

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกพบได้บ่อยในหญิงทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย¹ แม้ว่าการติดเชื้อ human papillomas virus (HPV) ทัพย์ 16 และ 18 เป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะ cervical neoplasia และมีการพบจีโนมของ HPV รวมทั้ง viral protein (HPV 16, E6 และ E7) ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกส่วนใหญ่² แต่ผู้ติดเชื้อเพียงบางส่วนที่มีการดำเนินของโรคนจนกลายเป็นมะเร็งปากมดลูก ดังนั้นการติดเชื้อ HPV จึงไม่น่าเป็นปัจจัยหลักเพียงอย่างเดียวที่ก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อน่าจะสำคัญในการกำจัดเซลล์มะเร็ง จากการร่วมกันของเซลล์ 2 ชนิด คือ CD8+ T cell (Cytotoxic T cell; CTL) และ natural killer cell (NK cell) กลไกรับรู้และทำลายเซลล์มะเร็ง (immune surveillance) เกิดได้ 2 แบบคือ 1) แบบอาศัย T-cell receptor (TCR) ซึ่งจำเพาะต่อ peptide แอนติเจนที่แปลกล้อม หรือ ที่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง จับกับโมเลกุลของ MHC class I ดังนั้นเมื่อ T cells พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีความผิดปกติก็จะทำลาย ทำให้เซลล์มะเร็งไม่สามารถเจริญเติบโตแพร่กระจายต่อไป บทบาทการทำลายของเซลล์มะเร็งดังกล่าวยังขึ้นกับ การทำงานของ NK cells³ เซลล์มะเร็งหลายชนิดจะหลีกเลี่ยงการทำลายของ T cells โดยการลดการแสดงออกของ HLA Class I⁴⁻⁵ ทำให้ T cells ไม่สามารถทำลายได้ และ 2) แบบอาศัย NKG2D receptor จับกับ NKG2D ligands ที่แสดงบนผิวเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ NKG2D receptor มีความหลากหลาย (polymorphic)³ เชื่อว่าความหลากหลายของ receptors และ ligands น่าจะมีผลในการทำงานของ NK cells และชักนำให้เกิด NKG2D signal ซึ่งเป็น direct immune activation นอกจากนี้ NKG2D ligand ยังมีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นแบบ adaptive ซึ่งกลไกในการกระตุ้นยังไม่ทราบแน่ชัด⁶⁻⁸ NKG2D receptor พบได้บนผิว NK cell⁹ CD8+ T cell และ $\gamma\delta$ T cell¹⁰ โดยมีโปรตีนเชื่อม (adaptor protein) DAP10 ทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณกระตุ้นเป็น co-stimulatory signal ใน CTL¹¹⁻¹⁴ ส่วน DAP12 พบเฉพาะใน NK cell จึงเป็นการกระตุ้น NK cell อย่างอิสระ (direct activation)^{6,13,15} และสามารถกระตุ้นเมื่อมีสัญญาณมากพอชนะ (override) กลไกยับยั้งผ่านทาง MHC class I^{8,10,16-18} NK receptors แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ 1) inhibitory receptors จับกับ HLA Class I ทำหน้าที่ในการตรวจสอบหาสิ่งแปลกปลอม และทำลายเซลล์ที่ขาด แอนติเจนพวกเดียวกัน (self antigens)¹⁹ และ 2) activating receptors ได้แก่ NKG2D ถูกกระตุ้นด้วยการจับกับ NKG2D ligands ใน CTL และ NK cell อาศัย DAP10 เพื่อส่งสัญญาณในลักษณะ co-stimulation ผ่านทาง Src-PTK แต่ใน NK cell ซึ่งมี DAP12 จะสามารถเกิด NKG2D signal อิสระโดยตรงผ่านทาง Syk-PTK¹³ มีผลให้เกิด activated effector cell^{7,20,21} ชักนำ effector cell ให้ทำลายเซลล์เป้าหมาย^{13,14,18,22-24} NKG2D ligands ของคนเป็น MHC Class I – like

molecules แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) MIC /PERB11^{25,26} ได้แก่ MICA (PERB 11.1) และ MICB (PERB 11.2) มีโครงสร้าง 3 โดเมน คล้ายกับ MHC class I จะพบที่ผิวของเซลล์บุ (epithelial) ในบางบริเวณเช่น gastrointestinal epithelium²⁷ เซลล์มะเร็ง หลายชนิดที่มีต้นกำเนิดมาจาก epithelial cells จะมีการแสดงออกของ PERB11.1 หรือ MICA เพิ่มขึ้น²⁸ 2) UL16 binding protein (ULBP1,2,3,4) หรือ RAET1(Retinoic acid inducible early transcript 1) พบบนเซลล์ปกติหลายชนิด รวมทั้งเซลล์มะเร็ง^{16,29} การแสดงออกของ NKG2D ligands จะเพิ่มมากขึ้น ในภาวะที่เซลล์เกิดความเครียด (stress-inducible expression)²⁷ เซลล์มะเร็งหลายชนิด²⁸ รวมทั้งในภาวะที่เซลล์มีการติดเชื้อเช่น CMV⁶, *M. tuberculosis*³⁰, *E. coli*³¹ การทำงานของ NK cells ขึ้นกับความสมดุลระหว่างสัญญาณยับยั้ง และสัญญาณกระตุ้นการฆ่าที่เกิดจากการจับกันระหว่าง activating receptor เช่น NKG2D receptor และ inhibitory receptors เช่น Killer immunoglobulin like receptor(KIR) กับ MHC Class I หรือ/และ NKG2D ligands ในสภาวะปกติ NK cells จะไม่ฆ่าเซลล์ของตัวเอง เนื่องจากจะถูกยับยั้งโดย MHC Class I เมื่อเซลล์ผิดปกติก็จะลดการแสดงออกของ MHC Class I และมีโมเลกุลมิกเอเพิ่มมากขึ้น ทำให้ NK cells รับรู้ว่าคุณเซลล์มีความผิดปกติและเข้าทำลายได้ดีขึ้น^{6,32} ในทางกลับกันเชื่อว่าเซลล์มะเร็งอาจมีกลไกที่หลบหลีกการทำลายของ NK cells ด้วยการลดการแสดงออกของ MHC class I ทำให้ปริมาณของ tumor rejection antigen ที่แสดงบนผิวเซลล์น้อยลง จนกระทั่ง TCR ของ CTL ตรวจไม่พบ หรือเซลล์มะเร็งลดการแสดงออกของมิกเอน้อยลงจนไม่สามารถส่งสัญญาณกระตุ้นได้เพียงพอให้เกิดการฆ่าเซลล์ ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้ง่ายขึ้น หรือมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ผู้ศึกษาเชื่อว่าการตรวจติดตามการแสดงออกของมิกเอในเซลล์มะเร็ง น่าจะมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัย NKG2D receptor น่าจะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการพยากรณ์ความรุนแรง หรือการตอบสนองการรักษา หรือการกลับเป็นซ้ำ แต่ปัจจุบันการตรวจการแสดงออกของมิกเอในเซลล์มะเร็งปากมดลูกยังไม่มีผู้รายงาน เนื่องจากยังไม่มีวิธีตรวจการแสดงออกของมิกเอ ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ในเนื้อเยื่อที่凍ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

วัตถุประสงค์โครงการ

จัดตั้งเทคนิคการตรวจหาการแสดงออกมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เพื่อใช้สำหรับศึกษาการตอบสนองของเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบอาศัย NKG2D receptor โดยดูความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MICA บนผิวเซลล์มะเร็งปากมดลูก

วัตถุประสงค์และวิธีการ

กลุ่มตัวอย่างศึกษาและตัวอย่างตรวจ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งภายใต้ชุดโครงการวิทยามะเร็งและภูมิคุ้มกันระดับโมเลกุลในโรคมะเร็งปากมดลูกผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หมายเลข HE480227 กลุ่มตัวอย่างศึกษาในโครงการได้จาก ผู้เข้ารับการตรวจรักษาโดยสูตินรีแพทย์ที่ คลินิกสูตินรีเวช โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เซ็นชื่อให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการ และผ่านการวินิจฉัย ยืนยันจากพยาธิแพทย์ ตามระบบ FIGO staging system³³ จำนวน 65 รายประกอบด้วย กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก 26 ราย, กลุ่ม dysplasia 16 ราย และกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) ที่มีผล ThinPrep^R ให้ผลลบ 25 ราย โดยสูตินรีแพทย์จะทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก ตั้งแต่ครั้งแรกที่มาตรวจรักษา

mouse monoclonal Anti-MICA

WW6B7, WW9B8 และ WJ1 เป็น Mouse monoclonal anti-MICA (Wongsena, et al. submitted) ผลิตขึ้นจากความร่วมมือกับ Dr. Soldano Ferrone, สถาบัน Roswell Park Cancer Institute, ประเทศสหรัฐอเมริกา การศึกษาครั้งนี้เริ่มต้นโดยใช้ anti-MICA (WW6B7) เจือจางด้วย PBS ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับปรับขั้นตอนการย้อมตัวอย่างชิ้นเนื้อตับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุม จากนั้นใช้ anti-MICA (WW9B8) เจือจางด้วย PBS ความเข้มข้น 10.0, 20.0, 22.0, 25.0, 30.0 $\mu\text{g/ml}$ และใช้ anti-MICA (WJ1) ด้วยความเข้มข้น 5.0, 7.0, 9.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

ตัวอย่างชิ้นเนื้อตับจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ตัวอย่างชิ้นเนื้อตับจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งมีผลการตรวจพบมิกะจากโครงการอื่นมาใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุมในการหาสถานะที่เหมาะสมในการจัดตั้งการตรวจการแสดงออกของมิกะของเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry:IHC)

การหาสถานะการย้อมมิกะที่เหมาะสมโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

นำสไลด์ชิ้นเนื้อตับซึ่งใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุมจากผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีหนา 4 μm ผ่านขั้นตอน deparaffinized โดยอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่อุณหภูมิ 60° ซ นาน 15 นาที และนำไปแช่ในอ่าง xylene 3 อ่าง โดยแช่ในอ่างแรกนาน 30 นาที และ อ่างที่เหลืออ่างละ 5 นาที จากนั้นขั้นตอน rehydrated โดย แช่ในอ่าง 100% เอทานอล 2 อ่าง และ 95% เอทานอล 2 อ่างละ 2 นาที ตามลำดับ แล้วแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที นำสไลด์ไป retrieve antigen โดยต้มใน citrate buffer (pH 6.0) นาน 20 นาที วางสไลด์ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นนำไปจุ่มใน

บัฟเฟอร์ 2 นาที ทำการยับยั้ง endogenous peroxidase activity ด้วยการแช่ใน 3 % H₂O₂ นาน 30 นาที และแช่ในบัฟเฟอร์ 2 อ่าง อ่างละ 5 นาที และ หยด protein block serum free buffer (DAKO) นาน 30 นาที เททิ้งเมื่อครบเวลา และเติม anti-MICA (WW6B7) ให้ท่วม และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องในอ่างความชื้น 1 คืน จากนั้นแช่ในบัฟเฟอร์ 2 อ่าง อ่างละ 5 นาที และ หยด mouse EnVision+ reagent (DAKO, Carpinteria, CA) ให้ท่วม และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องในอ่างความชื้น 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ ในบัฟเฟอร์ 2 อ่าง อ่างละ 5 นาที จากนั้นหยด DAB (diaminobenzidine) ให้ท่วม และวางในอ่างความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ล้างโดยผ่าน น้ำประปา 5 นาที ย้อมทับด้วย hematoxylin (ACTA) โดยการจุ่ม 10 ครั้ง นาน 10 วินาที ล้างโดย ผ่านน้ำประปา 5 นาที จากนั้น dehydrated โดยแช่ในอ่าง 95% เอทานอล 2 อ่าง, 100% เอทานอล 2 อ่าง xylene 2 อ่าง อ่างละ 2 นาที และปิดทับด้วย permount ตามลำดับ เมื่อทราบความเข้มข้น anti-MICA (WW6B7) สำหรับใช้ย้อมชิ้นเนื้อควบคุมในเบื้องต้นแล้ว แต่ผลการย้อมมิเคเอได้ผลยังไม่ ชัดเจน และมี nonspecific background จึงได้ปรับขั้นตอนการย้อม โดยแช่ใน xylene นานขึ้น 30 นาที แทนการการอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ 60° ซ ก่อนการ deparaffin และใช้น้ำยา protein block serum free buffer แทน 3 % fetal bovine serum สำหรับขั้นตอนการ block nonspecific binding เพื่อให้ ได้ผลการย้อมชัดเจน

การย้อมมิเคเอโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก

ทดลองย้อมมิเคเอในชิ้นเนื้อปากมดลูกจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก(cervical cancer) เทียบ กับกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย anti-MICA (WW6B7, WW9B8 , WJ1) ที่ความเข้มข้นเหมาะสม

การอ่านผลและรายงานผลการย้อมมิเคเอโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในชิ้นเนื้อ

วิธีรายงานผลคัดแปลงจากที่เคยมีผู้รายงานผลการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี^{34,35} แต่ละสไลด์ จะประเมินในภาพรวมโดยอ่านผลอย่างน้อย 5 บริเวณทั่วทั้งสไลด์ และให้คะแนนเป็นเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณดังนี้

1) ผลเชิงคุณภาพ: พิจารณาจากความเข้มการย้อมติด (immunoreactive intensity) แบ่งเป็น เป็น 4 ระดับ โดยให้ค่าคะแนนดังนี้ 0 คะแนน(no staining)แสดงถึงเซลล์ย้อมไม่ติด, 1 คะแนน (weak staining)แสดงถึงเซลล์มีความเข้มการย้อมติดน้อย, 2 คะแนน(moderate staining)แสดงถึง เซลล์มีความเข้มการย้อมติดปานกลาง, 3 คะแนน(intense staining)แสดงถึงเซลล์มี ความเข้มการย้อมติดเข้มชัดเจน

2) ผลเชิงปริมาณพิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่ย้อมติด (immunoreactive cell number) แบ่งเป็นเป็น 4 ระดับ โดยให้ค่าคะแนนดังนี้ 0 คะแนน (<10% stained cell) แสดงถึงเซลล์ย้อมติดน้อยกว่าร้อยละ 10 %, 1 คะแนน(10-40% stained cell)แสดงถึงเซลล์ย้อมติดร้อยละ 10-40 %, 2 คะแนน(40-60% stained cell)แสดงถึงเซลล์ย้อมติดร้อยละ 40-60 %, 3 คะแนน(>60% stained cell)แสดงถึงเซลล์ย้อมติดมากกว่าร้อยละ 60 %

นำค่าคะแนนเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณคูณกัน ได้เป็นผลค่าคะแนนสุดท้าย (final score)

ผลการศึกษา

ผลการหาสถานะการย้อมมิกเอที่เหมาะสมโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการย้อมมิกเอในชิ้นเนื้อตับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุม ด้วย mouse monoclonal Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) พบว่า WW6B7 ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้ผลย้อมติดจางๆ(w+) (ตาราง 1-I) เมื่อเพิ่มความเข้มข้น Anti-MICA (WW6B7) เป็น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$, anti-MICA (WW9B8) 10.0, 20.0, 30.0 $\mu\text{g/ml}$ และ anti-MICA (WJ1) 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ พบว่าความเข้มข้น Anti-MICA (WW6B7) 2.0, 3.0 $\mu\text{g/ml}$, anti-MICA (WW9B8) 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ และ anti-MICA (WJ1) 5.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้ผลย้อมติดจางๆไม่ชัดเจน(w+) (ตาราง 1-II) แต่ความเข้มข้น Anti-MICA (WW6B7) 4.0, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$, anti-MICA (WW9B8) 30.0 $\mu\text{g/ml}$ และ anti-MICA (WJ1) 10.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้ผลย้อมติดไม่ชัด โดยมีลักษณะการติดแบบไม่จำเพาะร่วม(?/bg) (ตาราง 1-II) แสดงว่าความเข้มข้น Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) ที่เหมาะสมน่าจะอยู่ในช่วงมากกว่า 4.0, 20.0, 5.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ แต่ขั้นตอนการย้อมยังไม่เหมาะสม เมื่อปรับขั้นตอนการย้อมโดยแช่ใน xylene นานขึ้น 30 นาที แทนการอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ 60° ซ ก่อนการ deparaffin และใช้น้ำยา protein block serum free buffer (DAKO) แทน 3 % fetal bovine serum ในขั้นตอนการ block nonspecific binding เมื่อทำการย้อมใหม่โดยใช้ Anti-MICA (WW6B7) ความเข้มข้น 4.0, 6.0, 8.0 $\mu\text{g/ml}$, anti-MICA (WW9B8) 22.0, 25.0 $\mu\text{g/ml}$ และ anti-MICA (WJ1) 7.0, 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ(ตาราง 1-III) พบว่า Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) ความเข้มข้น 6.0, 25.0, 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับได้ผลย้อมติดชัดเจน(3+)โดยไม่มี nonspecific background แต่ Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) ความเข้มข้น 4.0, 22.0, 7.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับได้ผลย้อมติดจางๆ(w+) เมื่อย้อมซ้ำโดยใช้ Anti-MICA (WW6B7, WW9B8, WJ1) ความเข้มข้น 6.0, 25.0, 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ พบว่าได้ผลย้อมติดชัดเจน(3+)โดยไม่มี nonspecific background (ตาราง 1-IV) ผลย้อมมิกเอในชิ้นเนื้อตับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุม ด้วย anti-MICA(WW6B7) ความเข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/ml}$ จะมีรูปแบบการติดสีกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining pattern) ดังแสดงในรูป 1

ผลย้อมมิกเอโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก

ผลย้อมมิกเอในชิ้นเนื้อปากมดลูกจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก(cervical cancer) 10 รายและกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) 5 ราย โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย WW6B7 ความ

เข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/ml}$, WW9B8 ความเข้มข้น 25.00 $\mu\text{g/ml}$ และ WJ1 ความเข้มข้น 9.0 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าแอนติบอดี ทั้ง 3 ชนิดสามารถย้อมติดได้ผลสอดคล้องกันทั้ง 9 ราย แตกต่างเพียง 1 ราย (CACX8270) ที่ WW9B8 สามารถย้อมติดชัดเจน (final score=9) และ WJ1 ย้อมติดได้อ่อนๆ (final score = 2) แต่ย้อมไม่ติดด้วย WW6B7 (final score=0) ดังแสดงในตาราง 2 โดยลักษณะการย้อมติดมิกเอของเซลล์มะเร็ง จะมีรูปแบบการติดสีกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining pattern) ดังแสดงในรูป 1 ผลย้อมมิกเอในชิ้นเนื้อปากมดลูกจากชิ้นเนื้อปากมดลูกของกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก(myoma) พบว่าตัวอย่างทั้ง 5 ราย ย้อมไม่ติด(final score = 0) ด้วยแอนติบอดีทั้ง 3 ตัว ดังแสดงในตาราง 2

ผลย้อมมิกเอโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในชิ้นเนื้อปากมดลูกกลุ่มศึกษา

ผลย้อมมิกเอโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย WW6B7 ความเข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/ml}$, WW9B8 ความเข้มข้น 25.00 $\mu\text{g/ml}$ และ WJ1 ความเข้มข้น 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ในชิ้นเนื้อปากมดลูกที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินจำนวน 65 ราย ผลการศึกษาพบว่า

กลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง 26 รายมีค่ามัธยฐานของ immunoreactive cell number score(A=3); immunoreactive intensity score(B=1); และ final score (A*B=3) ด้วย WW6B7, (A=3, B=1); ค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 6 (A=3,B=2) ด้วย WW9B8 ค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 3 (A=3,B=1) ด้วย WJ1 (ตาราง 3) โดยมีช่วงค่า final score >6 ร้อยละ 41.7-53.8, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 37.5-40.0, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 3.85-4.17, ค่า final score =0 ร้อยละ 3.85-16.7 เมื่อพิจารณาจากค่า final score ร่วมกันพบว่ามีค่า final score >6 ร้อยละ 84.6, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 11.5, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 3.85, ค่า final score =0 ร้อยละ 0 (ตาราง 6)

กลุ่ม dysplasia 16 ราย มีค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 0 (A=0,B=0) ด้วย WW6B7, ค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 7.5 (A=3,B=3) ด้วย WJ1 (ตาราง 4) โดยมีช่วงค่า final score >6 ร้อยละ 0-75.0, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 0-18.8, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 0-43.8, ค่า final score =0 ร้อยละ 6.2-56.3 เมื่อพิจารณาจากค่า final score ร่วมกันพบว่ามีค่า final score >6 ร้อยละ 75.0, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 18.8, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 0, ค่า final score 0 ร้อยละ 6.25 (ตาราง 6)

กลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) 25 ราย มีค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 0 (A=0,B=0) ด้วย WW6B7, WW9B8 และ WJ1 (ตาราง 5) โดยมีช่วงค่า final score >6 ร้อยละ 0-17.4, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 0-8.7, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 0-11.8, ค่า final score =0 ร้อยละ

73.9-100 เมื่อพิจารณาจากค่า final score ร่วมกันพบว่า มีค่า final score >6 ร้อยละ 16.0, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 8.0, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 4, ค่า final score 1 ร้อยละ 72.0 (ตาราง 6)

การวิเคราะห์ผลข้อมูลมิกเอ โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย WW6B7 ความเข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/ml}$, WW9B8 ความเข้มข้น 25.00 $\mu\text{g/ml}$ และ WJ1 ความเข้มข้น 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ในชิ้นเนื้อปากมดลูกที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง 24 ราย และกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) 14 รายพบว่า แอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดให้ผลสอดคล้องกันส่วนใหญ่ โดย ให้ผลบวกตรงกัน 18 ราย(75%) และให้ผลลบตรงกัน 11ราย(79%) ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง และกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) ตามลำดับ โดยที่ WW9B8 และ WJ1 มีแนวโน้มให้ผลบวกมากกว่า WW6B7 เล็กน้อยทั้งในกลุ่ม ผู้ป่วยมะเร็ง และกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) (ตาราง 7)

การวิเคราะห์ผลข้อมูลมิกเอ โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย WW6B7 ความเข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/ml}$, และ WJ1 ความเข้มข้น 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ในชิ้นเนื้อปากมดลูกที่แช่ในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง 24 ราย กลุ่ม dysplasia 16 รายและกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) 16 รายพบว่าแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิดให้ผลสอดคล้องกันโดย ให้ผลบวกตรงกัน 18 ราย(75%)ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง, 7 ราย(43.75%) ในกลุ่ม dysplasia และ ให้ผลลบตรงกัน 1ราย(6.3%)ในกลุ่ม dysplasia และ 12 ราย(75.0%)ในกลุ่มไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) ตามลำดับ โดยที่ WJ1 มีแนวโน้มให้ผลบวกมากกว่าโดยให้ผลบวก 4 ราย(16.7%)ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง, 8 ราย(50.0%) ในกลุ่ม dysplasia และ 4 ราย(25.0%)ในกลุ่มไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) ตามลำดับ โดยที่ WW6B7 ให้ผลลบ (ตาราง 8)

Table 1 Optimization of MICA staining by immunohistochemistry technique with mouse monoclonal anti- MICA (WW6B7, WW9B8 and WJ1)

Mouse monoclonal anti-MICA ($\mu\text{g/ml}$)	Staining result			
	1-I	1-II	1-III	1-IV
WW6B7				
0.5	w+	/	/	/
1.0	w+	/	/	/
2.0	w+	w+	/	/
3.0	/	w+	/	/
4.0	/	?/bg	w+	/
5.0	/	?/bg	/	/
6.0	/	/	3+	3+
8.0	/	/	3+	/
10.0	/	?/bg	/	/
20.0	/	?/bg	/	/
WW9B8				
10.0	/	w+	/	/
20.0	/	w+	/	/
22.0	/	/	w+	/
25.0	/	/	3+	3+
30.0	/	?/bg	/	/
WJ1				
5.0	/	w+	/	/
7.0	/	/	W+	/
9.0	/	/	3+	3+
10.0	/	?/bg	/	/
20.0	/	?/bg	/	/

w+ = weak, ? = not clear, bg = high background, 3+ = well and clear, / = not done

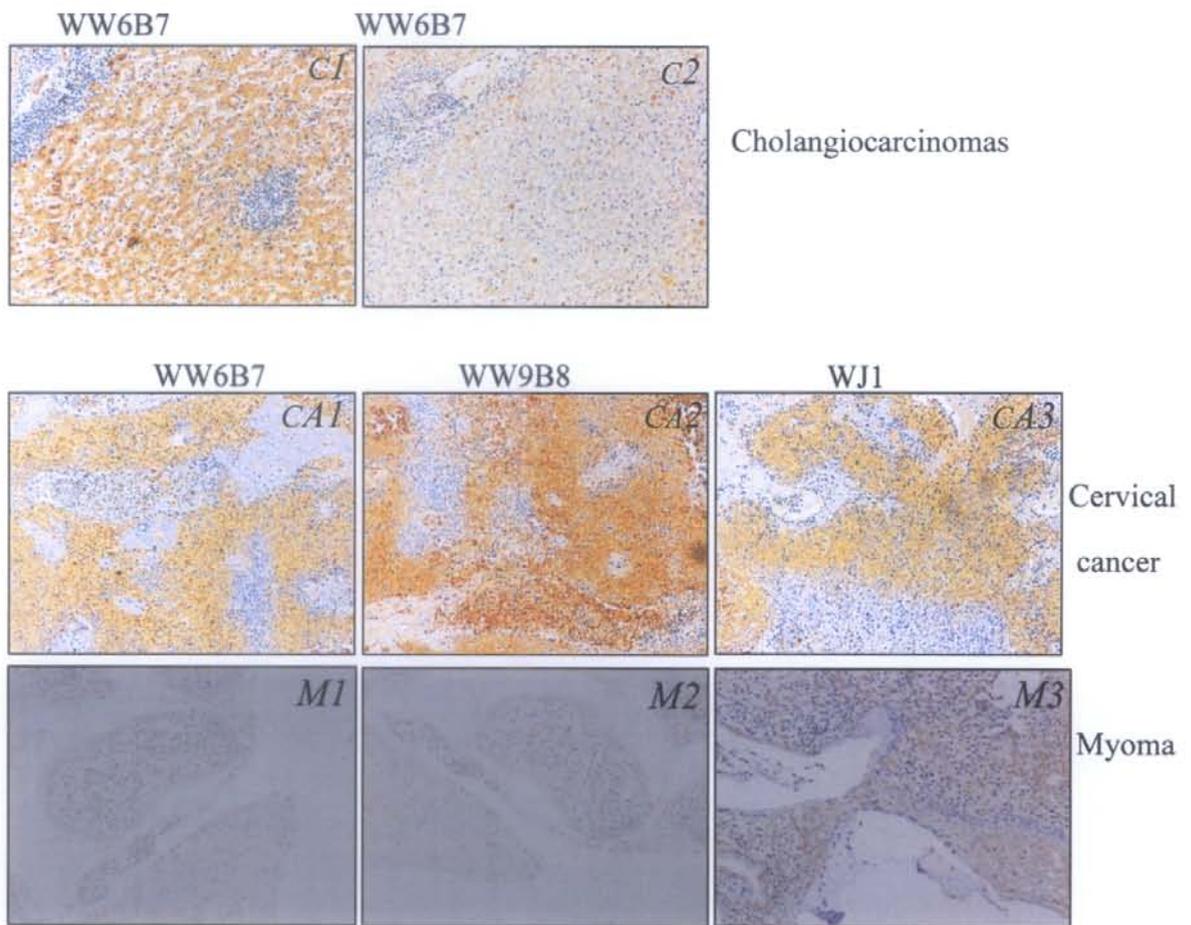


Figure 1 Immunohistochemical staining for MICA with 6.0 $\mu\text{g/ml}$ of mouse monoclonal anti-MICA(WW6B7) in cholangiocarcinomas(CCA) liver tissue sections (*C1*, *C2*). Positive MICA staining was a cytoplasmic staining pattern. The results of staining score (immunoreactive cell number/ intensity) were; 3/3 for *C1* and 3/1 for *C2* tissue sections. The final scores of *C1* and *C2* were 9 and 3 respectively. Three mouse monoclonal anti-MICA(WW6B7, WW9B8 and WJ1) were used to stained cervical tissue sections from 3 cervical cancer cases (*CA1*, *CA2*, *CA3*) and 3 myoma cases (*M1*, *M2*, *M3*) The staining scores (immunoreactive cell number/ intensity) with 6.0 $\mu\text{g/ml}$ of WW6B7 were 3/2 for *CA1*, 0/0 for *M1* and with 25.0 $\mu\text{g/ml}$ of WW9B8 were 3/3 for *CA2*, 0/0 for *M2* and with 9.0 $\mu\text{g/ml}$ of WJ1 were 3/2 for *CA3*, 0/0 for *M3* respectively. The final scores of *CA1*, *CA2*, *CA3* were 6,9,6 respectively and 0 in all sections from the myoma cases (*M1*, *M2*, *M3*) (immunoreactive cell number score; 0 <10%, 1=10-40%, 2=40-60%, 3>60%, immunoreactive intensity score; 0=no staining, 1=weak staining, 2=moderate staining, 3=intense staining)

Table 2 The MICA immunohistochemistry results of cervical tissue sections using mouse monoclonal anti-MICA (WW6B7, WW9B8 and WJ1) in 10 cases of cervical cancer and 5 cases of non cervical cancer.

Cervical tissue sections code	WW6B7			WW9B8			WJ1		
	staining score		Final Score	staining score		Final Score	staining score		Final Score
	A	B	(A*B)	B	A	(A*B)	A	B	(A*B)
CACX 8653	3	2	6	3	2	6	3	1	3
CACX 9484	3	2	6	3	2	6	3	3	9
CACX 9713	3	1	3	3	2	6	3	1	3
CACX 916	3	3	9	3	2	6	3	1	3
CACX 2410	3	3	9	3	3	9	3	3	9
CACX 889	3	2	6	3	1	3	3	2	6
CACX 1261	3	1	3	3	1	3	3	2	6
CACX 261	3	1	3	3	1	3	3	2	6
CACX 228	2	2	4	3	1	3	3	1	3
CACX 8270	0	0	0	3	3	9	2	1	2
My 1616	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My 1410	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My 1244	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My 1245	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My 278	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CACX= cervical cancer, My= myoma,

A= immunoreactive cell number score; 0 <10%, 1=10-40%, 2=40-60%, 3>60%,

B= immunoreactive intensity score; 0=no staining, 1=weak staining, 2=moderate staining, 3=intense staining

Table 3 The MICA immunohistochemistry results of cervical tissue sections using mouse monoclonal anti-MICA (WW6B7, WW9B8 and WJ1) in 26 cases of cervical cancer.

code	Cervical tissue sections	immunoreactive staining score								
		WW6B7			WW9B8			WJ1		
		A	B	A*B	A	B	A*B	A	B	A*B
CA1	S43-8653A	3	2	6	3	2	6	3	1	3
CA2	S44-334A	3	1	3	3	1	3	3	2	6
CA3	S43-9484A	3	2	6	3	2	6	3	3	9
CA4	S42-3754A	3	3	9	3	3	9	3	3	9
CA5	S43-9713A	3	1	3	3	2	6	3	1	3
CA6	S44-916A	3	3	9	3	2	6	3	1	3
CA7	S44-498A	3	1	3	3	3	9	3	2	6
CA8	S44-941A	3	1	3	3	2	6	3	1	3
CA9	S44-537A	3	2	6	3	1	3	3	3	9
CA10	S45-2410A	3	3	9	3	3	9	3	3	9
CA11	S43-889A	3	2	6	3	1	3	3	2	6
CA12	S44-1261A	3	1	3	3	1	3	3	2	6
CA13	S44-8206A	/	/	/	3	3	9	3	3	9
CA14	S44-261A	3	1	3	3	1	3	3	2	6
CA15	S44-228A	2	2	4	3	1	3	3	1	3
CA16	S45-8270A	0	0	0	3	3	9	2	1	2
CA17	S44-1413A	0	0	0	3	1	3	3	1	3
CA18	S44-2492A	/	/	/	3	2	6	/	/	/
CA19	S44-7071A	0	0	0	3	2	6	3	2	6
CA20	S44-2536A	3	1	3	2	1	2	0	0	0
CA21	S44-4891A	3	2	6	3	1	3	3	1	3
CA22	S44-4220A	3	2	6	3	1	3	3	1	3
CA23	S44-2361A	0	0	0	3	2	6	3	1	3
CA24	S44-3473A	1	1	1	0	0	0	0	0	0
CA25	S44-4013A	3	1	3	2	2	4	3	2	6
CA26	S44-3782A	3	2	6	3	2	6	3	1	3
n		24	24	24	26	26	26	25	25	25
median		3	1	3	3	2	6	3	1	3

CACX= cervical cancer, Dys= dysplasia, My= myoma,
 A= immunoreactive cell number score; 0 <10%, 1=10-40%, 2=40-60%, 3>60%,
 B= immunoreactive intensity score; 0=negative, 1=weak, 2=moderate, 3=intense
 A*B= final score , / = not tested

Table 4 The MICA immunohistochemistry results of cervical tissue sections using mouse monoclonal anti-MICA (WW6B7, WW9B8 and WJ1) in 16 cases of dysplasia.

code	Cervical tissue sections	immunoreactive staining score								
		WW6B7			WW9B8			WJ1		
		A	B	A*B	A	B	A*B	A	B	A*B
Dys1	S49-1286A	0	0	0	/	/	/	3	3	9
Dys2	S48-5355C	1	1	1	/	/	/	3	2	6
Dys3	S48-5356A	0	0	0	/	/	/	1	3	3
Dys4	S48-11542A	1	1	1	/	/	/	3	3	9
Dys5	S48-5851D	2	1	2	/	/	/	3	2	6
Dys6	S48-10651A	0	0	0	/	/	/	3	1	3
Dys7	S48-8346C	0	0	0	/	/	/	0	0	0
Dys8	S48-8227A	0	0	0	/	/	/	3	3	9
Dys9	S48-6131A	0	0	0	/	/	/	2	2	4
Dys10	S48-10135A	0	0	0	/	/	/	3	3	9
Dys11	S48-11543A	3	1	3	/	/	/	3	2	6
Dys12	S48-7231A	3	1	3	/	/	/	3	3	9
Dys13	S48-10132B	0	0	0	/	/	/	3	3	9
Dys14	S48-7497A	1	1	1	/	/	/	3	2	6
Dys15	S48-7532A	0	0	0	/	/	/	3	3	9
Dys16	S49-1291A	3	2	6	/	/	/	3	3	9
n		16	16	16	0	0	0	16	16	16
median		0	0	0	/	/	/	3	3	7.5

CACX= cervical cancer, Dys= dysplasia, My= myoma,

A= immunoreactive cell number score; 0 <10%, 1=10-40%, 2=40-60%, 3>60%,

B= immunoreactive intensity score; 0=negative, 1=weak, 2=moderate, 3=intense

A*B= final score, / = not tested

Table 5 The MICA immunohistochemistry results of cervical tissue sections using mouse monoclonal anti-MICA (WW6B7, WW9B8 and WJ1) in 26 cases of myoma.

code	Cervical tissue sections	immunoreactive staining score								
		WW6B7			WW9B8			WJ1		
		A	B	A*B	A	B	A*B	A	B	A*B
My1	S47-979A	0	0	0	/	/	/	2	2	4
My2	S47-1806A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My3	S47-1719A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My4	S47-1753A	0	0	0	0	0	0	3	2	6
My5	S47-1461A	/	/	/	/	/	/	0	0	0
My6	S47-1447A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My7	S47-1244A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My8	S47-1245A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My9	S47-278A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My10	S47-655A	0	0	0	/	/	/	/	/	/
My11	S47-723A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My12	S47-540A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My13	S47-563A	/	/	/	/	/	/	3	3	9
My14	S47-462A	0	0	0	2	1	2	0	0	0
My15	S47-1141A	0	0	0	/	/	/	3	2	6
My16	S47-407A	/	/	/	0	0	0	0	0	0
My17	S47-365A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My18	S47-928A	0	0	0	1	1	1	3	2	6
My19	S47-574A	/	/	/	/	/	/	0	0	0
My20	S47-747A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My21	S47-141A	/	/	/	/	/	/	3	1	3
My22	S47-142A	0	0	0	0	0	0	/	/	/
My23	S47-484A	/	/	/	0	0	0	0	0	0
My24	S47-700A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
My25	S47-724A	/	/	/	0	0	0	0	0	0
My26	S47-1410A	0	0	0	/	/	/	/	/	/
n		18	18	18	17	17	17	23	23	23
median		0	0	0	0	0	0	0	0	0

CACX= cervical cancer, Dys= dysplasia, My= myoma,
 A= immunoreactive cell number score; 0 <10%, 1=10-40%, 2=40-60%, 3>60%,
 B= immunoreactive intensity score; 0=negative, 1=weak, 2=moderate, 3=intense
 A*B= final score, / = not tested

Table 6 The final scores of MICA immunohistochemistry results of cervical tissue sections using mouse monoclonal anti-MICA (WW6B7, WW9B8 and WJ1) in 26 cases of cervical cancer, 16 cases of dysplasia and 26 cases of myoma.

MICA immunohistochemistry (Final score)	+cases (%)			
	WW6B7	WW9B8	WJ1	*
Cervical cancer cases:	N=24	N=26	N=25	N=26
0	4(16.7%)	1(3.85%)	2(8.0%)	0(0.0%)
1-2	1(4.17%)	1(3.85%)	1(4.0%)	1(3.9%)
3-4	9(37.5%)	10(38.5%)	10(40.0%)	3(11.5%)
>6	10(41.7%)	14(53.8%)	12(48.0%)	22(84.6%)
Dysplasia cases:	N=16	N=0	N=16	N=16
0	9(56.3%)	/	1(6.2%)	1(6.25%)
1-2	7(43.8%)	/	0(0.0%)	0(0.0%)
3-4	0(0.0%)	/	3(18.8%)	3(18.8%)
>6	0(0.0%)	/	12(75.0%)	12(75.0%)
Myoma cases:	N=19	N=17	N=23	N=25
0	19(100%)	16(88.9%)	17(73.9%)	18(72.0%)
1-2	0(0.0%)	2(11.1%)	0(0.0%)	1(4.0%)
3-4	0(0.0%)	0(0.0%)	2(8.7%)	2(8.0%)
>6	0(0.0%)	0(0.0%)	4(17.4%)	4(16.0%)

* summarized from the highest final scores of MICA immunohistochemistry staining, / = not tested

Table 7 MICA immunohistochemistry results of cervical tissue sections using mouse monoclonal anti-MICA (WW6B7, WW9B8 and WJ1) in 24 cases of cervical cancer and 14 cases of myoma.

immunoreactive staining result			+cases (%)	
WW6B7	WW9B8	WJ1	Cervical cancer	Myoma cases
pos	pos	pos	18(75.0%)	0(0.0%)
pos	pos	neg	1(4.2%)	0(0.0%)
pos	neg	neg	1(4.2%)	0(0.0%)
neg	pos	pos	4(16.7%)	1(7.1%)
neg	neg	pos	0(0.0%)	1(7.1%)
neg	pos	neg	0(0.0%)	1(7.1%)
neg	neg	neg	0(0.0%)	11(79.0%)
n			24	14

*positive = final score >1, negative = 0

Table 8 MICA immunohistochemistry results of cervical tissue sections using mouse monoclonal anti-MICA (WW6B7 and WJ1) in 24 cases of cervical cancer, 16 cases of dysplasia and 16 cases of myoma.

WW6B7	WJ1	Cervical cancer	Dysplasia cases	Myoma cases
pos	pos	18(75.0%)	7(43.8%)	0(0.0%)
pos	neg	2(8.3%)	0(0.0%)	0(0.0%)
neg	pos	4(16.7%)	8(50.0%)	4(25.0%)
neg	neg	0(0.0%)	1(6.3%)	12(75.0%)
n		24	16	16

* positive = final score >1, negative = 0

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษานี้สามารถพัฒนาวิธีตรวจหาการแสดงออกมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกบนเนื้อเยื่อที่ดองเก็บในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ได้โดยวิธีย้อมอิมโมโนฮิสโตเคมี โดยใช้ mouse monoclonal anti-MICA 3 ชนิด ได้แก่ WW6B7, WW9B8 และ WJ1 โดย WW6B7 ความเข้มข้น 6.0 $\mu\text{g/ml}$, WW9B8 ความเข้มข้น 25.00 $\mu\text{g/ml}$ และ WJ1 ความเข้มข้น 9.0 $\mu\text{g/ml}$ ได้ผลการย้อมมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชัดเจน โดยพบว่ามิกเอมีการกระจายทั่วไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining pattern) นับเป็นแอนติบอดีตัวแรกในโลกที่สามารถย้อมบนเนื้อเยื่อที่ดองเก็บในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน การใช้แอนติบอดีมากกว่าหนึ่งชนิดแม้ว่าทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากขึ้น แต่จะช่วยสนับสนุนกันในรายที่ผลสอดคล้องกัน และได้ทำให้ย้อมได้ครอบคลุมอัลลีลที่แตกต่างกันของมิกเอซึ่งแอนติบอดีบางตัวอาจย้อมไม่ติด³⁶ จึงเป็นการเพิ่มความไวการตรวจให้สูงขึ้นกว่าการใช้แอนติบอดีเพียงชนิดเดียว ดังที่พบในตัวอย่าง 1 ราย (CACX8270) ที่ ย้อมไม่ติดโดย WW6B7 แต่สามารถติดได้ชัดเจนด้วย WW9B8 (final score=9) และย้อมติดได้จางๆ (final score=2) ด้วย WJ1 ดังผลในตารางที่ 2 เหตุผลประการแรกคือ แอนติบอดีแต่ละตัวอาจมีคุณสมบัติเกิดปฏิกิริยาต่อส่วนของแอนติเจนที่ต่างกัน ทำให้มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาได้แตกต่างกัน แต่นั่นไม่ได้หมายความว่า WW9B8 มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่า WJ1 และ WW6B7 ตามลำดับเสมอไป เพราะมีตัวอย่างบางรายที่ผลการย้อมด้วย WW6B7 สามารถย้อมติดได้ดีกว่า (CACX 2410) และบางรายที่ผลการย้อมด้วย WJ1 สามารถย้อมติดได้ดีกว่า (CACX 9484) เหตุผลประการที่สองคือปัจจุบันมีรายงานมิกเอมากกว่า 59 อัลลีล³⁷⁻⁴¹ ดังนั้นการตรวจโดยใช้แอนติบอดีเพียง 1 ชนิดเป็นไปได้ยากที่จะสามารถให้ผลได้ครอบคลุมต่อการเกิดปฏิกิริยากับมิกเอได้ทุกอัลลีล ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้ผลการย้อมอิมโมโนฮิสโตเคมีจากแอนติบอดี 3 ชนิด เพื่อให้ได้ผลที่ครอบคลุมต่อมิกเออัลลีลต่างๆ ได้มากขึ้น และผลการศึกษาสนับสนุนว่าควรใช้แอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด วิธีตรวจการแสดงออกมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยการย้อมอิมโมโนฮิสโตเคมีจากการศึกษานี้ มีประโยชน์สามารถนำไปใช้ศึกษาการตอบสนองของเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบอาศัย NKG2D receptor โดยดูความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกมิกเอของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ต่อไป อันจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล ของเซลล์มะเร็งที่จะสามารถใช้ตรวจกรองหรือพยากรณ์ ความรุนแรงของโรค และใช้ ติดตามผลการรักษาได้ มิกเอเป็น ligands ต่อตัวรับ NKG2D ทำหน้าที่ในการกระตุ้น NK cells และ co-stimulate T cells^{6,10} มีบทบาทอย่างมากในการกำจัดเซลล์มะเร็งและสร้างเสริมภูมิคุ้มกันในการต่อสู้กับโรคมะเร็ง^{7,22,42,43} โดยมีงานวิจัยหลาย

ฉบับที่แสดงว่ามีคเอลลิสมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายชนิดเช่น PERB11.1*TM06 ซึ่งประกอบด้วย 9 GCT monomers และมีความสัมพันธ์กับ HLA-Cw*06 นั้นสัมพันธ์กับการเกิดโรค Psoriasis⁴⁴ และ MICA-ABCD ซึ่งสัมพันธ์กับ HLA-B*5101 มีความสัมพันธ์กับโรค Bechet disorder⁴⁵ การที่มีคเอลลิสความหลากหลายมากทั้งในระดับดีเอ็นเอ และโปรตีน บางอัลลีลเช่น MICA*010 จะมีการแทนที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6 โดยเปลี่ยนจากอาร์จินีนเป็นโพรลีน ทำให้โครงสร้างเกิดความผิดปกติไม่เสถียร และทำให้ไม่สามารถแสดงออกบนผิวเซลล์⁴⁶ หรืออาจเกิดจากแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาไม่สามารถตรวจพบได้ เป็นที่น่าสังเกตว่าอัลลีลดังกล่าวมักจะพบร่วมกับ HLA-B*46³⁷ ซึ่งเป็นอัลลีลที่พบได้บ่อยที่สุดในชาวไทยอีสาน⁴⁶ และมีความสัมพันธ์กับโรคมะเร็งหลังโพรงจมูก (nasopharyngeal carcinoma) ที่พบได้บ่อยในคนจีนตอนใต้⁴⁷ รวมทั้งคนไทยอีสาน จึงน่าจะมีผลต่อการกระตุ้น NK cells ดังนั้นคเอลลิสมีความสำคัญต่อการเกิดโรค ที่ควรได้รับการศึกษาโดยเฉพาะในโรคมะเร็งต่างๆ การศึกษาคั้งนี้นับว่ามีประโยชน์สามารถพัฒนาวิธีตรวจหาการแสดงออกมิกเอจากเนื้อเยื่อปากมดลูกที่ดองเก็บในฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินได้ด้วยวิธีย้อมอิมโมโนฮิสโตเคมีโดยควรใช้แอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดเพื่อเพิ่มความไวของวิธีตรวจให้สามารถครอบคลุมอัลลีลที่แตกต่างกันของมิกเอ การศึกษาตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูกจำนวน 68 ราย จากกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก 26 ราย กลุ่ม dysplasia 16 รายและกลุ่มที่ไม่เป็นมะเร็งปากมดลูก(myoma) 26 ราย ถูกย้อมด้วย WW6B7, WW9B8, WJ1 กลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง 26 รายมีค่ามัธยฐานของ immunoreactive cell number score(A=3); immunoreactive intensity score(B=1); และ final score (A*B=3) ด้วย WW6B7, (A=3, B=1); ค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 6 (A=3,B=2) ด้วย WW9B8 ค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 3 (A=3,B=1) ด้วย WJ1 โดยมีช่วงค่า final score >6 ร้อยละ 41.7-53.8, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 37.5-40.0, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 3.85-4.17, ค่า final score =0 ร้อยละ 3.85-16.7 เมื่อพิจารณาจากค่า final score ร่วมกันพบว่ามีค่า final score >6 ร้อยละ 84.6, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 11.5, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 3.85, ค่า final score =0 ร้อยละ 0 กลุ่ม dysplasia 16 ราย มีค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 0 (A=0,B=0) ด้วย WW6B7, ค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 7.5 (A=3,B=3) ด้วย WJ1 โดยมีช่วงค่า final score >6 ร้อยละ 0-75.0, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 0-18.8, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 0-43.8, ค่า final score =0 ร้อยละ 6.2-56.3 เมื่อพิจารณาจากค่า final score ร่วมกันพบว่ามีค่า final score >6 ร้อยละ 75.0, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 18.8, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 0, ค่า final score 0 ร้อยละ 6.25 กลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งปากมดลูก (myoma) 26 ราย มีค่ามัธยฐานของ final score เท่ากับ 0 (A=0,B=0) ด้วย WW6B7, WW9B8 และ WJ1 โดยมีช่วงค่า final score >6 ร้อยละ 0-17.4, ค่า final score 3-4 ร้อย

ละ 0-8.7, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 0-11.8, ค่า final score =0 ร้อยละ 73.9-100 เมื่อพิจารณาจากค่า final score ร่วมกันพบว่าเมื่อค่า final score >6 ร้อยละ 16.0, ค่า final score 3-4 ร้อยละ 8.0, ค่า final score 1-2 ร้อยละ 4, ค่า final score 1 ร้อยละ 72.0 แสดงว่าอัตรา การพบการแสดงออกของมิกะของเนื้อเยื่อปากมดลูกจะสูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง และกลุ่ม dysplasia สนับสนุนว่าการแสดงออกของมิกะในเซลล์มะเร็ง น่าจะมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบอาศัย NKG2D receptor ดังนั้นการตรวจ การแสดงออกของมิกะของเนื้อเยื่อปากมดลูก น่าจะมีประโยชน์ที่บ่งถึงความผิดปกติของเนื้อเยื่อปากมดลูกได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการ วิจัยมะเร็งและภูมิคุ้มกันระดับโมเลกุลในโรคมะเร็งปากมดลูก โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2548 และ 2550