวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำกับกับแอนติเจน E6 หรือ L1 หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกัน (Immunoagglutination assay) กับแอนติเจน E6 และ L1 โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ความเจือจาง 1:400 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนทองคำขนาด 10 nm เท่ากับ 0.0025% HAuCl₄ ความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำ = 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)



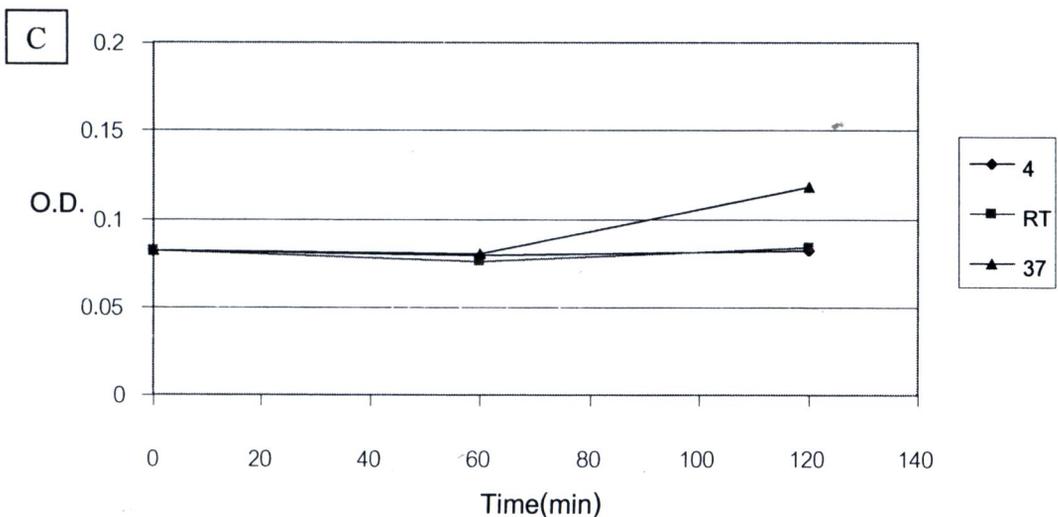
รูปที่ 25 กราฟแสดงค่า OD 580 nm เฉลี่ย ที่ระดับความเจือจางของแอนติบอดี E6 (A), L1 (B), normal antibody (C) กับ ระดับ pH (4, 5, 6, 7, 8, และ 9) ของสารละลายอนุภาคนาโนทองคำ



Temperature dependence of E6 antibody coated AuNPs immunoagglutination process

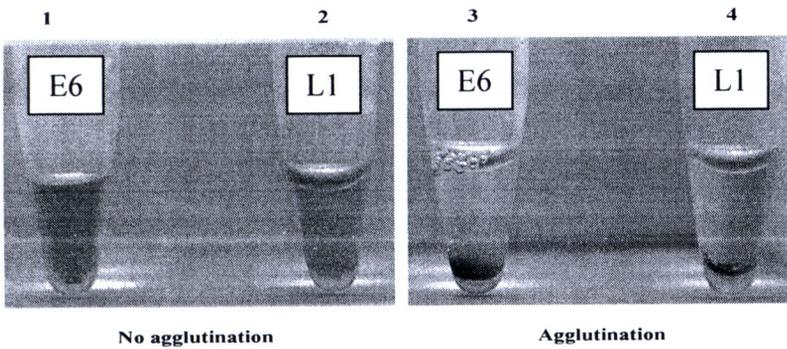


Temperature dependence of normal antibody coated AuNPs immunoagglutination process



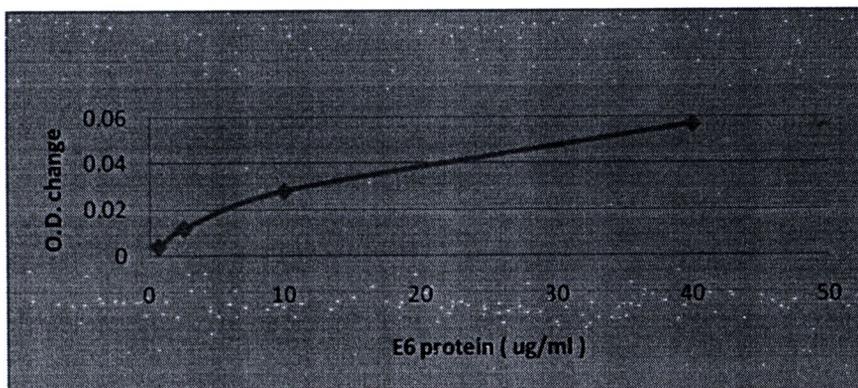
รูปที่ 26 กราฟแสดงการเกิดปฏิกิริยารวมกลุ่มภูมิคุ้มกันของอนุภาคนาโนทองคำกับแอนติเจน L1 (A)

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) ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับแอนติเจน L1



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

