



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ปีที่ 1

เรื่อง

“การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัด RNA เพื่อใช้ในการวินิจฉัยและพยากรณ์รอยโรคของปากมดลูก”

“Development of RNA detection techniques for diagnosis and
prediction of abnormal cervical lesion”

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผศ.พญ.พิสมัย ยืนยาว คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.ดร. บุญเกิด คงยิ่งยศ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ.ดร.ณัฐชา ภัทรผดุงกิจ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “การพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาและนาโน
เทคโนโลยีเพื่อการป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก”

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “การพัฒนาเทคนิคทางอนุชีววิทยา และนาโนเทคโนโลยีเพื่อการป้องกันโรคมะเร็งปากมดลูก” ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประเภท อุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนทำให้การทำวิจัยสำเร็จได้ตาม วัตถุประสงค์

รศ.แจ่มใส เพียรทอง

(หัวหน้าโครงการวิจัย)

บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับหนึ่งหรือสองในผู้หญิงไทย โดยปัจจุบันพบว่าการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของ HR-HPV E6/E7 mRNA จะเพิ่มขึ้นตามระดับความรุนแรงของรอยโรคนำไปสู่ cell cycle progression และสะสมความผิดปกติของจีนและโครโมโซม (chromosomal instability) ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของ human protein ผลคือ เกิด cell transform, cell immortalization และมะเร็ง ถึงแม้จะได้รับการตรวจอย่างสม่ำเสมอ ผู้หญิงจำนวนไม่น้อยก็ยังเป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลามได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการตรวจวิธีใดวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงพอ เพราะฉะนั้นการพัฒนาการตรวจหาการแสดงออกของ HPV E6/E7 mRNA จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ยังมีความสำคัญเพื่อใช้ในการวินิจฉัยและการพยากรณ์ความผิดปกติของรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจที่มีประสิทธิภาพสูง สำหรับตรวจหาความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูกก่อนที่จะเป็นมะเร็ง เพื่อศึกษาหาวิธีการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยระยะก่อนเป็นมะเร็งเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูก โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษาในปีที่ 1 นี้เพื่อตรวจหา HPV E6/E7 mRNA และนำผลมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลระหว่าง human chromosome copy number และ HPV integration เพื่อใช้เป็น biomarker เพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจ

ตัวอย่างตรวจที่ใช้คือ ชิ้นเนื้อปากมดลูกที่เป็น formalin-fixed, paraffin-embedded FFPE tissue ซึ่งได้รับการวินิจฉัยทางด้าน histology เป็น มะเร็งปากมดลูก คือ well, moderate and poor-differentiate, โดยใช้ตัวอย่างจาก the University of Vermont (UVM), USA ซึ่งเป็นตัวอย่างจากประเทศอินเดีย จำนวน 108 ตัวอย่าง

ผลการตรวจหาความชุกของการติดเชื้อไวรัส HPV DNA signals patterns โดย punctate pattern พบ 79/103 (76.70%) มีลักษณะ dot-like signals ในนิวเคลียส ซึ่งบ่งชี้ integrated HPV genome และ diffuse pattern พบ 2/103 (1.94%) มีลักษณะ large globular homogeneously dense ในนิวเคลียส

ในเซลล์ของเนื้อเยื่อมะเร็งระหว่าง moderate และ poor differentiate โดย poorly differentiate มีความผิดปกติแบบ pentasomy 9/27 (33.33%) มากกว่า moderately differentiate 8/63 (12.67%) และ poorly differentiate มี disomy 2/27 (7.41%) น้อยกว่า moderately differentiate 20/63 (31.75%) และพบอัตราส่วนของเซลล์ที่เป็น trisomy ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุ > 50 (mean rank 40.48) มากกว่า กลุ่มที่มีอายุ < 50 ปี (mean rank 30.05) อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษานี้พบ HPV mRNA E6/E7 positive 100/108 (92.56%) เมื่อเทียบกับ HPV DNA ISH พบ 92/108 (85.19%) โดยพบลักษณะ cytoplasmic, และ nuclear staining ในเกือบทุก RNA ISH-positive cases ซึ่งคาดว่าอาจเป็น pattern ของ probe ที่ hybridize กับ transcription sites ใน nuclear และ active transcript ใน cytoplasm

สรุปคือความสัมพันธ์ระหว่าง HPV DNA, physical status, HPV E6/E7 mRNA, genetic instability, human protein expression และปัจจัยอื่นๆ ใน cervical cancer FFPE พบว่า host chromosome 7 ที่ผิดปกติ (aneusomies) มากกว่า 4 dots/cell และ mRNA E6/E7 รวมทั้ง CTTN, VEGF, PIK3CA, ERK1/2p, p-mTOR อาจจะใช้เพื่อเป็น biomarker ของ ICC

สารบัญ

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	3
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการวิจัย	15
อภิปรายผล/วิจารณ์	25
สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ	25
บรรณานุกรม	26

1. บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเร็งปากมดลูกเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของทุกประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากมะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดในผู้หญิงไทยและพบเป็นอันดับสองของผู้หญิงทั่วโลก อีกทั้งยังเป็นสาเหตุการตายของผู้หญิงเป็นอันดับ 1 ในเวียดนาม อันดับ 2 ในอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ อันดับ 3 ในไทย และอันดับ 4 ในมาเลเซียอีกด้วย การศึกษาในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี incidence ของมะเร็งปากมดลูก (age-standardized rate, ASR) ในอินโดนีเซียและมาเลเซียเท่ากับ 15.7 ต่อ 100,000 ในขณะที่พบค่า (ASR) สูงขึ้นใน ไทย (ASR) = 19.8 เวียดนาม (ASR) = 20.2 และฟิลิปปินส์ (ASR) = 20.9 ตามลำดับ ในไทยพบว่าอายุของสตรีที่สามารถตรวจพบมะเร็งปากมดลูกจะเริ่มจาก 20 ปี เป็นต้นไป และพบสูงสุดในสตรีที่มีอายุ 45-50 ปี โดยส่วนใหญ่แล้วจะตรวจพบในระยะท้ายๆ ของการเกิดโรค ใน International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage II (51%) และ stage III (31%) อีกทั้งยังพบว่ามี overall 5-year survival เป็นร้อยละ 68.2 ในเชิงใหม่ และร้อยละ 54.5 ในขอนแก่น

การติดเชื้อ High risk (HR) HPVs เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง HPV16 โดยประมาณร้อยละ 80 ของผู้หญิงที่มีอายุ <35 ปีที่ติดเชื้อ HPVs จะสามารถกำจัดเชื้อได้เอง มีเพียงส่วนหนึ่งเท่านั้นที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก ซึ่งปัจจัยที่ทำให้หายจากการติดเชื้อหรือพัฒนาไปเป็นมะเร็งนั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจ

มะเร็งปากมดลูกสามารถป้องกันและรักษาให้หายได้ด้วยวิธีที่มีอยู่ในปัจจุบันหากตรวจพบเซลล์ผิดปกติตั้งแต่ระยะแรกๆ อย่างไรก็ตามในประเทศไทยกำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทยจำนวนผู้หญิงที่เข้าสู่ระบบตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกยังต่ำ (ร้อยละ 5) และถึงแม้จะได้รับการตรวจอย่างสม่ำเสมอก็ตาม ผู้หญิงจำนวนไม่น้อยก็ยังเป็นมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลามได้ ทั้งนี้เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มี การตรวจวิธีใดวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงพอ หรือแม้แต่การใช้การตรวจมากกว่า 1 วิธีร่วมกันก็ไม่ได้ทำให้มีความไว และความจำเพาะสูงเป็นที่น่าพอใจ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจหาความผิดปกติ ก่อนที่จะเป็นมะเร็งให้มีประสิทธิภาพสูง เพื่อศึกษาหาวิธีการตรวจคัดกรองและวินิจฉัย (diagnosis) และป้องกันไม่ให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูก

ในปัจจุบันพบว่า HPV16 As variant มีความสำคัญในการเกิดมะเร็งปากมดลูกในทวีปเอเชีย รวมทั้งประเทศไทย การเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของ HPV16 ไปเป็น HPV16 As variant มีบทบาทสำคัญในการเกิดภาวะการติดเชื้อแบบยืดเยื้อ (persistent infection) การเกิด immune surveillance และการเพิ่มความรุนแรงของรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปากมดลูก

การ Integrate และ การ express Oncogene E6/E7 ของ HR-HPV เป็นปัจจัยเสี่ยงในการทำ ให้พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปากมดลูกเปลี่ยนแปลงไปจนอาจทำให้เกิด cervical cancer (CA) โดย HR-

HPV ส่วนใหญ่ จะ integrate subgenomic fragment เข้าสู่ host cell chromosomal DNA (integrate form) ซึ่ง HPV จะยังคงสามารถเพิ่มจำนวน sub genomic fragment ได้ เมื่อมี HPV plasmid (episomal form) อยู่ในเซลล์เดียวกัน HR-HPV จะชักนำให้ HPV sub genomic fragment locus เกิดการ re-replicate จากจุด origin และสร้างโปรตีนออกมาจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่ host cell เกิดการ apoptosis ตายไปหรือเกิดการ damage บริเวณนั้นเพื่อ repair gene ให้ถูกต้องโดย recombination mechanism แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากการ re-replicate ของ integrate HPV แล้วยังพบการเกิด duplication ภายใน HPV locus, extra chromosomal copy ของ HPV loci และเกิด cross chromosomal translocation [1, 2] เป็นผลให้การ express ของ oncogene E6/E7 ผิดปกติไป โดยปัจจุบันพบว่า การแสดงออกของ HR-HPV E6/E7 mRNA จะเพิ่มขึ้นตามระดับความรุนแรงของรอยโรค (cervical lesion) การแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของ HR-HPV E6/E7 oncogene จะมีผลต่อการ disrupt ของ p53 และ pRb tumor suppression pathway และนำไปสู่การเข้าสู่ S phase ของ cell cycle เกิดการ replicate และ cell cycle progression โดยที่ loss function ของ checkpoint G1/S, G2/M นอกจากนี้ การแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของ HR-HPV E6/E7 oncogene ยังนำไปสู่การสะสมความผิดปกติของจีนและโครโมโซม (chromosomal instability) ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของ miRNA ผลคือ เกิด cell transform, cell immortalization และมะเร็ง

การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในปัจจุบัน พบมีความไวต่ำ (ร้อยละ 45-70) เมื่อใช้วิธีการตรวจทางเซลล์วิทยา และเฉลี่ยร้อยละ 85 เมื่อใช้ PCR based-method ขณะที่การตรวจหา mRNA ได้มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการวินิจฉัยและบ่งชี้ความผิดปกติของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะเพิ่มขึ้นในการบ่งชี้ความผิดปกติระดับ CINII (ร้อยละ 71.4 และ ร้อยละ 75.8 9 ตามลำดับ) แต่วิธีการที่นำมาใช้ในการตรวจยังมีข้อจำกัดเรื่องเครื่องมือและมีสารเคมีที่ราคาสูง

เพราะฉะนั้นการพัฒนาการตรวจหาการแสดงออกของ HPV E6/E7 mRNA จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ยังมีความสำคัญเพื่อใช้ในการวินิจฉัยและการพยากรณ์ความผิดปกติของรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก ขณะเดียวกัน miRNA ก็จัดเป็น RNA ที่จะมีการเปลี่ยนแปลงระดับของการแสดงออกเมื่อเซลล์เกิดความผิดปกติหรือติดเชื้อ HPV และการนำมาใช้เป็น biomarker ในการตรวจวินิจฉัยเซลล์หรือเนื้อเยื่อผิดปกติยังมีข้อจำกัด การตรวจหา HPV E6/E7 mRNA และ miRNA และนำผลมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลระหว่าง human chromosome copy number และ HPV integration เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยยังไม่มีรายงานมาก่อน

ดังนั้น การศึกษานี้จึงนำความรู้ในระดับโมเลกุลมาใช้พัฒนาเทคนิคในการตรวจหาการแสดงออกของ RNA (ทั้ง human mRNA, human miRNA และ HPV16 E6/E7 mRNA) เพื่อเป็น biomarker ในการวินิจฉัยและพยากรณ์รอยโรคของเนื้อเยื่อปากมดลูก โดยจะศึกษาหาการแสดงออกของ HPV E6/E7 mRNA ในตัวอย่างชิ้นเนื้อ formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE) ของรอยโรคปากมดลูกที่เป็นมะเร็ง ร่วมกับการหาความสัมพันธ์กับภาวะอื่นๆ เช่น HPV integration, human chromosome copy

number, human protein และปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง และนำข้อมูลที่ได้มาพัฒนาเทคนิคในการตรวจหาการแสดงออกของ RNA (ทั้ง human mRNA, human miRNA และ HPV16 E6/E7 mRNA) และ human protein ในตัวอย่างรอยโรคที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ การพัฒนาเทคนิคนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะของการตรวจคัดกรอง การวินิจฉัย และการสามารถพยากรณ์โรคมะเร็งปากมดลูกในตั้งแต่ระยะแรกๆ ได้ เทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นจะมีประโยชน์ทั้งในยุค vaccine era ที่มีทั้งผู้ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและผู้ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว และหลัง vaccine era ซึ่งประชากรส่วนใหญ่ได้รับการฉีดวัคซีน เนื่องจากการฉีดวัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ HPV ได้ทุก type ทำให้การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกยังมีความจำเป็นสำหรับสตรีทุกราย

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HPV DNA, physical status, HPVE6/E7 mRNA, human chromosome copy number, human protein และปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ในตัวอย่างชิ้นเนื้อจากมะเร็งปากมดลูก
2. เพื่อประเมินการแสดงออกของ candidate human chromosome copy number และ human protein ที่สัมพันธ์ต่อการติดเชื้อ HPV กับการเปลี่ยนแปลงของรอยโรคในเนื้อเยื่อปากมดลูกที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ
3. เพื่อประเมินการแสดงออกของ candidate miRNA ที่มีความสัมพันธ์จากติดเชื้อ HPV และเกิดการเปลี่ยนแปลงของ human chromosome copy number โดยวิธี *in situ* hybridization และ/หรือ real time PCR ในเนื้อเยื่อ ปากมดลูกที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ
4. เพื่อพัฒนา PCR primer สำหรับการตรวจหาการแสดงออกของ HPV16 E6/E7 mRNA และ human mRNA ที่ได้จากข้อ 2. ที่มีความสัมพันธ์จากติดเชื้อ HPV ในเนื้อเยื่อปากมดลูกที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ โดยใช้เทคนิค Real time PCR
5. เพื่อประเมินเทคนิค real time PCR ที่พัฒนาขึ้นโดยการตรวจหาแสดงออกของ human mRNA, HPV16 E6/E7 mRNA และ human miRNA และการติดเชื้อ HPV ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ เพื่อวินิจฉัยและพยากรณ์การเกิดโรค

วัตถุประสงค์โครงการวิจัยปีที่ 1

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HPV DNA, physical status, HPVE6/E7 mRNA, human chromosome copy number, human protein และปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ในตัวอย่างชิ้นเนื้อจากมะเร็งปากมดลูก
2. เพื่อประเมินการแสดงออกของ candidate human chromosome copy number และ human protein ที่สัมพันธ์ต่อการติดเชื้อ HPV กับการเปลี่ยนแปลงของรอยโรคในเนื้อเยื่อปากมดลูกที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

มะเร็งปากมดลูก และ Human Papillomavirus (HPV)

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองผู้หญิงทั่วโลก จากการศึกษาพบว่าประมาณร้อยละ 99.7 ของมะเร็งปากมดลูกจะตรวจพบ DNA ของ human papillomavirus (HPV) อย่างน้อยที่สุด 1 type ของ high risk HPV [3] และประมาณร้อยละ 70 เป็น HPV16 และ HPV18 [3, 4] ดังนั้นจึงเชื่อว่าสาเหตุหลักของมะเร็งปากมดลูกเกิดจากเชื้อ HPV ซึ่งเป็นเชื้อที่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์ โดยมีปัจจัยร่วมอื่นๆ ได้แก่ การสูบบุหรี่ การมีคู่นอนหลายคน การมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรกเมื่ออายุน้อย การใช้ยาคุมกำเนิดเป็นเวลานาน เป็นต้น

HPV จัดอยู่ใน family *Papillomaviridae* เป็น non-envelope virus ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 55 นาโนเมตร มีจีโนมเป็นวงกลม สายคู่ (double stranded DNA) พันกันเป็นเกลียวซับซ้อน ขนาด 8000 คู่เบส แคปซิดมีการเรียงตัวแบบ icosahedral symmetry ประกอบด้วยแคปโซเมอร์ 72 หน่วย HPV มีการติดเชื้อเป็นแบบ species-specific แต่มีความสามารถสูงในการปรับเปลี่ยนไปตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ [5] HPV genome แบ่งเป็น ส่วนที่เรียกว่า non-coding upstream regulatory region (URR) หรือเรียก long control region (LCR) มีขนาดประมาณ 1 kb ส่วนนี้ไม่ encode โปรตีนแต่จะมี cis-element ที่จำเป็นใน viral replication และควบคุมการแสดงออกของจีน และส่วนที่ encode โปรตีนแบ่งเป็น early region open reading frames (ORFs) สำหรับ encode E6, E7, E1, E2, E4 และ E5 ซึ่งจำเป็นในการ replication, transcription และการประกอบเป็นอนุภาค และ late region สำหรับ encode 2 genes คือ L1 ซึ่งเป็น major capsid protein และ L2 เป็น minor capsid protein [6]

HPV มีมากกว่า 100 จีโนไทป์ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามลักษณะของเยื่อผิวที่ไวรัสชอบติดเชื้อ (epitheliotropism) ได้แก่ skin หรือ cutaneous HPV type ซึ่งชอบติดเชื้อบริเวณผิวหนัง และ mucosal HPV type ซึ่งชอบติดเชื้อบริเวณเยื่อเมือกเช่น ปากมดลูก [7-9] ไวรัสกลุ่ม mucosal HPV type แต่ละ type มีความสามารถในการก่อมะเร็งปากมดลูกได้แตกต่างกัน จึงแบ่งกลุ่มย่อยได้อีกเป็น high risk (HR) HPV type ซึ่งมีความสามารถสูงในการก่อมะเร็ง และกลุ่ม low risk (LR) HPV type ซึ่งมีความสามารถในการก่อมะเร็งต่ำกว่า [10] นอกจากนี้บางคนยังจัดบาง type เป็น intermediate type ไวรัสที่จัดเป็น LR HPV type ได้แก่ HPV6, 11, 26, 30, 34, 40, 42-44, 53, 55, 57, 61, 62, 64, 67, 70, 71, 73, 74, 79, 81-84 ส่วน HR HPV type ได้แก่ HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 66, 68 และ 69 [11]

HPV เข้าสู่เซลล์บริเวณเยื่อปากมดลูกที่ถลอกหรือฉีกขาด และเข้าไปติดเชื้อในเซลล์ basal ของเยื่อซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ ไวรัสที่เข้าไปในเซลล์จะเกิดกระบวนการ replication และ transcription ในนิวเคลียสทำให้มีปริมาณ viral DNA ในระยะเริ่มต้นประมาณ 50-100 genome copies ต่อ 1 เซลล์ ในเซลล์นี้จะไม่มีการสร้างอนุภาคของไวรัส (non productive infection) แต่จะมีโปรตีนบางตัว (early protein) ถูกสร้างขึ้นเช่นโปรตีน E1, E2, E6 และ E7 โดยมีการแสดงออกในระดับต่ำๆ [12] โปรตีนเหล่านี้มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนเช่น E1 จับกับโปรตีน E2 แล้วไปยังบริเวณ origin of replication ทำให้ viral DNA เกิดการ replication ได้ โดยโปรตีน E1 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ helicase ซึ่งมีหน้าที่แยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว ส่วน E6 และ E7 ทำให้เซลล์ proliferation และโปรตีน E2 มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของจีนอื่นๆโดยไปจับที่ E2 binding site บน LCR เมื่อเซลล์ basal ที่ติดเชื้อนี้แบ่งตัว และเคลื่อนตัวขึ้นสู่ suprabasal layer ของชั้นเยื่อเพื่อเกิดการ differentiation จะมีการเพิ่มจำนวนของ viral genome ตามการแบ่งตัวของเซลล์ และเมื่อเซลล์เคลื่อนขึ้นสู่ชั้นผิว จะมีการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ late gene ที่สร้างโปรตีนแคปซิดมาหุ้มจีโนมของเชื้อไวรัสรวมทั้งมีการสร้างโปรตีน E4 และ E5 เกิดขึ้นในระยะนี้ ทำให้ได้อนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์เมื่อเซลล์เคลื่อนขึ้นสู่ชั้นผิวแล้ว ลักษณะการเพิ่มจำนวนของไวรัสเป็นแบบ non-lytic life cycle ผลของ E6 และ E7 ทำให้ host cell

สามารถสนับสนุนการเพิ่มจำนวนไวรัสได้ และจากการที่มีคุณสมบัติเป็น oncoproteins ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจึงมีผลทำให้การควบคุมการแสดงออกของ host genes เปลี่ยนแปลงไป มี genetic instability เกิดขึ้น และยังมีคุณสมบัติทำให้เกิด malignant transformation และ cell immortalization ได้ [13] ซึ่งคุณสมบัตินี้พบได้ในเฉพาะ E6/E7 ของ HR-HPV โดย E7 สามารถจับกับ pRb ซึ่งจะถูกทำลายไปแล้วทำให้ E2F(transcriptional factor)ที่จับอยู่กับ pRb เป็นอิสระสามารถไปกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนอื่นๆได้โปรตีนที่มีความจำเป็นในการ replication ของเซลล์[14] ขณะที่เซลล์ถูกกระตุ้นเข้า S phase เป็นภาวะผิดปกติ ตามปกติจะต้องถูกควบคุมด้วย p53 เพื่อให้เซลล์เกิด apoptosis แต่ในภาวะที่มี E6 จะลบล้างหน้าที่นี้โดย E6 สามารถจับ E6AP และ p53 ทำให้เกิดการทำลาย p53 [15] ไม่เกิด apoptosis เป็นผลให้เซลล์ติดเชื้อไม่ differentiation แต่จะคงอยู่ในวงจรการเพิ่มจำนวนของไวรัส และเมื่อมีภาวะที่มีการแสดงออกของ oncogenes E6/E7 ที่มากเกินไปอย่างต่อเนื่องซึ่งมีคุณสมบัติทำให้ cell transformation เกิด clonal cell proliferation และ cell immortalization ต่อไป

การเกิดมะเร็งปากมดลูกขึ้นกับปัจจัยด้านโฮสต์ สิ่งแวดล้อมและด้านไวรัส ส่วนปัจจัยด้านไวรัสดังได้กล่าวแล้วว่ามีสาเหตุจาก HR-HPV โดยเฉพาะ HPV type จะมีผลต่อ persistent infection และ ผลที่จะตามมาต่างกัน นอกจากชนิดของ HPV แล้วการเกิด intratypic variation โดยเฉพาะ variation ในส่วนของจีน E6 ซึ่งเป็น oncogene ก็พบว่ามีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็ง เมื่อจีนนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปทำให้โปรตีนที่ถูกสร้างออกมามีคุณสมบัติในการทำงานเปลี่ยนแปลงไปโดยอาจมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีน E6 จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในจีน E6 ในกลุ่มประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยโดยกลุ่มวิจัยนี้ [16] พบ HPV16 As variant ร้อยละ 74 และสัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกในขณะที่ในกลุ่มเซลล์ปกติพบ HPV16 prototype มากกว่า จากการศึกษาถึง nucleotide sequence variation ที่เกิดขึ้นพบได้ในหลายๆ HPV genotypes เช่น HPV16, 18, 31 และ 35 ชนิดที่มีการศึกษามากที่สุดคือ HPV16 โดยพบ nucleotide sequence ที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นใน gene E6, E7, E2, L1, L2 และ LCR จาก nucleotide sequence ที่เปลี่ยนแปลงไปใน gene ดังกล่าวเกิดขึ้นแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคและลักษณะความแตกต่างที่เกิดขึ้นได้ถูกจัดเป็น phylogenetic branch แบ่ง HPV16 ออกเป็น variant ชนิดต่าง ๆ โดยมี nucleotide sequence แตกต่างกับ prototype อย่างน้อย 1 ชนิด หรือ คิดเป็น 2% ของ gene E6 หรือ gene E6 ร่วมกับ gene ชนิดอื่นเช่น E7, L1 หรือ LCR HPV16 variant ที่พบในปัจจุบันคือ European prototype(EP), European (E) variants , Asian variants (As), Asia-American variants (AA), Africa1 variants (Af1), Africa2 variants (Af2) และ North-American1 variants (NA1) การศึกษา variants ต่าง ๆ เหล่านี้พบว่าชนิดของ variant จะพบได้แตกต่างกันไปตามภูมิภาค เช่น European variants จะพบได้มากที่สุดในยุโรป อเมริกาเหนือ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ Asian variants พบได้มากที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ Africa variants พบมากที่สุดที่แอฟริกา และ Asia-American variants พบมากที่สุดที่อเมริกากลางและอเมริกาใต้ [17] และมีผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า variants ที่เกิดขึ้นมีผลทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกรุนแรงแตกต่างกันไป ดังนั้นการเกิด HPV16 variant ที่ต่างกันอาจมีผลต่อความรุนแรงที่ทำให้การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากมดลูกและการพัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ต่างกัน ซึ่งกลุ่มวิจัยเองได้ศึกษาพบว่า LCR ของ HPV16 As variant ที่มี nucleotide variation มีผลทำให้ transcription activity ของ early promoter สูงขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับสาเหตุการเกิดโรค ซึ่งการศึกษายีน E6 จาก HPV16 As variant ซึ่งพบได้บ่อยในประเทศไทย ยังขาดข้อมูลที่เพียงพอที่ใช้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนกับ HPV prototype ที่จะชี้ให้เห็นว่า HPV16 As variant มีบทบาทในการเพิ่มความรุนแรงในการเกิดโรค

การติดเชื้อ LR-HPV และ HR-HPV ที่เซลล์เยื่อปากมดลูกบริเวณ transformation zone ก่อให้เกิดเซลล์ผิดปกติ (เรียก koilocyte atypia) โดยส่วนใหญ่ของผู้ติดเชื้อดังกล่าวจะสามารถกำจัดเชื้อและกลับคืนสู่ภาวะเซลล์ปกติ (spontaneous regression) เนื่องจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะผู้ที่ยังมีอายุน้อยเชื้อจะหายไปหมดภายใน 2 ปี เป็นผลจากระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น แต่มีบางกลุ่มโดยเฉพาะผู้ที่ติดเชื้อกลุ่ม HR-HPV และกลุ่มอายุสูงขึ้น (>35 ปี) อาจพบการติด

เชื้ออยู่นาน เรียก การติดเชื้อแบบยืดเยื้อ (persistent infection) [18] ซึ่งถือว่าเป็นจุดกำเนิดของมะเร็งปากมดลูกได้ถ้าเซลล์ติดเชื้อนี้เพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็น cervical intraepithelial neoplasia III (CINIII) ร่วมกับมีปัจจัยอื่นๆ HPV type จะมีผลต่อการเกิด persistent และ รอยโรค โดยพบว่า HR-HPV จะเป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรคได้ในระดับต่างกัน จากการศึกษาโดยกลุ่มวิจัยนี้ในผู้หญิงภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีภาวะมะเร็งปากมดลูกพบค่าความเสี่ยงในการเกิดโรค (OR) ประมาณ 130.6 (95% CI 11.7–1457.0) เมื่อมีการติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV และมีรายงานว่า ค่า ORs ของการติดเชื้อ HPV 16, 18 and 16/18 กับการมีภาวะมะเร็งปากมดลูกคือ 12.3, 3.2 and 15.7 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV [19] อย่างไรก็ตาม ปริมาณของไวรัส (viral load) อาจจะมีผลในการตรวจวินิจฉัยได้ เช่นใน ระยะที่มี low viral load จะไม่พบหลักฐานการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แต่ในระยะที่มี high viral load จะมีผลที่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ภาว่ดังกล่าวนี้จะอธิบายผลการตรวจพบ HPV DNA ในเซลล์ปกติได้ ซึ่งเซลล์ที่มี low viral load ดังกล่าวนี้อุบัติการณ์การตรวจพบภาวะของเซลล์ผิดปกติได้ (accumurate risk) ร้อยละ 25-40 ที่ 1-3 ปีหลังการตรวจพบ HPV DNA จึงเป็นอีกภาวะหนึ่งของการเกิด persistent infection[20]

Persistent infection หมายถึงการพบ HPV DNA ชนิดเดียวกันในการตรวจ 2 ครั้งหรือมากกว่า [21, 22] และอาจจำแนกตามระยะเวลาของการกำจัดโรค (clearance duration) [23-25] หรือ จำแนกตามระยะเวลาที่มีการติดเชื้อ HPV [26, 27] โดยการให้คำจำกัดความของคำว่า persistent HPV infection นั้นขึ้นกับวิธีการตรวจวินิจฉัย, testing intervals และ HPV categorization-status for analysis (type-specific; non-type-specific HPV persistence) ที่แตกต่างกัน

จากผลการศึกษาในปัจจุบันพบว่า HPV persistent infection จะเป็นกลุ่มเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกเนื่องจากผลของโปรตีน E6/E7 (oncoproteins) ที่ไวรัสสร้างขึ้นมาในระหว่างดำรงชีวิต (viral life cycle) และมีภาวะที่สร้างขึ้นผิดปกติ จะทำให้เซลล์โฮสต์เกิดมี chromosome instability ขึ้น ซึ่งอาจเป็นปัจจัยส่งเสริมการแทรกตัวของ viral genome เข้าสู่ DNA ของโฮสต์ (viral integration) การติดเชื้อ HPV จึงอาจพบได้สองรูปแบบคือ episomal และ integrated form ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่มี และมีการแทรก genome (viral integration) ของไวรัสเข้าไปในโฮสต์โครโมโซมตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่มีการติดเชื้อ HPV ที่มีภาวะการติดเชื้อเป็น episomal form เป็นกลุ่มที่สามารถเกิด spontaneous regression ได้เป็นส่วนใหญ่ อาจพบภาวะ mixed form (episomal and integrated form) ได้บ้างในการติดเชื้อ HPV เนื่องจากการเกิดภาวะ persistent infection พบได้นาน 1-10 ปี จึงเชื่อว่าการพัฒนาไปเป็นมะเร็งจะเกิดขึ้นได้ในช่วงระยะเวลาดังกล่าวในกลุ่มที่มี pre-cancerous คือในช่วงอายุ 25-30 ปี โดยพบว่าหลังจากการติดเชื้อ HPV จะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผิดปกติในระดับ CINIII ในช่วงเวลา 7-15 ปี แต่ก็อาจพบเซลล์ผิดปกติชนิด CINII และ CINIII ได้รวดเร็วภายในระยะเวลาเป็นเดือน [28]

เมื่อเกิดภาวะเซลล์ผิดปกติในระยะ CINIII หรือ precancerous โอกาสที่จะเกิด regress จะน้อยลง และการที่จะทำให้เซลล์ติดเชื้อที่มีภาวะ persistent เปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งพบว่าต้องอาศัยปัจจัยร่วมซึ่งยังคงไม่ชัดเจน

การป้องกันมะเร็งปากมดลูก: การตรวจคัดกรองและการวินิจฉัย

ปัจจุบัน มี prophylactic HPV vaccines 2 ชนิด ได้แก่ bivalent HPV 16/18 ผลิตโดย GSK และ quadrivalent HPV 6/11/16/18 ผลิตโดย Merck [4] ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Gardasil Gardasil สามารถป้องกันการเกิดมะเร็ง ภาว่ก่อนมะเร็ง การติดเชื้อหูดหงอนไก่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ จากเชื้อ HPV ที่ตรงกับสายพันธุ์ (type) เป้าหมายของวัคซีน วัคซีนทั้ง 2 ชนิดสามารถป้องกันการติดเชื้อจำเพาะ type นั้นได้ประมาณร้อยละ 100 แต่ป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้ประมาณร้อยละ 70 โดยวัคซีนไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อ HPV type อื่นได้ (ยกเว้น cross ปฏิกริยา) ปัจจุบันวัคซีนยังมีราคาแพงและยังไม่อยู่ในโปรแกรมการฉีดวัคซีน การฉีดวัคซีนจะไม่ได้ผลและลดประสิทธิภาพลงในผู้ที่ติดเชื้อ HPV type นั้นๆ แล้ว ซึ่งการติดเชื้อในผู้ที่ไม่แสดงอาการผิดปกติของเซลล์ปากมดลูก หรือเป็น persistent infection โดยเชื่อว่าน่าจะมีกว่า 100 ล้านคนในกลุ่มประชากรดังกล่าว ปัจจุบันเชื่อว่า การเกิดมะเร็งปากมดลูกมีสาเหตุมาจากภาวะ persistent infection ร่วมกับปัจจัยส่งเสริมอื่น ซึ่งจะทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อกลายเป็นมะเร็งในระยะเวลา 3-20 ปี อุบัติการณ์การติดเชื้อสูงจะพบได้

ในช่วงอายุ 20 ปี อุบัติการณ์ของเซลล์ผิดปกติ precancerous CINIII พบได้บ่อยในช่วงอายุ 30 ปี และการเกิดมะเร็งจะพบได้บ่อยขึ้นในช่วงอายุ 40 ปี จึงพบว่าร้อยละ 1 ของผู้ติดเชื้อ HPV จะมีโอกาสเป็นมะเร็งปากมดลูก เพราะฉะนั้น การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก (cervical cancer screening) ซึ่ง เป็นการตรวจหาความผิดปกติตั้งแต่แรกๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อปากมดลูก เพื่อที่จะวินิจฉัยและรักษาก่อนที่จะรุกรานโรค นั้นจะกลายเป็นมะเร็ง จึงมีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในการลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งและการตายจากมะเร็งปากมดลูก ในผู้ที่ยังไม่ได้รับการฉีดวัคซีน และยังมีความสำคัญแม้ในผู้ที่ฉีดวัคซีนแล้วก็ตาม

การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก เป็นการตรวจหาความผิดปกติตั้งแต่แรกๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อปากมดลูก เพื่อที่จะวินิจฉัยและรักษาก่อนที่จะรุกรานโรค นั้นจะกลายเป็นมะเร็ง การตรวจคัดกรองจึงมีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในการลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็ง และการตายจากมะเร็งปากมดลูกโดยเฉพาะในผู้ที่ยังไม่ได้รับการฉีดวัคซีน หรือแม้แต่ในผู้ที่ฉีดวัคซีนแล้วก็ตาม การตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกและการวินิจฉัยโรคก่อนที่จะเป็นมะเร็งปากมดลูกยังคงมีประโยชน์อยู่ทั้งในปัจจุบันและในอนาคต

Papanicolaou (Pap) smear (ซึ่งได้นำมาใช้ตั้งแต่คริสต์ศตวรรษที่ 20) และ Liquid base cytology (เทคนิคใหม่ในการเตรียมเซลล์) ได้นำมาใช้ตรวจคัดกรองเซลล์มะเร็ง ส่งผลให้อัตราการเกิดโรคลดลงได้ในประเทศพัฒนาแล้ว (ร้อยละ 75) แต่อัตราการเกิดโรคมะเร็งยังคงพบสูงหรือคงที่ในประเทศกำลังพัฒนาและยากจน ผลการตรวจทางด้านเซลล์ (cytology) หรือ conventional cytology หรือ Papanicolaou (Pap) smear จากการศึกษาแบบ meta-analysis ของ Nanda และคณะ (2000) และ Xiuyu Cong และคณะ (1995) ในการ detect high-grade cytology (CIN2) มี sensitivity และ specificity เท่ากับร้อยละ 30-87 และร้อยละ 86-100 [29], ร้อยละ 49-67 และร้อยละ 62-77 [30] ตามลำดับ วิธี liquid based cytology (LBC) มี sensitivity และ specificity ในการ detect high-grade cytology (HSIL+CA) เท่ากับ ร้อยละ 87.7 และร้อยละ 85.4 [31] และจากการศึกษาแบบ meta-analysis ในปี 2008 Arbyn M. และคณะได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธี conventional และ liquid-based sample เทียบกับ gold standard colposcopy และ histology ของ colposcopy-targeted biopsies พบว่า sensitivity และ specificity ในการ detect high-grade cytology (CIN2) เท่ากับร้อยละ 46.3-67.2 และร้อยละ 93.8-98.6 [32] จากข้อมูลนี้กล่าวมาพบว่าค่าความไวในการตรวจในแต่ละวิธีมีความแตกต่างกันมาก การแปลผลจึงผิดพลาดสูง นอกจากนั้นการเข้าถึงโครงการตรวจคัดกรองยังมีอัตราต่ำในประเทศกำลังพัฒนารวมทั้งในประเทศไทย การมีระบบการส่งต่อเมื่อตรวจพบเซลล์ผิดปกติ การพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความแม่นยำและราคาถูกเพื่อนำไปใช้ในการตรวจคัดกรอง จะเป็นปัจจัยทำให้ลดอัตราการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้ ในปัจจุบันจึงมีวิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1

Performance and characteristics of different screening methods

Screening test	Sensitivity	Specificity	Characteristics
Conventional cytology ^a	Moderate (44–78%)	High (91–96%)	Requires adequate healthcare infrastructure; laboratory based; stringent training and quality control
HPV-DNA testing ^a	High (66–100%)	Moderate (61–96%)	Laboratory based; high throughput; objective, reproducible and robust; currently expensive
Visual inspection methods ^a			Low technology; low cost
VIA	Moderate (67–79%)	Low (49–86%)	Linkage to immediate treatment possible; suitable for low-resource settings
VIIAM	Moderate (62–73%)	Low (86–87%)	
VILI	Moderate to high (78–98%)	Low (73–93%)	
Colposcopy	Low (44–77%)	Low (85–90%)	Expensive; inappropriate for low-resource settings
Polar Probe	Moderate (67–74%)	Low (65–72%)	High technology but gives immediate result and could be linked to immediate treatment

HPV-DNA testing จะเป็นวิธีทาง molecular และนำมาใช้มากขึ้น เช่น วิธี Hybrid Capture 2 (HC2) Digene มี sensitivity และ specificity ในการ detect high-grade cytology (CIN2+) เท่ากับร้อยละ 100 และร้อยละ 43.7 ตามลำดับ [3], วิธี PCR-based methods มี sensitivity และ specificity ในการ detect high-grade cytology (CIN2+) เท่ากับร้อยละ 98.5 และ

ร้อยละ 26.8 [31] และวิธี ISH มี sensitivity และ specificity ในการ detect high-grade cytology (CIN2+) เท่ากับร้อยละ 44.6 และร้อยละ 82.9 [31] และเนื่องจากการตรวจหา HPV DNA สามารถทำได้หลากหลายเทคนิค จึงมีความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยเซลล์ผิดปกติได้ต่างกันมาก ปัจจุบันในประเทศไทยพัฒนาแล้วในบางประเทศได้นำวิธีนี้ตรวจร่วมกับ cytology โดยเฉพาะการวินิจฉัยร่วม Triage cytology with equivocal cytology หรือใน low grade abnormality จะทำให้ผลการตรวจมีความไวเพิ่มขึ้นแต่จะมีผลทำให้ความจำเพาะในการตรวจลดลง [33]

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าการตรวจคัดกรองด้วยวิธีดังกล่าว ล้วนมีข้อจำกัดทั้งด้าน sensitivity และ specificity ถึงแม้จะใช้เทคนิคมากกว่า 1 วิธีร่วมกันในการตรวจ เช่น ตรวจ Pap smear ร่วมกับ HPV DNA [34] หรืออาจใช้ biomarker เช่น p16 ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยเนื้อเยื่อ แต่ปัญหาคือ แม้คนที่ได้รับการตรวจคัดกรองยังมีโอกาสเป็นมะเร็งและวินิจฉัยผิดพลาดได้ และไม่สามารถพยากรณ์โรคในระยะแรกๆ ได้ เนื่องจากการติดเชื้อ HPV ที่เป็น persistent infection ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก จากการศึกษาในคนที่มีความ negative cytology ที่มีอายุ 20-29 ปี พบมีการพัฒนาไปเป็น high grade lesion ได้ 28.4 เท่า มากกว่าผู้ที่ไม่มี persistent infection [35] แต่การติดเชื้อ HPV ไม่ได้บ่งบอกว่าจะเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งทุกคนเสมอไป โดยร้อยละ 70-80 [36, 37] ของสตรีที่มีเพศสัมพันธ์จะมีการติดเชื้อที่ช่วงใดช่วงหนึ่งของชีวิตและส่วนใหญ่จะหายไปเอง มีจำนวนเล็กน้อยที่จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลง cervical tissue ไปเป็น LSIL และ ประมาณร้อยละ 11 ของ LSIL จะพัฒนาไปเป็น HSIL และมีจำนวนหนึ่งพัฒนาไปเป็น carcinoma [38] ในสตรี 1 ล้านคนหากติดเชื้อ HPV แล้วประมาณร้อยละ 10 (100,000 คน) จะเกิดรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกและประมาณร้อยละ 8 (8,000 คน) ที่รอยโรคนี้อย่างคงอยู่ และประมาณ 1,600 คน จะกลายเป็นมะเร็ง [37]

แนวทางการพัฒนาวิธีใหม่ในการตรวจหาความผิดปกติของเซลล์ก่อนเป็นมะเร็ง

การตรวจหา HPV E6/E7 mRNA over-expression

การแสดงออกอย่างต่อเนื่อง (persistent expression) ของ oncogenes E6/E7 พบมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงเซลล์ไปเป็นมะเร็ง ดังนั้นการตรวจพบ mRNA E6/E7 ไม่เพียงแต่บ่งบอกสถานะการติดเชื้อแต่ยังใช้บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงเซลล์ตามความรุนแรงที่เพิ่มขึ้นได้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจพบ HPV-DNA [39]

ในปี 2005 Scheues ME และคณะได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ HPV16 และ 18 E7 mRNA กับระดับของ cervical dysplasia โดยใช้ตัวอย่างจาก cervical cytobrush specimen ของผู้หญิงที่เป็น abnormal Pap smear โดยวิธี quantitative real time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) ซึ่งจากการทดลองสรุปว่า prevalence ของ mRNA ในสตรีปกติพบประมาณร้อยละ 27 ซึ่งพบน้อยกว่า LSIL (ร้อยละ 40) และ HSIL (ร้อยละ 37), ($P=0.008$) และบ่งชี้ว่า mRNA อาจเพิ่มขึ้นตามระดับความรุนแรงของ abnormal cell ดังนั้นการตรวจหา HPV mRNA อาจเป็นวิธีที่ดีในการตรวจคัดกรองผู้หญิงที่อาจจะมีการ progression ไปเป็น HSIL หรือ invasive carcinoma[38]

ในปี 2009 Helen K และคณะได้ทำการศึกษาการเปรียบเทียบ ใน cytological specimen โดยใช้ E6/E7 method PreTect™ HPV-Proofer กับวิธี HC2 พบว่าวิธี E6/E7 method PreTect™ HPV-Proofer สามารถ predict ระดับรอยโรคได้ดีกว่า HC2 เพราะฉะนั้น การตรวจหา E6/E7 mRNA ของ HR-HPV อาจแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของ abnormal cell หรือ pre-cancer cell ไปเป็นมะเร็งและบ่งบอกระดับความรุนแรงของรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ [3]

การตรวจหา E6/E7 mRNA ของ HR-HPV ที่มีในปัจจุบัน ได้แก่ northern hybridization, ISH, reverse-transcriptase PCR, nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) ยกตัวอย่าง brand names เช่น 1. PreTect™ HPV-Proofer และ 2. NucliSEN EasyQ® ซึ่งมี sensitivity และ specificity ในการ detect high-grade cytology (CIN2+) เท่ากับร้อยละ 71.4 และร้อยละ 75.8 [3], ร้อยละ 76 และร้อยละ 63 [40] ตามลำดับ และ branched DNA (bDNA) ISH

ปัจจุบันมีข้อมูลที่บ่งชี้ว่า การ integrate และการ express E6/E7 oncogene ของ HR-HPV เป็นปัจจัยเสี่ยงในการทำให้พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปากมดลูกเปลี่ยนแปลงไปจนอาจทำให้เกิดมะเร็ง โดย HR-HPV ส่วนใหญ่ จะ integrate subgenomic fragment เข้าสู่ host cell chromosomal DNA (integrate form) ซึ่ง HPV จะยังคงสามารถเพิ่มจำนวน subgenomic fragment ได้ เมื่อมี HPV plasmid (episomal form) อยู่ในเซลล์เดียวกัน HR-HPV จะชักนำให้ HPV subgenomic fragment locus เกิดการ re-replicate จากจุด origin และสร้างโปรตีนออกมาจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่ host cell เกิดการ apoptosis ตายไปหรือเกิดการ damage บริเวณนั้นเพื่อ repair gene ให้ถูกต้องโดย recombination mechanism แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากการ re-replicate ของ integrate HPV แล้วยังพบการเกิด duplication ภายใน HPV locus, extra chromosomal copy ของ HPV loci และเกิด cross chromosomal translocation [1, 2] เป็นผลให้การ express ของ E6/E7 oncogene ผิดปกติไป การแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของ HR-HPV E6/E7 oncogene จะมีผลต่อการ disrupt ของ p53 และ pRb tumor suppression pathway จะนำไปสู่การเข้าสู่ S phase ของ cell cycle เกิดการ replicate และ cell cycle progression โดยที่ loss function ของ checkpoint G1/S, G2/M นำไปสู่การสะสมความผิดปกติของยีนและโครโมโซม (chromosomal instability) ผลคือ เกิด cell transform, cell immortalization และมะเร็ง

การตรวจหา Human chromosomal instability and human mRNA overexpression

Microarray analysis หรือ genome wide expression หรือ comparative genomic hybridization (CGH) microarray analysis เป็นเทคนิคใหม่ที่ถูกนำมาใช้วิเคราะห์หา candidate gene เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจ ในปัจจุบันได้นำเทคนิคนี้มาตรวจหาในมะเร็งปากมดลูกโดยตรวจหาจีนที่มีการแสดงออกที่มากผิดปกติหรือน้อยกว่าปกติโดยมีการศึกษาเปรียบเทียบในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง โดยศึกษาหาการแสดงออกในจีน proliferation gene, gene encoding adhesion molecule, matrix protein เป็นต้น

จากการศึกษาโดย CGH microarray analysis ในเซลล์มะเร็ง squamous cell carcinoma และ adenocarcinoma [41] พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นผิดปกติของ 1q21-31, 3q12-28 และ 20q11-13 และพบการสูญหายไปของ 11q22-25 และ 13q14-21 และจากการศึกษาโดยใช้วิธี multiplex ligation dependent probe amplification พบว่ามี copy number ของจีนที่ 20q11-q12 เพิ่มขึ้น

Chromosomal instability อาจเกิดขึ้นในระดับเบสหรือระดับโครงสร้างโครโมโซม โดยการ deletion, duplication และ amplification ในบางบริเวณของ genomic DNA โดยจะเห็นได้ชัดเจนจากการตรวจด้วยวิธี fluorescence *in situ* hybridization (FISH) methods [1] โดยมีการศึกษาดังนี้

ในปี 2003 Athanassios D และคณะ ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลง DNA copy number ใน 22 cervical adenocarcinoma (AC) โดยวิธี CGH (Comparative genomic hybridization) ผลการทดลองพบว่าเกิด DNA sequence gains ใน โครโมโซมคู่ที่ 17q (ร้อยละ 54) และเกิด DNA sequence losses ที่ chromosomes Xq (ร้อยละ 50), Xp (ร้อยละ 36), 18q (ร้อยละ 36) และ 4q (ร้อยละ 36) เพราะฉะนั้นการเกิด chromosomal copy number gains บนโครโมโซมคู่ที่ 17q และ losses tumor suppressor genes บนโครโมโซมคู่ที่ 18q อาจบ่งบอกถึงการ progression ของทั้ง cervical AC และ cervical squamous cell carcinoma [42]

ในปี 2005 Alessandro DS และคณะ ทำการศึกษา Gene expression profiles โดยเปรียบเทียบ 11 primary HPV16, HPV18-infected early stage IB-IIA cervical cancers กับ normal cervical epithelium โดยใช้ oligonucleotide microarrays expression of 14,500 known genes พบ 240 up-regulation over expressed genes เช่น CDKN2A/p16, v-Myb, PTGES และ TOP2A และ 265 down regulate เช่น transforming growth factor beta 1, transforming growth factor alpha, และ cadherin 13 โดย candidate molecular markers อาจใช้ในการวินิจฉัย และรักษา cervical cancer [43] oncogene

E6/E7 ของ HPV ยังมีผลทำให้มีการแสดงออกที่มากเกินไปของ p16 ซึ่งเป็น cyclin dependent kinase[44] inhibitor และเป็น biomarker ที่ใช้บอกภาวะผิดปกติของเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV ได้ในเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติในระดับ CIN III

จากผลการศึกษาที่กำลังมีมากขึ้นเนื่องจากการพัฒนาเทคนิคให้ดีขึ้น จะทำให้สามารถวินิจฉัย host cell biomarker เพื่อนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปได้ควบคู่ไปกับการใช้ marker ของไวรัสอย่างเดียว และเนื่องจาก chromosomal instability อาจเกิดขึ้นในระดับเบสหรือระดับโครงสร้างโครโมโซม โดยการ deletion, duplication และ amplification ในบางบริเวณของ genomic DNA ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึง การเปลี่ยนแปลงของ copy number ของ gene ใน high grade lesion dysplasia และมะเร็ง อีกทั้งเมื่อจีนหรือโครโมโซมเกิดความผิดปกติขึ้นก็จะชักนำให้เกิดการแสดงออกของจีนที่ผิดปกติไปด้วยโดยไปเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ RNA และ protein จึงอาจใช้ human DNA, RNA และ protein เพื่อเป็น biomarker ใช้บ่งบอกความผิดปกติในรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ แต่ปัจจุบันยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนของ host cell biomarker ที่มีความเกี่ยวข้องกับรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก ดังนั้นการศึกษากการ deletion, duplication และ amplification ของ human chromosome ในรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกจึงมีความจำเป็น

การตรวจหา Human microRNA expression

Host cell มีการสร้าง microRNA (miRNA) ซึ่งเป็น small non-coding RNAs ขนาด 18-24 nucleotide ซึ่งโดยส่วนมากมักจับกับ 3' end ของ mRNA ทำหน้าที่เป็น post-transcriptional regulators ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและทำลายสาย mRNA มีผลเป็น negative regulators gene expression โดยจับกับ mRNA คู่สม และ repressing translation หรือ enhance mRNA degradation miRNA จะ transcript ใน nuclease และ ถูก process ให้เป็น RNA สายเดี่ยวโดย RISC การ expression ที่แตกต่างกันของ miRNA มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งหลายชนิดรวมทั้งมะเร็งปากมดลูก

ในปี 2006 Xuezhong C และคณะได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ microRNA ในช่วง latent period และ productive virus replication phases ของ human papillomavirus genotype 31 (HPV31) replication cycle โดยสกัด RNA จาก undifferentiated and differentiated LKP1 cells และทำ cDNA clone จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย DNA sequence analysis ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ microRNAs ของ host cell มากกว่า 500 ตัวโดยไม่พบ HPV31-specific microRNA ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า HPV31 (และมีความเป็นไปได้ว่า human papillomaviruses type อื่นๆ ด้วย) ไม่มีการแสดงออกของ viral microRNAs [53]

ในปี 2008 Jeong WL และคณะทำการศึกษา miRNA expression profile in Cervical Carcinomas in 10 early stage invasive squamous cell carcinomas (ISCC) และ 10 normal cervical squamous epithelial specimens โดยใช้ TaqMan real-time quantitative PCR array ผลปรากฏว่ามี 157 miRNAs overexpression และมี 70 miRNA (68 up-regulated และ 2 down-regulated) มีแสดงออกใน ISCCs และ normal แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดย miR-199-s, miR-9, miR-199a*, miR-199a, miR-199b, miR-145, miR-133a, miR-133b, miR-214, and miR-127 มีการแสดงออก >100 ($P < 0.0001$) ตรงข้ามกับ miR-149 (2.974-fold change) and miR-203 (3.704-fold change) แสดง significant down-regulation โดยการเพิ่มการแสดงออกของ miR-127 มีความเกี่ยวข้องกับการ metastasis ของ lymph node ($P = 0.006$) และ anti-miR-199a แสดงการ inhibit cell growth และตอบสนองต่อ chemotherapeut ใน in vitro ซึ่งจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า miRNA มีบทบาทในการเกิดมะเร็งใน cervical squamous cells ซึ่งอาจใช้เป็น new candidate targets หรือใช้พยากรณ์ strategies ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกได้ [54]

ในปี 2008 Wang X และคณะทำการศึกษาการ Expression ของ Oncogenic และ Tumor-Suppressive MicroRNAs ใน Cervical Cancer Is Required for Cancer Cell Growth MicroRNAs (miRNAs) มีบทบาทสำคัญใน cancer development โดย cloning และ sequencing HPV16+ CaSki cell small RNA library ผลการทดลองพบ 174 miRNAs จาก 363 clone (รวมทั้ง

novel miR-193c) แบ่งเป็น miRNA 46 ชนิด เช่น miR-21, miR-24, miR-27a, and miR-205 โดยทั้งหมดเป็น cellular miRNA ไม่พบ HPV16-derived miRNA จากการทดลองโดยใช้ miRNA array analyses ร่วมกับ northern blot เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ normal cervix และ cervical cancer tissues พบว่ามีการลดการแสดงออกของ miR-126, miR-143 และ miR-145 และมีการเพิ่มการแสดงออกของ miR-15b, miR-16, miR-146a และ miR-155 โดย miR-143 และ miR-145 สามารถยับยั้ง cell growth ได้และ miR-146a อาจมีบทบาทในการส่งเสริม cell proliferation ซึ่งจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการ downregulation ของ miR-143 และ miR-145 และการ upregulation ของ miR-146a มีบทบาทใน cervical carcinogenesis [55]

ในปี 2008 Martinez I และคณะได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ miRNA โดยใช้ Ambion arrays, quantitative real-time PCR และ Northern blot analyses แสดงให้เห็น 3 miRNA over-express และ 24 under-express ใน cervical cell line ที่มี integrate HPV16 DNA เมื่อเปรียบเทียบกับ normal cervix หรือมี 9 miRNA over-express และ 1 under-express (miRNA-218) ใน cervical cell line ที่มี integrate HPV16 DNA เมื่อเปรียบเทียบกับ HPV-negative CaCx cell line C-33A โดย microRNA-218 (miR-218) นี้มีความจำเพาะเพราะพบ under-express ได้ทั้งใน HPV positive cell lines, cervical lesions และ cancer tissues ที่มี HPV16 DNA เมื่อเทียบกับทั้ง C-33A และ normal cervix และผลจากการศึกษาหน้าที่ของ miR218 พบว่า การ downregulate miR-218 โดย E6 ส่งผลต่อ LAMB3 over-expression ซึ่งการแสดงมากเกินไปของสารนี้จะส่งเสริมให้ viral infection แพร่กระจายไป tissue ข้างเคียง, cell migration และเกิด tumorigenesis[45] miR-218 จึงเป็น mRNA ที่มีบทบาทสำคัญการควบคุม cell migration

ในปี 2009 Qing Y และคณะ ทำการศึกษายบทบาทของ MicroRNA-21 ในการส่งเสริม cell proliferation และบทบาทของ MicroRNA-21 ในการไปลดการแสดงออกของ programmed cell death 4 (PDCD4) โดย construct miR-21 expression plasmids และ transfect เข้าสู่ HeLa cervical carcinoma cells ซึ่งจากการทดลองพบว่าการยับยั้งการแสดงออกของ miR-21 ใน HeLa cervical cancer cells สามารถยับยั้ง cell proliferation และยังทำให้การแสดงออกของ tumor suppressor gene PDCD4 เพิ่มขึ้นอีกด้วย และจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า miR-21 มีบทบาท ในกระบวนการเกิดมะเร็งปากมดลูกและอาจใช้เป็น target ในการรักษา [56]

ในปี 2010 Xiaoxia H และคณะได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ miRNA ใน 102 cervical carcinomas โดยใช้ miRNA expression profiling with real-time reverse transcription-PCR arrays พบว่า miR-200a และ miR-9 สามารถ predict อัตราการ survival ของผู้ป่วยได้ ซึ่งทั้ง miR-200a และ miR-9 มีบทบาทในการควบคุมมะเร็ง โดยอาจมีความเป็นไปได้ว่า miR-200a จะมีผลต่อการยับยั้งการ metastasis ซึ่งคาดว่า miR-200a อาจจะเป็น therapeutic delivery เพื่อเป็น new treatment strategy สำหรับการควบคุม มะเร็งจากการนำเทคนิคใหม่ๆ มาศึกษาหา host cell mRNA เช่น การแสดงออกของ miRNA ทำให้เข้าใจถึงกลไกการเกิดมะเร็งได้ดียิ่งขึ้น [46] นอกจากนี้แล้วการ up-regulate หรือ down-regulate ของ miRNA ยังอาจใช้เป็น biomarker ที่ใช้บอกภาวะผิดปกติของเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV ในเนื้อเยื่อที่มีความผิดปกติได้ถูกต้องแม่นยำได้ยิ่งขึ้น การศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจ miRNA จึงเป็นเทคนิคใหม่ที่ต้องพัฒนาต่อไปเพื่อนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองหรือบ่งชี้โรคร้ายก่อนที่กลายเป็นเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ และจากการแสดงออกของ miRNA จะมีความแตกต่างกันเมื่อใช้ cell line ต่างชนิดกัน หรือใช้เซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน ซึ่งหากต้องการนำข้อมูลการแสดงออกของ miRNA ไปใช้บางครั้งจึงไม่สามารถทำได้เนื่องจาก cell ที่ใช้ต่างชนิดกัน หรืออาจกล่าวได้ว่าข้อมูลการแสดงออกของ miRNA ยังมีไม่มากและไม่ครอบคลุม ดังนั้นการศึกษารูปแบบของการแสดงออกของ miRNA ในเซลล์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็น biomarker จึงมีความจำเป็นเป็นอย่างมาก เพื่อให้เกิดความเข้าใจกลไกในการแสดงออกของ miRNA อย่างถูกต้องแท้จริง

In situ hybridization (ISH)

Technique ที่ใช้ในการบ่งชี้ระดับของ DNA, RNA ใน cell หรือ ในเนื้อเยื่อผิดปกติที่เป็นที่ยอมรับคือ ISH ซึ่งเป็น techniques ที่สามารถบอกตำแหน่งของ target nucleic acid ในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อ ที่มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้อย่างแท้จริง

ซึ่งเดิม ISH มี sensitivity ในทาง clinic ต่ำ ต่ำ ไม่เหมาะแก่การนำไปใช้ [47] จึงนำไปสู่วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ คือ การศึกษาความสัมพันธ์ของ ISH HPV กับ ความผิดปกติของ gene บนโครโมโซมร่วมกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องอื่นๆ รวมไปถึงความสัมพันธ์ของ การแสดงออกของ HPV E6/E7 mRNA และ HPV16 induced human miRNA ที่จะสามารถบ่งบอกระดับของรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก โดยพัฒนา ISH techniques โดยใช้ specific และ common probe ที่ label ด้วย non-isotope และ fluorescence dye เพื่อใช้ตรวจหาการแสดงออกของ HPV E6/E7 mRNA และ miRNA ใน FFPE และใน cervical cell ซึ่ง techniques นี้จะสามารถแสดงความสัมพันธ์ของ HPV E6/E7mRNA และ miRNA กับ การเกิดพยาธิสภาพอย่างแท้จริง ซึ่งการวิจัยจะสามารถแก้ปัญหา sensitivity และ specificity ของการตรวจคัดกรอง การวินิจฉัย และการไม่สามารถพยากรณ์โรคในตั้งแต่ระยะแรกๆ ได้ เช่น ในปี 2008 Gerard J. Nuovo และคณะได้ทำวิเคราะห์ in situ detection ในการตรวจหา precursor และ mature microRNAs ใน paraffin embedded, formalin fixed tissues (FFPE) และวิธีการเตรียม cell ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การตรวจหา inactive precursor miR สามารถทำได้โดยวิธี RT in situ PCR ซึ่งสามารถตรวจได้ one copy pre-miR /cell และการตรวจหา mature miR สามารถทำได้โดยวิธี ISH โดยใช้ labeled probe ที่มีการ modify nucleotides ไปบางส่วนที่เรียกว่า locked nucleic acid (LNA) probe [57]

การพัฒนา ISH techniques จะช่วยเพิ่ม sensitivity ของ ISH และ ISH จะเพิ่มความถูกต้อง (specificity) ในการวินิจฉัยรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก โดยที่ PCR-based method ไม่สามารถทำได้ และยังสามารถพยากรณ์การ progression และ regression ของโรค ซึ่ง HPV DNA -based method ไม่สามารถทำได้เช่นเดียวกัน และยังอาจนำ techniques ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกได้ด้วย ซึ่ง techniques ที่ถูกพัฒนาขึ้นจะมีประโยชน์ทั้งในยุค vaccine era ที่มีทั้งผู้ที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีนและผู้ที่ได้รับการฉีดวัคซีนแล้ว และ หลัง vaccine era ซึ่งประชากรส่วนใหญ่ได้รับการฉีดวัคซีน การศึกษานี้จึงต้องพัฒนาการสกัด RNA ทั้งใน FFPE และ cervical cell เพื่อใช้ศึกษาเปรียบเทียบ และเพื่อประเมินความไวและความจำเพาะของวิธีการที่พัฒนาขึ้น

โดยคาดหวังว่าการศึกษานี้จะนำไปใช้ทดสอบสมมุติฐานที่ว่า ถ้าการแสดงออกของ HR-HPV E6/E7 mRNA มีความแตกต่างกันในแต่ละระดับของรอยโรค (lesion grade) และเป็นปัจจัยเสี่ยงในการ progression ของโรคแล้ว HPV physical status, HPV E6/E7 mRNA, human chromosome copy number และ HPV16 induced human miRNA และปัจจัยอื่นๆ ที่แสดงออกในแต่ละ lesion grade ของ cervical lesions จะสามารถใช้ในการ วินิจฉัย และพยากรณ์โรคได้

3. วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

1. การเก็บตัวอย่างตรวจ

ตัวอย่างตรวจที่ใช้คือ ชิ้นเนื้อปากมดลูกที่เป็น formalin - fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE) ซึ่งได้รับการวินิจฉัยทางด้าน histology เป็น มะเร็งปากมดลูก โดยใช้ตัวอย่างจาก the University of Vermont, USA

2. การสกัด DNA

สกัด DNA จาก samples ตามวิธีการสกัด genomic DNA จาก FFPE Tissue section โดยนำตัวอย่าง FFPE มาทำการ deparaffinization เติม Xylene เพื่อละลาย paraffin เติม absolute ethanol เพื่อล้าง xylene เมื่อทำ deparaffinization เสร็จก็ทำการสกัด DNA ตามวิธีของ QIAamp DNA Mini Kit เก็บ DNA ที่ -20 °C เพื่อนำมาใช้ทดสอบหา HPV-DNA ในขั้นตอน PCR ต่อไป

3. การตรวจหาภาวะการติดเชื้อ และ HPV physical status โดยวิธี ISH

ตัดชิ้นเนื้อจาก FFPE ทำ deparaffinization, retrieve target DNA , digest protein และยับยั้ง endogenous peroxidase โดย hydrogen peroxide ใส่ cocktails probes ที่จำเพาะกับ HR-HPV DNA เพื่อให้ probe hybridize กับ target DNA และตรวจสอบ hybrid ที่เกิดขึ้นโดย chromogenic method [51]

ผลการตรวจ จะดู signal ที่เกิดขึ้นในนิวเคลียส ถ้าเป็น diffuse form จะแปลผลว่ามีการติดเชื้อ และมี physical status แบบ episomal form ถ้าเป็น punctuate form หลายๆจุด จะแปลผลว่ามีการติดเชื้อและมี physical status แบบ integrated form

4. การตรวจหาความผิดปกติ ของ human chromosome loci โดยวิธี ISH

ตรวจหา human chromosome status ใน cervical cancer samples ด้วยวิธี Chromogenic *In situ* hybridization (CISH) โดยใช้ specific probe ต่อ centromere 3, 7, 11, 17 เพื่อ ตรวจหาจีนที่เพิ่มขึ้น, หายไป โดยเตรียม ตัดชิ้นเนื้อจาก FFPE ทำ deparaffinization, retrieve target DNA , digest protein ใส่ probe ทำการ hybridize probe กับ target DNA, detect signal ของ hybrid โดยใช้ microscope หาค่าความผิดปกติที่ [42, 52]

ผลการทดลองที่ได้จะยืนยันการผิดปกติของตัวอย่างที่ใช้และสัมพันธ์กับการติดเชื้อ HPV เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาเทคนิคต่อไป

5. การตรวจหาการแสดงออกของ HPVE6/E7 mRNA ใน FFPE samples โดย CISH technique

ตัดชิ้นเนื้อจาก FFPE ทำ deparaffinization, retrieve target DNA , digest protein และยับยั้ง endogenous peroxidase โดย hydrogen peroxide ใส่ probes ที่จำเพาะกับ HPV E6/E7 mRNA เพื่อให้ probe hybridize กับ target mRNA และตรวจสอบ hybrid ที่เกิดขึ้นโดย chromogenic method [51] โดยใช้ CISH technique (ACD technology)

6. การตรวจหาการแสดงออกของ human protein ใน FFPE samples โดย IHC technique

ตรวจหาการแสดงออกของ protein โดยวิธี IHC (เช่น p16, Ki67, p-ERK1/2, pAKT, p m-TOR, VEGF etc.)

7. Data analysis

เพื่อได้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ HPV ISH signals (episomal, integrated และ mix form), HPV mRNA E6/E7 ต่อ human chromosomes loci, human protein ปัจจัยอื่นๆ เช่น อายุ การใช้ยาคุมกำเนิด การสูบบุหรี่ โดยใช้ SPSS program for windows และ significance ที่ $P < 0.05$

4. ผลการวิจัย (Result)

4.1 การเก็บตัวอย่างตรวจ

ตัวอย่างตรวจที่ใช้คือ ชิ้นเนื้อจากมะเร็งปากมดลูกที่เป็น formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue แล้วนำมาเตรียมเป็น tissue microarray (TMA) blocks ซึ่งได้รับการวินิจฉัยทางด้าน histology เป็น มะเร็งปากมดลูก คือ well, moderate and poor-differentiate โดยใช้ จำนวนตัวอย่าง ทั้งหมด 125 ตัวอย่าง

จากข้อมูลพบว่า ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกมีอายุเฉลี่ย (ค่า Mean) เท่ากับ 49.176 ปี (SD เท่ากับ 12.89 ปี) และพบว่า 81/102 (79.41%) เป็น lymph node negative (Table 1)

Table1 Association of Clinical parameter and HPV DNA ISH status

Clinical parameter	N (125)
Histological Grade	
Well	10
Moderate	74
Poor	34
No data/No tumour/NA	7
Age (Mean 49.176 years SD 12.89 years)	
≤47	61
>47	64
FIGO Stage	
T1/T1a1	3
T1b1	77
T1b2	29
T2/T2a/T2bN1/T1b2N0/T3/any stageII, III	13
In situ/NA	3
Tumor Size	
≤2 cm	14
>2 cm- 5 cm	89
>5 cm	21
NA	0
Lymph Node Status	
Positive	21
Negative	81
NA	22
HPV DNA CISH	
Positive	103 (85.12%)
Negative	18 (14.88%)
HPV physical status	
Punctate form	79 (76.70%)
Diffuse form	2 (1.94%)
Punctate and diffuse form	22 (21.36%)

4.2 การตรวจหาภาวะการติดเชื้อ และ HPV physical status โดยวิธี ISH

Detection HPV DNA by CISH

จากการทดลองพบว่าผู้ป่วย cervical cancer มีอายุเฉลี่ย (ค่า Mean) เท่ากับ 49.176 ปี (SD เท่ากับ 12.89 ปี) และพบว่า 81/102 (79.41%) เป็น Lymph Node Negative ผลการตรวจ HPV DNA โดยวิธี CISH พบว่า HPV DNA positive 103/125 (82.5%) sample, HPV negative 18/125 (14.4%) sample และ 4/125 (3.2%) เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถอ่านผลได้ (sample loss)

HPV DNA signals patterns ในนิวเคลียสที่พบถูกจำแนกเป็น 3 แบบ คือ punctate, diffuse หรือ mix form โดย punctate pattern พบ 79/103 (76.70%) มีลักษณะ dot-like signals ในนิวเคลียส ซึ่งบ่งชี้ integrated HPV genome และ diffuse pattern พบ 2/103 (1.94%) มีลักษณะ large globular homogeneously dense ในนิวเคลียส ซึ่งบ่งชี้ episomal HPV genome และ integrate กับ diffuse pattern (mix pattern) พบ 22/103 (21.36%) ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการติดเชื้อแบบ integrate ร่วมกับ episomal form ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า การเกิดมะเร็งปากมดลูกที่พบในตัวอย่างของคนอินเดียสัมพันธ์กับการติดเชื้อ HPV ที่มีลักษณะเป็น integrated form เป็นส่วนใหญ่ โดยพบ episomal form อย่างเดียวเพียง 2 ตัวอย่าง ดังแสดงใน Table 1

ปัจจุบันมีข้อมูลที่บ่งชี้ว่า การ integrate และ การ express E6/E7 oncogene ของ HR-HPV เป็นปัจจัยเสี่ยงในการทำให้พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปากมดลูกเปลี่ยนแปลงไปจนอาจทำให้เกิดมะเร็ง โดย HR-HPV ส่วนใหญ่ จะ integrate subgenomic fragment เข้าสู่ host cell chromosomal DNA (integrate form) ซึ่ง HPV จะยังคงสามารถเพิ่มจำนวน sub genomic fragment ได้ เมื่อมี HPV plasmid (episomal form) อยู่ในเซลล์เดียวกัน การติดเชื้อ HPV จึงอาจพบได้สองรูปแบบคือ episomal และ integrated form ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่มี และมีการแทรก genome (viral integration) ของไวรัสเข้าไปในโฮสต์โครโมโซมตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่มีการติดเชื้อ HPV ที่มีภาวะการติดเชื้อเป็น episomal form เป็นกลุ่มที่สามารถเกิด spontaneous regression ได้เป็นส่วนใหญ่ อาจพบภาวะ mixed form (episomal and integrated form) ด้วย

HR-HPV จะชักนำให้ HPV sub genomic fragment locus เกิดการ re-replicate จากจุด origin และสร้างโปรตีนออกมาจำนวนมาก ซึ่งส่วนใหญ่ host cell เกิดการ apoptosis ตายไปหรือเกิดการ damage บริเวณนั้นเพื่อ repair gene ให้ถูกต้องโดย recombination mechanism

แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากการ re-replicate ของ integrate HPV แล้วยังพบการเกิด duplication ภายใน HPV locus, extra chromosomal copy (episomal) ของ HPV loci และเกิด cross chromosomal translocation , เกิด methylation ของ host cell genome หรือ viral genome และกลไกอื่นๆ มีผลให้การ express ของ E6/E7 oncogene ผิดปกติไป การแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นของ HR-HPV E6/E7 oncogene จะมีผลต่อการ disrupt ของ p53 และ pRb tumor suppression pathway จะนำไปสู่การเข้าสู่ S phase ของ cell cycle เกิดการ replicate และ cell

cycle progression โดยที่ loss function ของ checkpoint G1/S, G2/M นำไปสู่การสะสมความผิดปกติของยีนและโครโมโซม (chromosomal instability) ผลคือ เกิด cell transform, cell immortalization และมะเร็ง

4.3 การตรวจหาความผิดปกติ ของ human chromosome loci โดยวิธี ISH

ผลที่รายงานนี้ได้จากการวิเคราะห์จาก 103 ตัวอย่าง ของการตรวจ centromere 7

ผลที่ได้พบว่า CEN7 positive 115/125 (92%) sample ดังแสดงใน Table2

Table2 Relation between cervical pathohistological grade and numerical abnormalities of Centromere 7

No. of dots	Pathohistological grade (n=103)									p-Value**
	Well (n=8)			Moderated (n=68)			Poor (n=27)			
	Mean	SD	95%CI Mean	Mean	SD	95%CI Mean	Mean	SD	95%CI Mean	
0	9.91	3.16	7.26-12.55	7.46	3.29	6.66-8.26	8.17	3.88	6.63-9.70	0.190
1	42.25	13.4	31.07-53.42	40.00	11.6	37.19-42.82	35.50	11.7	30.88-40.12	0.173
2	34.50	5.05	30.25-38.69	36.20	6.10	34.72-37.68	33.60	6.15	31.17-36.03	0.135
3	8.66	6.44	3.27-14.04	10.79	6.80	9.15-12.44	12.33	6.87	9.62-15.05	0.343
4	2.22	4.24	-1.32-5.76	2.83 ¹	3.73	1.93-3.73	4.84 ¹	5.17	2.80-6.89	0.061
5+	2.50	3.39	-0.34-5.34	2.72 ²	4.34	1.67-3.77	5.62 ²	6.67	2.98-8.24	0.030
345	13.38	13.4	2.15-24.61	16.34 ³	13.1	13.18-19.51	22.8 ³	14.9	16.91-28.68	0.071

^{1,2,3} Significant different $p < 0.05$ Mann-Whitney

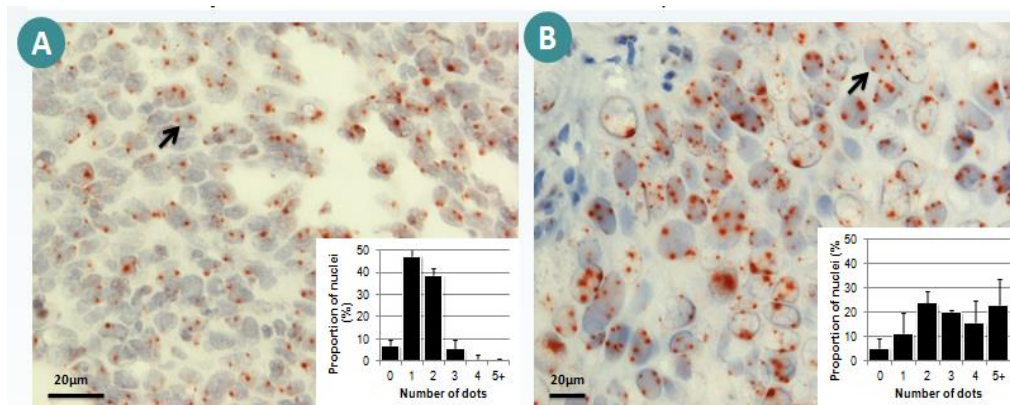


Fig.1 Numerical chromosome abnormalities of CEN7 (arrow) and histogram A) disomic populations B) pentasomic population

Table 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง cervical pathohistological grade (well, moderated and poor differentiate) และ numerical abnormalities ของ Centromere 7 โดยค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของเซลล์ (%cell) ที่นับได้ 4 dots/cell ระหว่าง moderated (Mean 2.83% cell, SD 3.73% cell) และ poor (Mean 4.84 % cell, SD 5.17 % cell) ใน 5+ dots/cell ระหว่าง moderated (Mean 2.72% cell, SD 4.34% cell) และ poor (Mean 5.62 % cell, SD 6.67 % cell) และ ชนิดรวม 3,4,5 dots ระหว่าง moderated (Mean 16.34% cell, SD 13.1% cell) และ poor

(Mean 22.8 % cell, SD 14.9 % cell) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และนำค่า mean $+(1SD-3SD)$ ของอัตราส่วนของเซลล์ที่ได้ ที่มี 1dot หรือ 2 dots จนถึง 5+ dot ที่นับได้ มาคำนวณเพื่อหาค่า cut off เพื่อแสดงถึงชนิดของ chromosome status ออกเป็นชนิดต่างๆ ดังนี้คือ Monosomy, disomy, trisomy, tetrasomy และ pentasomy ดังแสดงใน Table3

Fig.1 แสดงให้เห็น signal ของ centromere 7 ใน cell ซึ่งแสดง red dot ลูกศรแสดง 2 dot/cell (normal chromosome copy number) และ 5+ dot/cell (abnormal chromosome copy number)

จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนของเซลล์ในเนื้อเยื่อมะเร็งระหว่าง moderated และ poor differentiation ที่นับได้ 4 dots/cell (% cell ที่มี 4 dot/cell) ($P=0.038$) และใน 5+dots/cell ($P=0.01$) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Table 3 Relation between cervical pathohistological grade and Invasive cervical cancer cut off of numerical abnormalities of CEN 7

ICC Cut off (%)	[Mean $+(1SD-3SD)$]*	Well (n=8)	Moderately (n=68)	Poorly (n=27)
Monosomy	39.00 $+(11.86-74.58)$	3 (37.5%)	12(17.6%)	4(14.8%)
Disomy	35.40 $+(6.10-53.70)$	2(25%)	20(29.4%)	2(7.4%)
Trisomy	11.03 $+(6.79-31.41)$	2(25%)	23(33.8%)	10(37%)
Tetrasomy	3.31 $+(4.25-16.06)$	1(12.5%)	5(7.4%)	1(3.7%)
Pentasomy	3.46 $+(5.12-18.81)$	0(0%)	8(11.8%)	10(37%)

Out off criteria used: Trisomy $>10\%$ [1] Tetrasomy $>$ Mean, Pentasomy $>$ Mean, out of aneuploidy as disomy., * Mean of 103 ICC

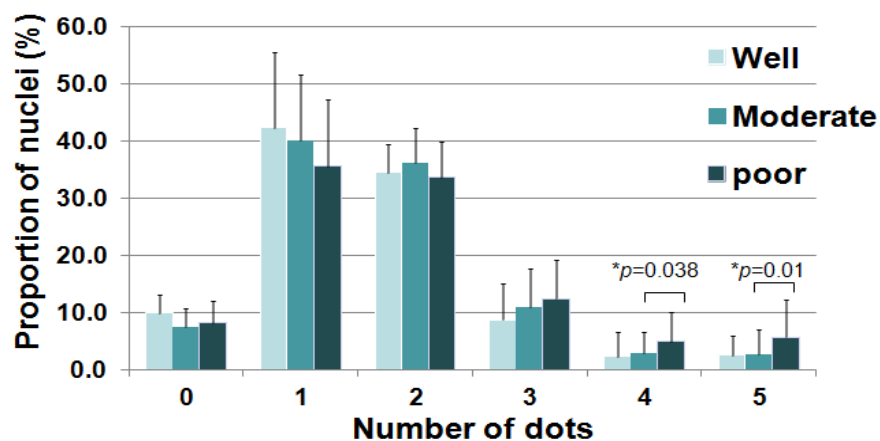


Fig.2 Relation between cervical pathohistological grade and numerical abnormalities of CEN 7

ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าในเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีอัตราส่วนเซลล์ซึ่งมี 4-5+ dots/cell แสดงความผิดปกติของ chromosome copy number และบ่งชี้เป็นมะเร็งชนิด moderately to poor differentiate ได้

นอกจากนี้อัตราส่วนของเซลล์ตรวจพบความผิดปกติของ chromosome แบบ monosomy, disomy, trisomy และ pentasomy ยังพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในเซลล์ของเนื้อเยื่อมะเร็งระหว่าง moderate และ poor differentiate โดย poorly differentiate มีความผิดปกติแบบ pentasomy 9/27 (33.33%) มากกว่า moderately differentiate 8/63 (12.67%) และ poorly differentiate มี disomy 2/27 (7.41%) น้อยกว่า moderately differentiate 20/63 (31.75%) และพบอัตราส่วนของเซลล์ที่เป็น trisomy ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุ > 50 (mean rank 40.48) มากกว่า กลุ่มที่มีอายุ < 50 ปี (mean rank 30.05) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงใน Table 4

Table 4 Association of clinical parameter and HPV DNA ISH status and numerical abnormalities of CEN7

Clinical parameter	N	p-value	
HPV DNA CISH	103		
Positive	91		
Negative	12		
Age (Mean)	103	Viral load Mean Rank	
≤ 50 (41.25)	65	43.72	0.001 ¹
> 50 (61.10)	38	64.61	
Histological Moderate			
Age	68	Trisomy (%cell) Mean Rank	
≤ 50	39	30.05	0.031 ¹
> 50	29	40.48	
Histological grade	Moderately	Poorly	
Monosomy	12 (19.05%)	4 (14.81%)	0.025 ³
Disomy	20 (31.75%)	2 (7.41%)	
Trisomy	23 (36.51%)	12 (44.44%)	
Pentasomy	8 (12.67%)	9 (33.33%)	
Disomy	20 (71.43%)	2 (18.18%)	0.004 ⁴
Pentasomy	8 (28.57%)	9 (81.82%)	

¹ = Mann-Whitney test, ² = Kruskal-Wallis, ³ = Pearson Chi-Square, ⁴ = Fisher's Exact

เนื่องจากผลของโปรตีน E6/E7 (oncoproteins) ที่ไวรัสสร้างขึ้นมาผิดปกติจะ ชักนำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติขึ้น อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาที่ได้ดังกล่าวมาเกี่ยวกับการศึกษาจากแหล่งอื่นที่มีมากขึ้นเพื่อนำ host cell biomarker มาพัฒนาเทคนิคในการตรวจวินิจฉัยเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยควบคู่ไปกับการใช้ marker ของไวรัสเพียงอย่างเดียว

เนื่องจาก chromosomal instability อาจเกิดขึ้นในระดับเบสหรือระดับโครงสร้างโครโมโซม โดยการ deletion, duplication และ amplification ในบางบริเวณของ genomic DNA ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึง การเปลี่ยนแปลงของ copy number ของ gene ที่พบได้ใน high grade lesion dysplasia และมะเร็ง อีกทั้งเมื่อจีนหรือโครโมโซมเกิดความผิดปกติขึ้นก็จะชักนำให้เกิดการแสดงออกของ จีนที่ผิดปกติไปด้วยโดยไปเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ RNA และ protein ดังนั้นการใช้ human DNA, RNA และ protein ที่แสดงออกผิดปกติระหว่างเซลล์มีการติดเชื้อและเปลี่ยนแปลงขึ้นมาเพื่อเป็น biomarker ใช้บ่งบอกความผิดปกติในรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกน่าจะบอกความแม่นยำการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ดีขึ้น แต่ปัจจุบันยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนของ host cell biomarker ที่มีความเกี่ยวข้องกับรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก ดังนั้นการศึกษาการ deletion, duplication และ amplification ของ human chromosome นี้จึงมีความจำเป็นและยังเป็นประโยชน์ในรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกอีกด้วย

4.4 การตรวจหาการแสดงออกของ HPVE6/E7 mRNA ใน FFPE samples โดย CISH technique

จากการวิเคราะห์ผลการทดลอง 125 ตัวอย่างพบ mRNA E6/E7 positive 103 ตัวอย่าง โดย ตรวจพบ human mRNA POLR2A (internal control) และ HPV mRNA E6/E7 จำนวน 93/103 (90.29%), พบ human mRNA POLR2A positive และ HPV mRNA E6/E7 Negative จำนวน 6/103 (5.82%), กลุ่มตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจได้ (NA/No tumor/missing) มีจำนวน 18/125 (14.4%) แสดงว่าการเตรียมตัวอย่างโดยวิธี TMA มีผลทำให้เกิดการสูญหายของตัวอย่างเกิดขึ้น การวิเคราะห์ผลจะต้องคำนึงถึง internal control ร่วมกับการแสดงออกของ HPV E6/E7 mRNA เป็นหลัก ดังแสดงใน Table 5

Table 5 Raw data of human mRNA (POLR2A) expression and HPV mRNA E6/E7 mRNA expression in 125 Indian Cervical cancer FFPR TMA cores

mRNA CISH	HPV E6/E7 mRNA positive	HPV E6/E7 mRNA negative	NA/No tumor/missing	Total
Human POLR2A Positive	93	6	9	108
Human POLR2A Negative	3	1	1	5
NA/No tumor/missing	7	1	4	12
Total	103	8	14	125

mRNA POLR2A และ HPV E6/E7 mRNA ที่ตรวจพบมีลักษณะเป็น single และ multiple dot/spot signal, diffuse signal ทั้งใน nuclear และ cytoplasm ดังแสดงใน Fig.3

การทดสอบ HPV E6/E7 transcript โดย CISH ชี้ให้เห็นถึงการมี activity ของ virus และที่สำคัญคือสามารถมองเห็น viral transcripts โดยตรงใน tumor cells ใน tissue sections ซึ่งต่างจาก RT-PCR techniques และบางขั้นตอนของ CISH ก็ไม่ยุ่งยากเท่า RT-PCR โดยการทดลองนี้ทำใน TMA ได้แสดงให้เห็นถึงความไวต่อการตรวจ HPV mRNA ซึ่งการศึกษานี้พบ HPV mRNA E6/E7 positive 100/108 (92.56%) เมื่อเทียบกับ HPV DNA ISH พบ 92/108 (85.19%) โดยพบลักษณะ cytoplasmic,

และ nuclear staining ในเกือบทุก RNA ISH-positive cases ซึ่งคาดว่าอาจเป็น pattern ของ probe ที่ hybridize กับ transcription sites ใน nuclear และ active transcript ใน cytoplasm

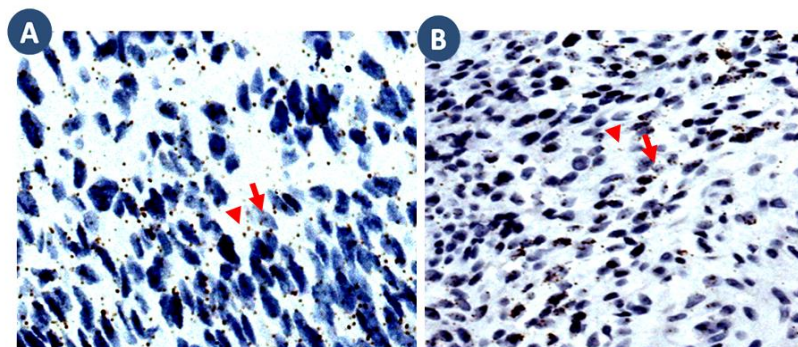


Fig.3 mRNA expression on Cervical Cancer TMA FFPE section by CISH technique A) human mRNA POLR2A expression as internal control B) HPV E6/E7 mRNA show mRNA expression in nuclear and cytoplasm (arrow as nuclear staining, head arrow as cytoplasmic staining)

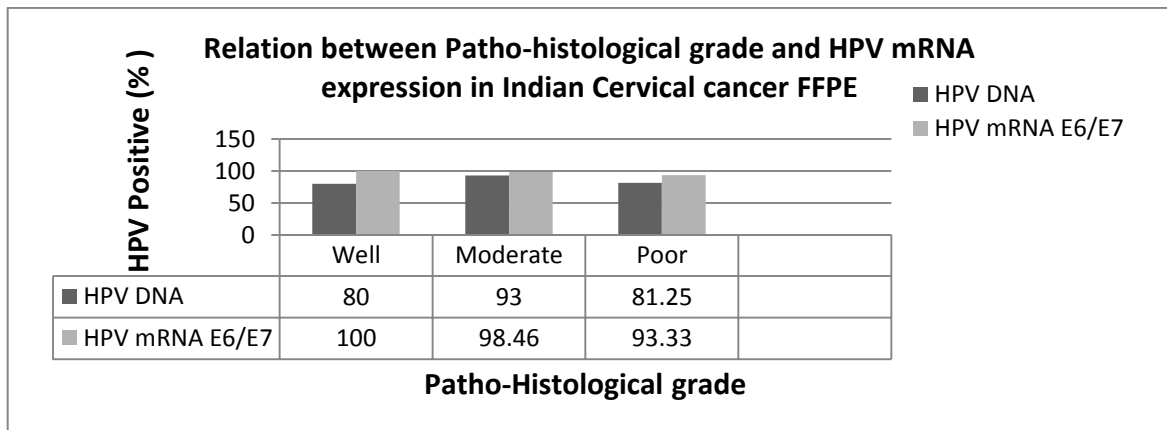
จากการศึกษาของ Helen K และ คณะ ได้ทำการเปรียบเทียบ ใน cytological specimen โดยใช้ E6/E7 method Pretect™ HPV-Proofer กับวิธี HC2 พบว่าวิธี E6/E7 method Pretect™ HPV-Proofer สามารถ predict ระดับรอยโรคได้ดีกว่า HC2 เพราะฉะนั้น การตรวจหา E6/E7 mRNA ของ HR-HPV อาจแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของ abnormal cell หรือ pre-cancer cell ไปเป็นมะเร็งและบ่งบอกระดับความรุนแรงของรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกอย่างต่อเนื่อง (Persistent expression) ของ oncogenes E6/E7 พบมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงเซลล์ไปเป็นมะเร็ง ดังนั้นการตรวจพบ mRNA E6/E7 ไม่เพียงแต่บ่งบอกสถานะการติดเชื้อแต่ยังใช้บ่งชี้การเปลี่ยนแปลงเซลล์ตามความรุนแรงที่เพิ่มขึ้นได้เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจพบ HPV-DNA

จากการทดลองนี้พบว่า 91/108 (84.26%) positive ทั้ง HPV DNA และ HPV E6/E7 mRNA, 9/108 (8.33%) positive สำหรับ HPV E6/E7 mRNA แต่ HPV DNA negative ดังแสดงความสัมพันธ์ของ HPV DNA และ HPV mRNA E6/E7 mRNA expression ใน Table 6

Table 6 Correlation between HPV DNA and HPV mRNA E6/E7 mRNA expression by CISH in 108 Indian Cervical cancer FFPE TMA cores

CISH	HPV E6/E7 mRNA positive	HPV E6/E7 mRNA negative	Total
HPV DNA positive	91 (84.26%)	1 (0.93%)	92 (85.19%)
HPV DNA negative	9 (8.33%)	7 (6.48%)	16 (14.81%)
Total	100 (92.56%)	8 (7.41%)	108 (100%)

*P=0.021 (McNemar test) เมื่อเทียบ HPV E6/E7 mRNA CISH กับ HPV DNA CISH technique ได้ Sensitivity = 0.9891 (95% Confidence Interval: 0.932391-0.999432), Specificity=0.4375 (95% Confidence Interval: 0.207538-0.694457) Positive Predictive Value=0.91, Negative Predictive Value=0.875, (NA 17 cores)



จากข้อมูลพบว่าเทคนิคที่ใช้ในการบ่งชี้ระดับของ DNA, RNA ใน cell หรือ ในเนื้อเยื่อผิดปกติที่เป็นที่ยอมรับคือ ISH ซึ่งเป็น techniques ที่สามารถบอกตำแหน่งของ target nucleic acid ในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อ ที่มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้อย่างแท้จริง (พบ HPV mRNA E6/E7 100%, 98.46% และ 93.33% ใน well, moderate และ poor ตามลำดับ) ซึ่งเดิม ISH มี sensitivity ในทาง clinic ต่ำ แต่ techniques ที่ใช้ในการทดลองนี้อาศัย Branch probe ซึ่งจะช่วยเพิ่ม sensitivity ของ CISH techniques ซึ่งจะสามารถเพิ่ม sensitivity และ specificity ของการตรวจวินิจฉัย

CISH techniques โดยอาศัย branch probe ที่ใช้ในการทดลองนี้จะช่วยเพิ่ม sensitivity ของ ISH และ ISH จะเพิ่มความถูกต้อง (specificity) ในการวินิจฉัยรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูก โดยที่ PCR-based method ไม่สามารถทำได้ และยังสามารถพยากรณ์การ progression และ regression ของโรค ซึ่ง HPV DNA –based method ไม่สามารถทำได้เช่นเดียวกัน และยังอาจนำ techniques ที่นี้ไปใช้ในการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกได้ด้วย

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง HPV DNA positive และ HPV E6/E7 mRNA positive sample กับ cervical cancer grade ซึ่งยืนยันให้เห็นว่า E6/E7 mRNA มีความสัมพันธ์กับรอยโรคมะเร็งปากมดลูก โดย CISH technique (Branch probe): ดังนั้นจึงอาจใช้ HPV E6/E7 mRNA เพื่อเป็น biomarker สำหรับ diagnosis และ prognostic prediction รอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกได้

4.5 การตรวจหาการแสดงออกของ human protein ใน FFPE samples โดย IHC technique

ได้ทำการตรวจ protein ทั้งหมด 15 ชนิด คือ P16, pRB, P53, Ki67, PTEN, EGFR, FOXO3a, B-catenin, p-mTOR, pAKT, ERK1/2, PIK3CA, VEGF, HIF-1α, Cortactin

จากผลการทดลองพบ IHC สำหรับ ตรวจวัด human protein expression ใน TMA FFPE Indian Cervical cancer ดังแสดงในภาพ Fig 4 และ Fig 5 ย้อมด้วย DAB+ chromogen ซึ่งติดสีน้ำตาลเข้ม

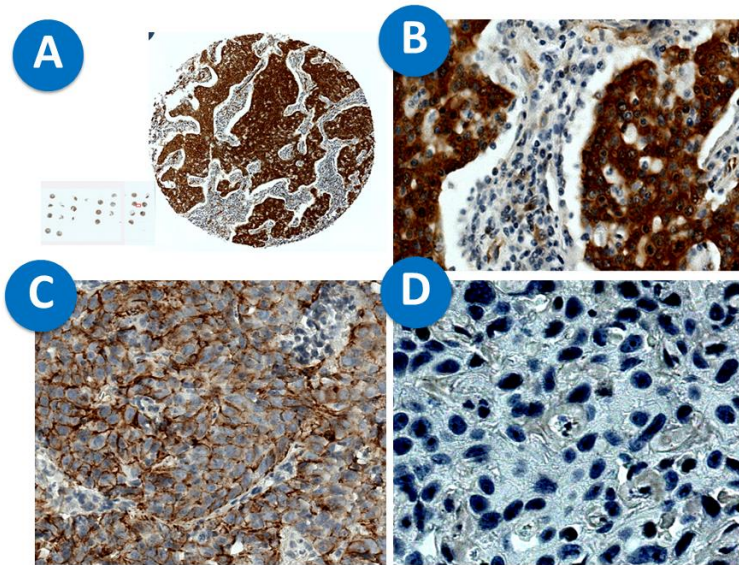


Fig 4 IHC สำหรับ ตรวจวัด human protein expression ใน TMA FFPE Indian Cervical cancer a) Cortactin TMA core 4X b) Cortactin 20X c) Beta-catenin 20X d) p53 20X

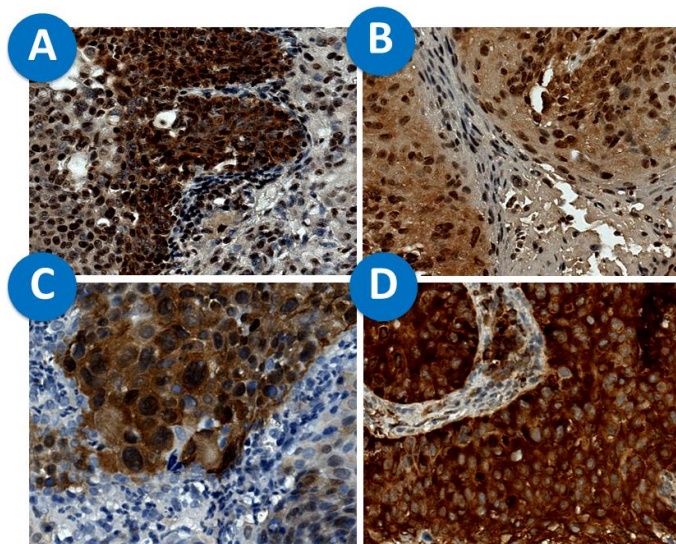


Fig 5 IHC สำหรับ ตรวจวัด human protein expression ใน TMA FFPE Indian Cervical cancer a) FOXO3a 20X b) HIF-1alpha 20X c) p16 20X d)PIK3CA p110alpha 20X

จาก Table 7 มี human protein 10 ชนิด แสดงการ up-regulation มากกว่า 80% ของจำนวน ICC sample คือ P16, pRB, Ki67, FOXO3a, B-catenin, pAKT, PIK3CA, VEGF, HIF-1alpha, Cortactin มี human protein 3 ชนิด แสดงการ up-regulation น้อยกว่า 80% ของจำนวน sample คือ EGFR, ERK1/2p, p-mTOR และ มี human protein 2 ชนิด Down-regulation คือ PTEN, p53 ซึ่ง CTTN, PIK3CA, VEGF มีการแสดงออกมากถึง 120/121 (99.17%) และคล้ายกับ p16 marker

120/121 (99.13%) และเป็นที่น่าสนใจว่า EGFR, ERK1/2p , p-mTOR มีการแสดงออกที่แตกต่างกันใน ICC จึงอาจสามารถใช้เป็น candidate marker เพื่อบ่งบอกความผิดปกติของรอยโรคปากมดลูกต่อไป

Table 7 Protein expression by IHC in 125 Indian Cervical cancer FFPE TMA cores

Protein expression by IHC (TMA)	N	Positive (%)	Negative (%)	Expression status
1) pAKT	122	110 (90.16%)	12(9.84%)	Up-regulation
2) B-catenin	121	105 (86.78%)	16(13.22%)	Up-regulation
3) CTTN	121	120 (99.17%)	1(0.83%)	Up-regulation
4) EGFR	122	73 (59.84%)	49(40.16%)	Up-regulation
5) ERK1/2p	122	90 (73.77%)	32(26.23%)	Up-regulation
6) FOXO3a	121	121(100%)	0(0%)	Up-regulation
7) HIF-1alpha	118	118(100%)	0(0%)	Up-regulation
8) Ki67	124	110(88.71%)	14(11.29%)	Up-regulation
9) p mTOR	123	74(60.16%)	49(39.84%)	Up-regulation
10) p16	121	120(99.17%)	1(0.83%)	Up-regulation
11) p53	122	38(31.15%)	84(68.85%)	Down-regulation
12) PIK3CA	120	119(99.17%)	1(0.83%)	Up-regulation
13) pRB	120	105(87.5%)	15(12.5%)	Up-regulation
14) PTEN	121	37(30.58%)	84(69.42%)	Down-regulation
15) VEGF	122	121(99.18%)	1(0.82%)	Up-regulation

5. อภิปรายผล/วิจารณ์ (Discussion/Comment)

จากข้อมูลเบื้องต้นในส่วนที่ได้รับการวิเคราะห์นี้พบว่า

การตรวจติดเชื้อ HPV โดยวิธี CISH ในกลุ่ม cervical cancer (India) พบ HPV DNA (85.12%) และมี HPV DNA physical status ส่วนใหญ่เป็น integration form

ผลจากการตรวจแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ host chromosome ผิดปกติ (aneusomies) กับการเปลี่ยนแปลงหรือการพัฒนาของมะเร็งปากมดลูก (Invasive cervical cancer: ICC) และอัตราส่วนของเซลล์ที่พบมากกว่า 4 dots/cell ขึ้นไป อาจใช้บ่งชี้ชนิดเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูก ระดับ moderate ออกจาก poorly differentiated tumor grade หรือร่วมกับการดู chromosome aneusomy ชนิด pentasomy ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจจะใช้เพื่อเป็น biomarker ของ ICC

ผลการศึกษาการติดเชื้อ HPV โดยวิธี CISH ใน FFPE ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชาวอินเดีย ผลการทดลองแสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง HPV DNA positive sample กับ HPV E6/E7 mRNA expression และจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า E6/E7 mRNA มีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งปากมดลูก และมีความไวกว่าการตรวจหา HPV DNA ซึ่งสามารถใช้เพื่อเป็น biomarker ในการบ่งบอกรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งปากมดลูกต่อไป

CTTN, PIK3CA, VEGF มีการแสดงออกคล้ายกับการแสดงออกของ p16 biomarker 120/121 ใน ICC และเป็นที่น่าสนใจว่า EGFR, ERK1/2p, p-mTOR มีการแสดงออกที่แตกต่างกันใน ICC จึงอาจสามารถใช้เป็น candidate marker เพื่อบ่งบอกความผิดปกติของรอยโรคปากมดลูกต่อไป

6. สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ (Conclusion/Suggestion)

ในการศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่าง HPV DNA, physical status, HPV E6/E7 mRNA, genetic instability, human protein expression และปัจจัยอื่นๆ ใน cervical cancer FFPE พบว่า host chromosome 7 ที่ผิดปกติ (aneusomies) มากกว่า 4 dots/cell และ mRNA E6/E7 รวมทั้ง CTTN, VEGF, PIK3CA, ERK1/2p, p-mTOR อาจจะใช้เพื่อเป็น biomarker ของ ICC และอาจสามารถใช้เป็น candidate marker เพื่อบ่งบอกความผิดปกติของรอยโรคปากมดลูกซึ่งจะทำการทดลองต่อไป

บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Ghazal-Aswad, S., *Cervical cancer prevention in the human papilloma virus vaccine era*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1138**: p. 253-6.
2. Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41.
3. Keegan, H., et al., *Comparison of HPV detection technologies: Hybrid capture 2, PreTect HPV-Proofer and analysis of HPV DNA viral load in HPV16, HPV18 and HPV33 E6/E7 mRNA positive specimens*. J Virol Methods, 2009. **155**(1): p. 61-6.
4. Hamid, N.A., C. Brown, and K. Gaston, *The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(10): p. 1700-17.
5. Cronje, H.S., *Screening for cervical cancer in developing countries*. Int J Gynaecol Obstet, 2004. **84**(2): p. 101-8.
6. Nanda, K., et al., *Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review*. Ann Intern Med, 2000. **132**(10): p. 810-9.
7. Cong, X., D.D. Cox, and S.B. Cantor, *Bayesian meta-analysis of Papanicolaou smear accuracy*. Gynecol Oncol, 2007. **107**(1 Suppl 1): p. S133-7.
8. Fujii, T., et al., *Ancillary testing of liquid-based cytology specimens for identification of patients at high risk of cervical cancer*. Virchows Arch, 2008. **453**(6): p. 545-55.
9. Arbyn, M., et al., *Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis*. Obstet Gynecol, 2008. **111**(1): p. 167-77.
10. Lie, A.K. and G. Kristensen, *Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma*. Expert Rev Mol Diagn, 2008. **8**(4): p. 405-15.
11. paul D. Blumenthal, N.M., *Cervical cancer prevention guidelines for low-resource setting* 2007.
12. Scheurer, M.E., et al., *Correlation of human papillomavirus type 16 and human papillomavirus type 18 e7 messenger RNA levels with degree of cervical dysplasia*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(8): p. 1948-52.
13. Sokolova, I., et al., *Chromosomal biomarkers for detection of human papillomavirus associated genomic instability in epithelial cells of cervical cytology specimens*. J Mol Diagn, 2007. **9**(5): p. 604-11.
14. Kadaja, M., et al., *Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability*. Virology, 2009. **384**(2): p. 360-8.
15. Halfon, P., et al., *Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ HPV assay*. J Clin Virol, 2010. **47**(2): p. 177-81.
16. Dellas, A., et al., *DNA copy number changes in cervical adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(8): p. 2985-91.
17. Chavez-Blanco, A., et al., *HER2 expression in cervical cancer as a potential therapeutic target*. BMC Cancer, 2004. **4**: p. 59.
18. Santin, A.D., et al., *Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy*. Virology, 2005. **331**(2): p. 269-91.
19. Oikonomou, P., et al., *Quantitative determination of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in premalignant cervical lesions and correlation with human papillomavirus load*. Hum Pathol, 2006. **37**(2): p. 135-42.
20. Maida, Y., et al., *Distinct telomere length regulation in premalignant cervical and endometrial lesions: implications for the roles of telomeres in uterine carcinogenesis*. J Pathol, 2006. **210**(2): p. 214-23.
21. Shen, L., et al., *EGFR and HER2 expression in primary cervical cancers and corresponding lymph node metastases: implications for targeted radiotherapy*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 232.
22. Martinez, I., et al., *Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells*. Oncogene, 2008. **27**(18): p. 2575-82.
23. Xiaoxia Hu1, J.K.S., James S. Lewis, Jr.2, Phyllis C. Huettnet2, Janet S. Rader3, and P.W.G. Joseph O. Deasy1, 3, and Xiaowei Wang1, *A MicroRNA Expression Signature for Cervical Cancer Prognosis*. Cancer Research, 2010. **70**((4)): p. 1441-8.

24. Kadkol, S.S., W.R. Gage, and G.R. Pasternack, *In situ hybridization-theory and practice*. Mol Diagn, 1999. **4**(3): p. 169-83.
25. Huang, C.C., et al., *HPV in situ hybridization with catalyzed signal amplification and polymerase chain reaction in establishing cerebellar metastasis of a cervical carcinoma*. Hum Pathol, 1999. **30**(5): p. 587-91.
26. van Belkum, A., et al., *Non-isotopic labeling of DNA by newly developed hapten-containing platinum compounds*. Biotechniques, 1994. **16**(1): p. 148-53.
27. Ana-Maria de Roda Husman, J.M.M.W., Adriaan J. C. van den Brule, and C.J.L.M.M.a.P.J.F. Snijders, *The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR*. Journal of General Virology, 1995. **76**: p. 1057-106.
28. van den Brule, A.J., et al., *GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(3): p. 779-87.
29. Beser, A.R., et al., *HER-2, TOP2A and chromosome 17 alterations in breast cancer*. Pathol Oncol Res, 2007. **13**(3): p. 180-5.
30. Lassmann, S., et al., *A novel approach for reliable microarray analysis of microdissected tumor cells from formalin-fixed and paraffin-embedded colorectal cancer resection specimens*. J Mol Med, 2009. **87**(2): p. 211-24.
31. Molden, T., et al., *PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses*. J Virol Methods, 2007. **142**(1-2): p. 204-12.
32. Nuovo, G.J., *In situ detection of precursor and mature microRNAs in paraffin embedded, formalin fixed tissues and cell preparations*. Methods, 2008. **44**(1): p. 39-46.
33. Jeon, J.H., et al., *Immunocytochemical detection of HPV16 E7 in cervical smear*. Exp Mol Med, 2007. **39**(5): p. 621-8.
34. Paola Cattani, G.F.Z., 2 Caterina Ricci,3 Sara D'Onghia,1 Ilaria Nausica Trivellizzi,, V.G.V. Aldo Di Franco, 2 Maria Durante,3 Giovanni Fadda,1 Giovanni Scambia,3, and a.R.D.V. Giovanni Capelli, *Clinical Performance of Human Papillomavirus E6 and E7 mRNA Testing for High-Grade Lesions of the Cervix*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,, 2009. **Vol. 47**(12): p. 3895-3901.
35. Domingo EJ, Noviani R, Noor MR, Ngelangel CA, Limpaphayom KK, Thuan TV, et al. *Epidemiology and prevention of cervical cancer in Indonesia, Malaysia, the Philippines, Thailand and Vietnam*. Vaccine. 2008 Aug 19;26 Suppl 12:M71-9.
36. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*. J Virol. 2004 Nov; 78(21):11451-60.
37. Thomas M, Pim D, Banks L. *The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV*. Oncogene. 1999 Dec 13;18(53):7690-700.
38. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, et al. *Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective*. J Virol. 1997 Mar;71(3):2463-72.
39. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. *Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study*. American journal of epidemiology. 2003 Sep 1;158(5):486-94.
40. Moscicki AB, Ellenberg JH, Crowley-Nowick P, Darragh TM, Xu J, Fahrat S. *Risk of high-grade squamous intraepithelial lesion in HIV-infected adolescents*. The Journal of infectious diseases. 2004 Oct 15;190(8):1413-21.
41. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: *Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia*. Journal of the National Cancer Institute. 2003(31):14-9.
42. Woodman CB, Collins S. A critique of cohort studies examining the role of human papillomavirus infection in cervical neoplasia. Bjog. 2002 Dec;109(12):1311-8.
43. Ahdieh L, Klein RS, Burk R, Cu-Uvin S, Schuman P, Duerr A, et al. *Prevalence, incidence, and type-specific persistence of human papillomavirus in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative women*. The Journal of infectious diseases. 2001 Sep 15;184(6):682-90.
44. Paraskevidis E, Kaponis A, Malamou-Mitsi V, Davidson EJ, Hirsch PM, Koliopoulos G, et al. *The natural history of HPV infection of the uterine cervix. Long-term observational and histological data*. Anticancer research. 2002 Mar-Apr;22(2B):1177-81.

- 45 Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, et al. *Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection*. The Journal of infectious diseases. 2005 Mar 1;191(5):731-8.
- 46 Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaidis E. *Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies*. Gynecol Oncol. 2007 Jan;104(1):232-46.
- 47 Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, et al. *Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study*. BMJ (Clinical research ed. 2002 Sep 14;325(7364):572.
- 48 Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedal H, Karlsen F, Hagmar B. *Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones*. British journal of cancer. 2004 Apr 5;90(7):1407-13.
- 49 Jin Y, Tsao SW, Kwong YL. Re: Wilting et al. *Increased gene copy numbers at chromosome 20q are frequent in both squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix*. J Pathol 2006; 209:220-230.
- 50 Sriamporn S, Snijders PJ, Pientong C, Pisani P, Ekalaksananan T, Meijer CJ, et al. *Human papillomavirus and cervical cancer from a prospective study in Khon Kaen, Northeast Thailand*. Int J Gynecol Cancer. 2006 Jan-Feb;16(1):266-9.
- 51 Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S, Roe D, Papenfuss MR, et al. *Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: The Young Women's Health Study*. The Journal of infectious diseases. 2002 Aug 15;186(4):462-9.
- 52 Jeon JH, Shin DM, Cho SY, Song KY, Park NH, Kang HS, et al. *Immunocytochemical detection of HPV16 E7 in cervical smear*. Exp Mol Med. 2007 Oct 31;39(5):621-8.
- 53 Xuezhong C, Gu L, Laimonis AL, Bryan RC. *Human Papillomavirus Genotype 31 Does Not Express Detectable MicroRNA Levels during Latent or Productive Virus Replication*. JOURNAL OF VIROLOGY, Nov. 2006, p. 10890–10893
- 54 Jeong WL,ChelHun C,1Jung JC,Young AP. *AlteredMicroRNA Expression in Cervical Carcinomas*. Clin Cancer 2535 Res 2008;14(9)May 1, 2008
- 55 Wang X, Tang S, Le S-Y, Lu R, Rader JS, et al. (2008) *Aberrant Expression of Oncogenic and Tumor-Suppressive MicroRNAs in Cervical Cancer Is Required for Cancer Cell Growth*. PLoS ONE 3(7): e2557. doi:10.1371/journal.pone.0002557
- 56 Qing Y, Hui X, Qian QZ, Hui Z, Liang HQ. *MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications 388 (2009) 539–542
- 57 Gerard JN. *In situ detection of precursor and mature microRNAs in paraffin embedded, formalin fixed tissues and cell preparations*. Methods 44 (2008) 39–46