อภิปรายและวิจารณ์ผล

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

แม้ว่าจะมีการศึกษาหลายฉบับที่แสดงถึงการพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองโดยทำให้มีการติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา แต่ก็มีข้อจำกัดหลายอย่าง (16, 17) เช่น การเตรียมไวรัสแปปิโลมาทำได้ยาก เนื่องจากเป็นไวรัสที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงปกติทั่ว ๆ ไปได้ ดังนั้นการเตรียมไวรัสจึงต้องเตรียมจากเนื้อเยื่อติดเชื้อจากผู้ป่วยซึ่งต้องใช้จำนวนเนื้อเยื่อปริมาณมากเพราะมีจำนวนไวรัสน้อย นอกจากนี้มีความพยายามนำเนื้อเยื่อผู้ป่วยปลูกฝังลงไปในสัตว์ทดลองโดยตรงแต่พบปัญหาการเจริญของเนื้อเยื่อเหล่านั้นไม่คงที่ ข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ไม่สามารถติดตามการพัฒนาของเซลล์มะเร็งจนเป็นก้อนนูน เช่นไม่สามารถตรวจดูการพัฒนาของระบบหลอดเลือดที่มาเลี้ยงเซลล์ต่าง ๆ เป็นต้น ซึ่งวิธีที่ใช้ในการวิจัยนี้ คือ dorsal skin-fold window chamber technique สามารถแก้ปัญหาที่กล่าวมาได้เป็นอย่างดี

ในงานวิจัยนี้ได้นำโมเดลหนูทดลองที่พัฒนาขึ้นมาศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้แกมมาเดลตาทีเซลล์ในการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกแบบภูมิคุ้มกันบำบัด การเลือกใช้แกมมาเดลตาทีเซลล์นั้น เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าแกมมาเดลตาทีเซลล์มีบทบาทสำคัญในการควบคุมเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น myeloma, colon carcinoma, renal cell carcinoma และ hepatocarcinoma เป็นต้น (19-22) และมีรายงานพบว่า isopentenyl pyrophosphate (IPP) ซึ่งเป็นสารระหว่างกลางในขบวนการ mevalonate pathway ทำหน้าที่

เป็นแอนติเจนที่สำคัญในการกระตุ้นแกมมาเดลตาทีเซลล์ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ต่าง ๆ ได้ (23) จึงมีการพัฒนายากลุ่ม nitrogen bisphosphonate drugs (nBps drugs) ซึ่งจะกระตุ้นในเซลล์มีการสะสม IPP และแสดงออกภายในเซลล์ โดยคาดหวังว่าเซลล์ที่ได้รับยาจะถูกทำลายด้วยแกมมาเดลตาทีเซลล์ (24-26) นอกจากนี้พบว่าการทำลายของแกมมาเดลตาทีเซลล์ไม่ต้องอาศัยความจำเพาะของเนื้อเยื่อ (MHC)ซึ่งต่างจากขบวนการทำลายเซลล์ของ cytotoxic T cells จึงเป็นข้อดีที่สามารถเตรียมแกมมาเดลตาทีเซลล์จากเลือดของคนอื่นได้ อย่างไรก็ตามสมมุติฐานเหล่านี้อยู่ระหว่างการพิสูจน์ ก่อนที่จะทดลองในหนู จึงทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงให้หลอดทดลองก่อน หลังจากทำการแยกแกมมาเดลตาทีเซลล์จากเลือดผู้บริจาคโลหิต สภากาชาดไทย นำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนและกระตุ้นให้มีความจำเพาะต่อ IPP ด้วยยา pamidronate ในขนาดที่เหมาะสมแล้ว จึงนำเซลล์มาทำปฏิกิริยากับเซลล์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด คือ HeLa, CaSki และ SiHa ผลการทดลองชี้ให้เห็นชัดเจนว่าแกมมาเดลตาทีเซลล์สามารถทำลายเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ความสามารถในการทำลายขึ้นกับชนิดของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด (ตารางที่ 6) แสดงว่า pamidronate กระตุ้นให้เซลล์มะเร็งมีการสะสมของ IPP ทำให้แกมมาเดลตาทีเซลล์สามารถทำลายได้ จากผลการทดสอบสังเกตเห็นว่าเซลล์ปกติ (NTY) สามารถถูกทำลายได้ด้วยแกมมาเดลตาทีเซลล์ ซึ่งแกมมาเดลตาทีเซลล์ของแต่ละบุคคลมีความสามารถในการทำลายแตกต่างกัน แต่กระนั้นก็ยังต่ำกว่าเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิด คาดว่าเป็นเพราะเซลล์ปกตินั้นไม่ใช่เซลล์ที่ได้มาจากบุคคลเดียวกับที่นำมาแยกแกมมาเดลตาทีเซลล์ ดังนั้น เป็นไปได้ว่ามี allogenic response ซึ่งเมื่อลองนำเซลล์เม็ดเลือดขาวคนเดียวกัน (autologous cell) มากระตุ้นด้วย PHA พบว่าเซลล์แทบไม่ถูกทำลายเลย ปรากฏการณ์ที่พบนี้สอดคล้องกับรายงานของ Corvaisier และคณะ (27) ซึ่งศึกษาการทำลายเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วยแกมมาเดลตาทีเซลล์ และพบความแตกต่างในการทำลาย autologous และ allologous colon cancer cells เนื่องจากกลไกการทำลายเซลล์ของ Cytotoxic T lymphocyte (CTL) เป็นที่ทราบกันดีว่าเกี่ยวข้องกับหลั่งสารหลายชนิด ที่สำคัญคือ IFN-γ และ TNF-α นอกจากนี้ยังทำให้มีการแสดงออกของโมเลกุล CD107 บนผิวเซลล์ถ้าได้รับการกระตุ้น (28) ในงานวิจัยนี้จึงตรวจหาสาร IFN-γ , TNF-α และการแสดงออกของโมเลกุล CD107 เพื่อศึกษากลไกการทำลายของแกมมาเดลตาทีเซลล์ว่าเหมือนกับ CTL หรือไม่ ผลการตรวจหาการหลั่งของ IFN-γ และ TNF-α พบว่าสัมพันธ์กับอัตราการฆ่าเซลล์ (รูปที่ 12 และ 13) แต่ที่น่าสนใจคือ การแสดงออกของโมเลกุล CD107 ไม่ได้พบในทุกเซลล์ของแกมมาเดลตาทีเซลล์ (ร้อยละ 6.9-13.95) ปริมาณที่แสดงออกมากน้อยสัมพันธ์กับความสามารถในการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกแต่ละชนิด

แสดงว่า กลไกการทำลายของแกมมาเดลตาทีเซลล์น่าจะแตกต่างจาก CTL โดยอาจอาศัยโมเลกุลอื่น มีรายงานพบการแสดงออกของ FasL บนผิวเซลล์แกมมาเดลตาทีเซลล์ และเป็นที่ทราบดีว่าบนผิวเซลล์มะเร็งหลายชนิดมีโมเลกุล Fas บนผิวเซลล์ ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างสองโมเลกุลนี้กระตุ้นให้เกิดขบวนการ apoptosis ทำให้เซลล์ตายได้ (29) นอกจากนี้ยังมีบทบาทของ NKG2D และ MICA/B ซึ่งรายงานในการศึกษามะเร็งของไต (22) เป็นต้น กลไกที่แน่ชัดคงต้องทำการศึกษาต่อไป

เมื่อทำการทดลองความสามารถของการฆ่าเซลล์มะเร็งปากมดลูกของแกมมาเดลตาทีเซลล์ในหนูทดลอง พบว่าแกมมาเดลตาทีเซลล์สามารถทำให้เซลล์ตายได้ โดยกลไก apoptosis (รูปที่ 15) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะใช้แกมมาเดลตาทีเซลล์ในการรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด

เนื่องจากกลไกการก่อมะเร็งที่มีสาเหตุจากไวรัสแปปิโลมานั้น 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) แบคูโลไวรัส (baculovirus) transgenic plants และแบคทีเรีย (30-33) การเตรียมโปรตีนจากแบคทีเรียโดยเฉพาะ *E. coli* สามารถเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ระบบ glutathione-S-transferase (GST) gene fusion system ซึ่งส่วนใหญ่เตรียมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ในการเตรียมโปรตีน E6 พบว่าอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสให้ผลดีกว่า โปรตีน E6 สร้างและละลายอยู่ในไซโตพลาสมของเซลล์ ส่วนโปรตีน L1 จะอยู่ใน inclusion body ดังนั้นสวิธีการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนทั้งสองนี้จึงใช้วิธีที่แตกต่างกัน 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 และวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะกับ HPV-16 สูงเพราะเมื่อได้ทดสอบความจำเพาะของวิธีนี้กับจุลชีพแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ และเซลล์ Hep-2 ซึ่งไม่มีสารพันธุกรรมไวรัสแปปิโลมา พบว่าไม่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนได้ (ตารางที่ 8) อย่างไรก็ตามในโครงการวิจัยนี้การพัฒนาวิธีการตรวจหา HPV-16E6 และHPV-16L1 เป็นโครงการนำร่องซึ่งต้องมีการประเมินวิธีการตรวจต่อไป เพื่อใช้ประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยและพยากรณ์โอกาสการกลายเป็นมะเร็งปากมดลูกของผู้ป่วย

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

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

เซลล์แกมมาเดลตาทีเซลล์ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยยา Pamidronate มีประโยชน์มากในการนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด แต่เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ยังจำเป็นที่ต้องทำการแยกเซลล์ทีจำเพาะ (T cell cloning) และศึกษาคุณสมบัติให้สมบูรณ์ก่อน และต้องทดสอบในหนูทดลองให้ได้ข้อมูลกลไกของยาอย่างชัดเจนก่อนนำไปใช้กับคน

และเนื่องจากสามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาโปรตีน HPV-16E6 และHPV-16L1 ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอานุภาคนาโนทองคำได้ แต่ยังไม่ได้ทำการประเมินคุณภาพของวิธีการตรวจกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจริง ซึ่งขณะนี้ได้ดำเนินการขอทุนวิจัยของสภาวิจัยแห่งชาติ ปีพ.ศ. 2555 อยู่ระหว่างรอผลการพิจารณา

ส่วนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ HPV-16E6 สามารถนำมาศึกษาคุณสมบัติการเจริญเติบโตและความสามารถในการต่อต้าน apoptosis และกลไกการก่อมะเร็งของโปรตีน E6

ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

1. การหายารักษาโรคติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา และมะเร็งปากมดลูก โดยใช้โมเดลสัตว์ทดลองที่มีเซลล์มะเร็งของไวรัสแปปิโลมาเจริญเติบโต
2. วิธีการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัดด้วยเซลล์แกมมาเดลตาทีเซลล์
3. วิธีการตรวจหาโปรตีน HPV-16E6 เพื่อบ่งชี้โอกาสการกลายเป็นมะเร็ง หรือเพื่อพยากรณ์ระยะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา
4. วิธีการตรวจหาโปรตีน HPV-16L1 เพื่อบ่งชี้การติดเชื้อและการเพิ่มจำนวนของไวรัสแปปิโลมา
5. องค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกการเกิดมะเร็งที่เกิดจากโปรตีน HPV-16E6