

4. ผลการวิจัย (Result)

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างผู้หญิงที่มีเซลล์ปากมดลูกผิดปกติในระดับ LSIL และทราบผลการตรวจ HPV genotype ใน scraped cervical cells จำนวน 60 รายถูกแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่ม cases ซึ่งให้การรักษา โดย cryosurgery จำนวน 29 ราย และกลุ่ม control ซึ่งไม่ได้รับการรักษา จำนวน 31 ราย

CVL ที่เก็บจากทั้งสองกลุ่มได้รับการตรวจหาระดับของ TNF- α , IL-10 และ IFN- γ โดยวิธี ELISA ส่วนชิ้นเนื้อปากมดลูกถูกสกัด RNA เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ TNF- α , IL-10 และ IFN- γ โดยวิธี quantitative real time PCR

หลังจากได้รับการรักษา 6 เดือน CVL และ scraped cervical cells ถูกเก็บจากกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม เพื่อตรวจหาระดับ cytokines และ HPV genotype ตามลำดับ

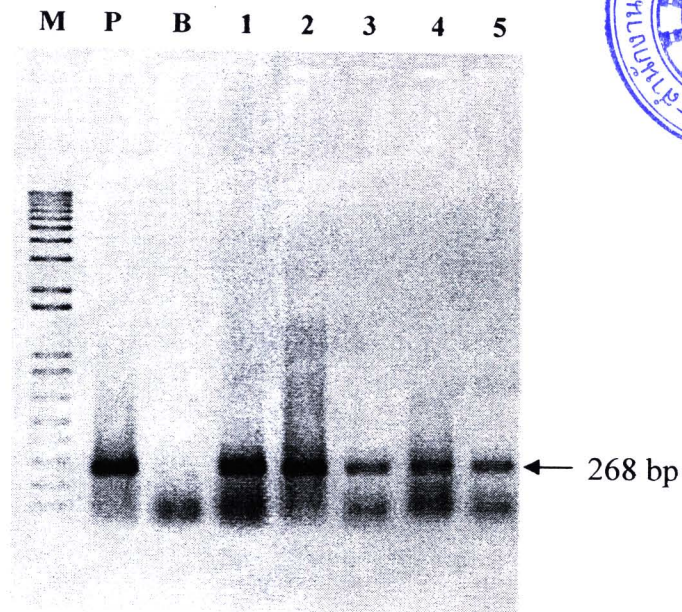
2. การตรวจ HPV DNA ในตัวอย่างตรวจ

Scraped cervical cells ของกลุ่มตัวอย่างผู้หญิงที่มีเซลล์ปากมดลูกผิดปกติในระดับ LSIL ถูกสกัดให้ได้ DNA สำหรับการตรวจ HPV DNA และ HPV genotype หลังจากสกัด DNA ต้องตรวจคุณภาพของ DNA โดยการเพิ่มปริมาณ β -globin gene ซึ่งเป็น housekeeping gene โดยวิธี PCR จะได้ PCR product ขนาด 268 bp ดังแสดงในรูปที่ 1

DNA ที่มีคุณภาพจะนำไปตรวจหา HPV DNA โดยการเพิ่มปริมาณ HPV L1 gene โดยวิธี PCR ด้วย primers ชนิด GP5+/GP6+ ซึ่งจะได้ PCR product ขนาด 142 bp ดังแสดงในรูปที่ 2

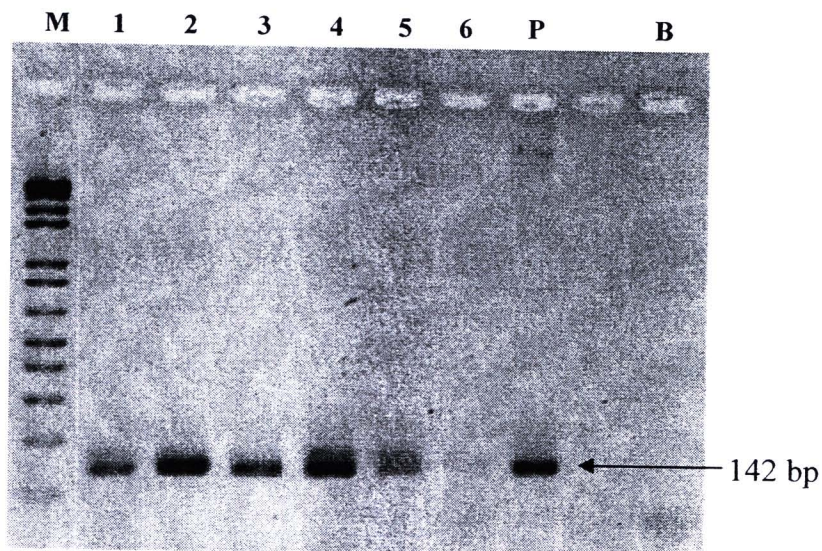
3. การตรวจ HPV genotype ในตัวอย่างตรวจ

เมื่อนำ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างตรวจที่ตรวจพบ HPV DNA ไปตรวจ genotype โดยวิธี reversed line blot hybridization (RLBH) ด้วย HPV-specific probes จำนวน 37 genotypes ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3



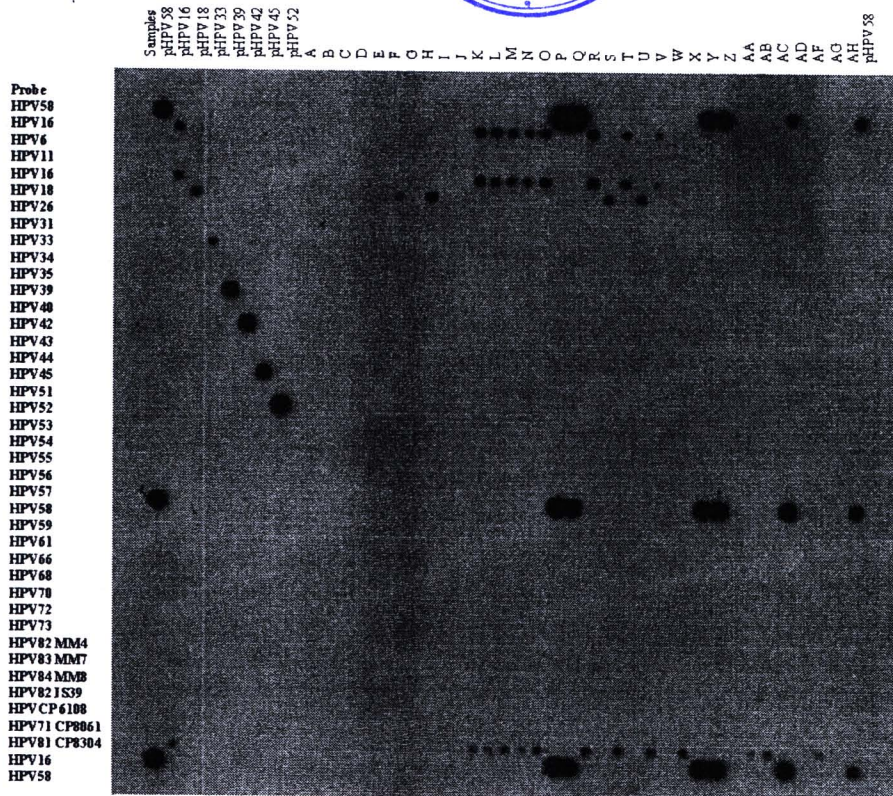
รูปที่ 1 PCR product ขนาด 268 bp ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ β -globin gene

Lane M; 1 Kb+ marker, Lane P; positive control, Lane B; blank, Lanes no.1-5 represent DNA samples positive for β -globin gene.



รูปที่ 2 PCR product ขนาด 142 bp ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ HPV L1 gene

Lane M; 1 Kb+ marker, Lane P; positive control, Lane B; blank, Lanes 1-6; HPV DNA positive samples.



รูปที่ 3 ผลการตรวจ HPV genotype โดยวิธี reversed line blot hybridization (RLBH) ด้วย HPV-specific probes จำนวน 37 genotypes

4. HPV genotype ที่พบในตัวอย่างก่อนและหลังการรักษา

ผลการตรวจ HPV DNA ในกลุ่มตัวอย่าง 60 รายหลังการรักษาพบว่าให้ผลบวก 10 ราย และชนิดของ HPV genotype เปรียบเทียบกับก่อนการรักษาแสดงในตารางที่ 2

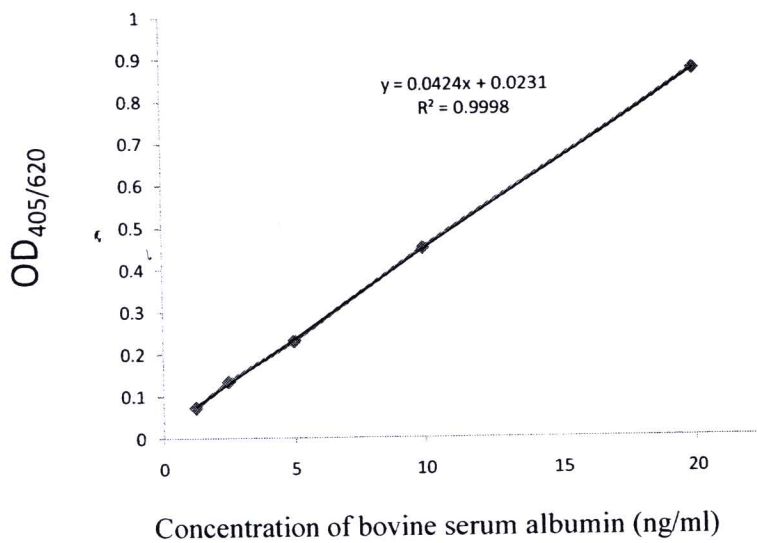
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 25 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247511
เลขเรียกหนังสือ

ตารางที่ 2 ผลการตรวจ HPV DNA และ HPV genotype ในตัวอย่าง 60 ราย ก่อนและหลังการรักษา

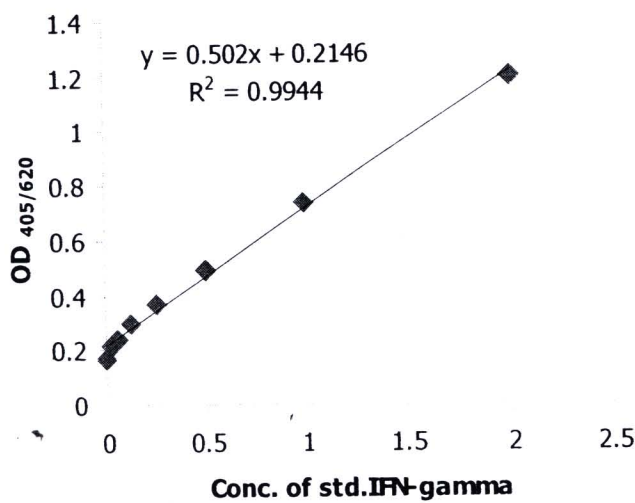
ผลการตรวจ	ก่อนการรักษา (n = 60)	หลังการรักษา (n = 60)
HPV DNA positive	60	10
HPV genotypes		
1. Single infection	35	9
- HPV 16	16	1
- HPV 18	3	2
- HPV 31	2	1
- HPV 42	1	-
- HPV 45	1	-
- HPV 52	4	-
- HPV 56	2	1
- HPV 58	1	2
- HPV 59	1	-
- HPV 66	1	-
- HPV 67	1	-
- HPV 70	1	-
- HPV JEB	1	1
- HPV 81	-	1
2. Double infections	19	-
- HPV 11, 16	7	-
- HPV 11, 18	-	-
- HPV 16, 18	7	-
- HPV 16, 33	1	-
- HPV 16, 35	1	-
- HPV 16, 45	1	-
- HPV 16, 52	-	-
- HPV 16, 56	-	-
- HPV 52, 81	1	-
- HPV 70, 83	1	-
3. Multiple infections	3	-
- HPV 11, 16, 18	3	
4. Unidentify	3	1

5. การตรวจวัดหาระดับ IFN-γ, IL-10 และ TNF-α โดยวิธี ELISA

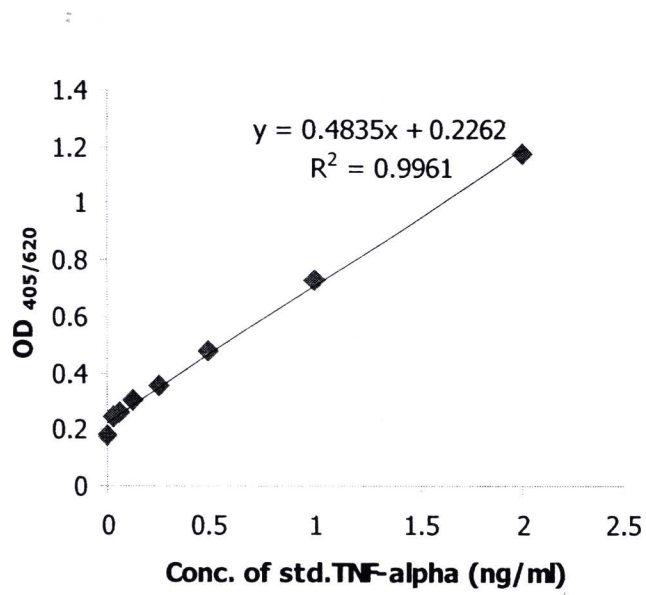
ตัวอย่างตรวจชนิด CVL ที่เก็บก่อนและหลังการรักษาของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 60 รายถูกตรวจหาปริมาณโปรตีนเพื่อปรับค่าการถูกเจือจางด้วย NSS ในแต่ละตัวอย่างตรวจ รูปที่ 4 แสดง standard curve ของการหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ BSA เป็นสารมาตรฐาน หลังจากนั้นจึงนำ CVL มาตรวจหาระดับ IFN-γ, IL-10 และ TNF-α โดยวิธี ELISA โดยหาค่าจาก standard curve ที่ทำควบคู่กันในแต่ละการทดลอง (รูปที่ 5-7)



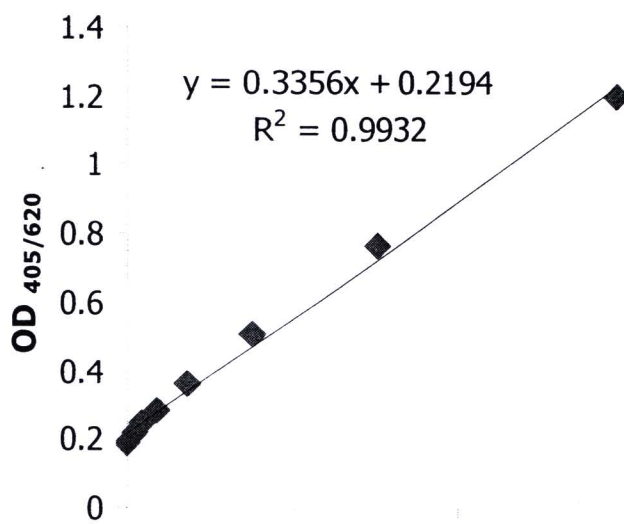
รูปที่ 4 Standard curve ของ bovine serum albumin



รูปที่ 5 Standard curve ของ IFN-γ cytokine



รูปที่ 6 Standard curve ของ TNF- α cytokine

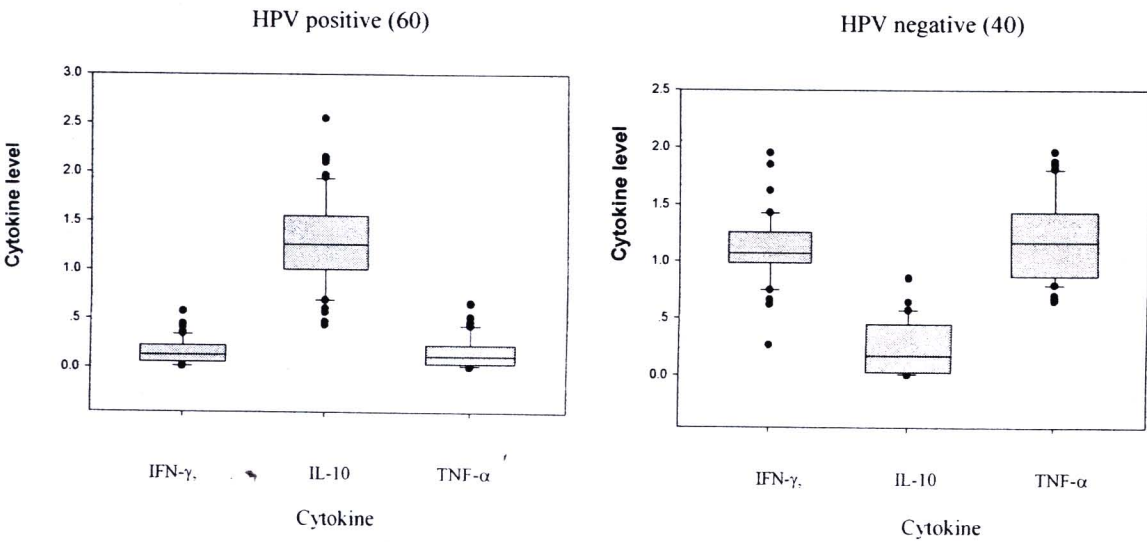


รูปที่ 7 Standard curve ของ IL-10 cytokine

ผลการตรวจหาระดับ cytokine ทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่าง 100 รายหลังการทำ Pap smear พบว่าค่า median level ของ IFN- γ และ TNF- α ในกลุ่ม HPV DNA negative สูงกว่ากลุ่ม HPV DNA positive อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ค่า median level ของ IL-10 ในกลุ่ม HPV DNA positive สูงกว่ากลุ่ม HPV DNA negative อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 8

ตารางที่ 3 ระดับ IFN- γ , IL-10 และ TNF- α ที่ตรวจโดยวิธี ELISA ในตัวอย่าง 100 ราย

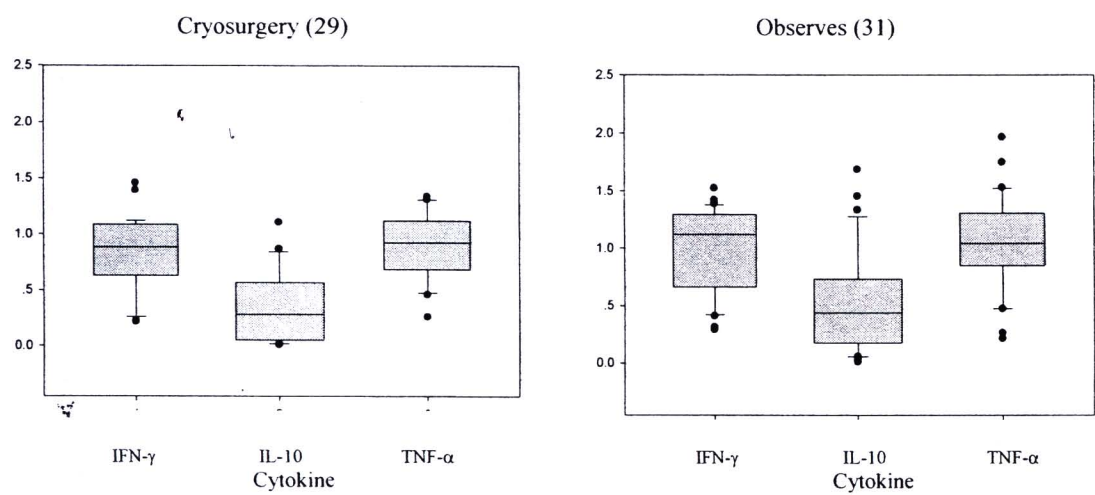
Cytikines	Median (range) (ng/ml)		P-value
	HPV positive (n = 60)	HPV negative (n = 40)	
IFN- γ	0.128 (0.003-0.568)	1.069 (0.262-1.946)	0.000
IL-10	1.259 (0.433-2.543)	0.174 (0.002-0.851)	0.000
TNF- α	0.116 (0.002-0.656)	1.165 (0.648-1.957)	0.000



รูปที่ 8 ระดับ IFN- γ , IL-10 และ TNF- α ในกลุ่ม HPV positive และ HPVnegative

6. การตรวจวัดหาระดับ IFN- γ , IL-10 และ TNF- α โดยวิธี ELISA หลังการรักษา

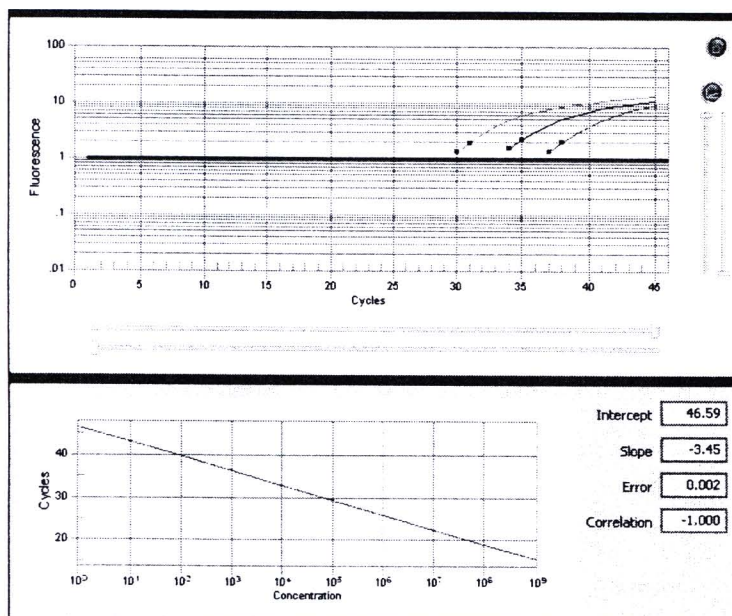
ตัวอย่างที่ให้ผล HPV DNA positive ถูกแบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการรักษา (cryosurgery group) จำนวน 29 ราย และกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (observe group) จำนวน 31 ราย เมื่อเปรียบเทียบระดับ cytokine ที่ตรวจพบในแต่ละกลุ่มแล้วพบว่าระดับ median level ของ TNF- α และ IL-10 ของทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับ median level ของ IFN- γ ในกลุ่ม observe สูงกว่ากลุ่ม cryosurgery อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.038$) ดังแสดงในรูปที่ 9



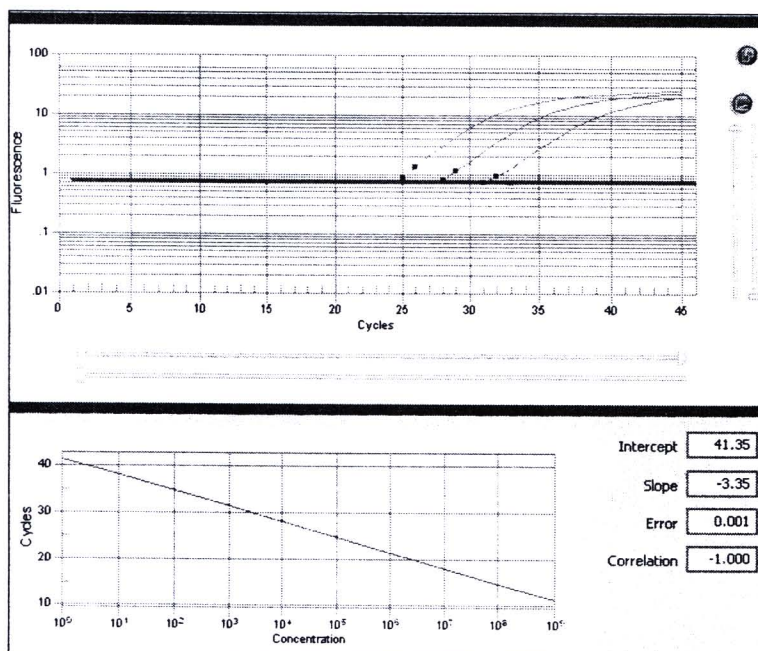
รูปที่ 9 ระดับ TNF- α , IL-10 และ IFN- γ โดยวิธี ELISA หลังการรักษา

7. Standard curve ของ IFN- γ gene, TNF- α , IL-10 และ internal control

ชิ้นเนื้อปากมดลูกจากกลุ่มตัวอย่างทั้งก่อนและหลังรักษาจะถูกตรวจวัดระดับการแสดงออกของจีนโดยวิธี quantitative real time PCR และสร้าง Standard curve ของจีน IFN- γ , TNF- α , IL-10 และ internal control ดังแสดงในรูปที่ 10-13

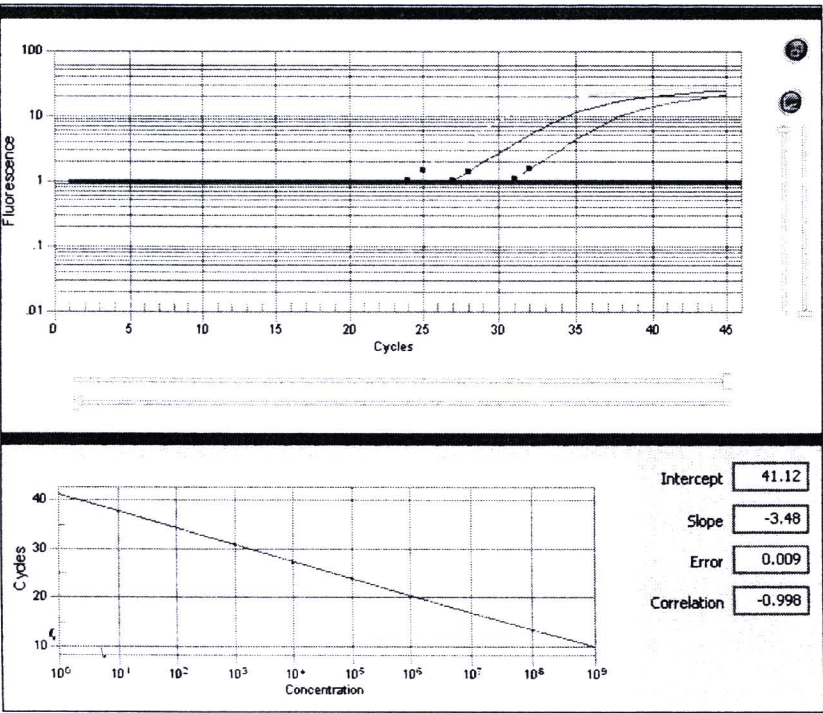


รูปที่ 10 Standard curve ของ IFN- γ gene.

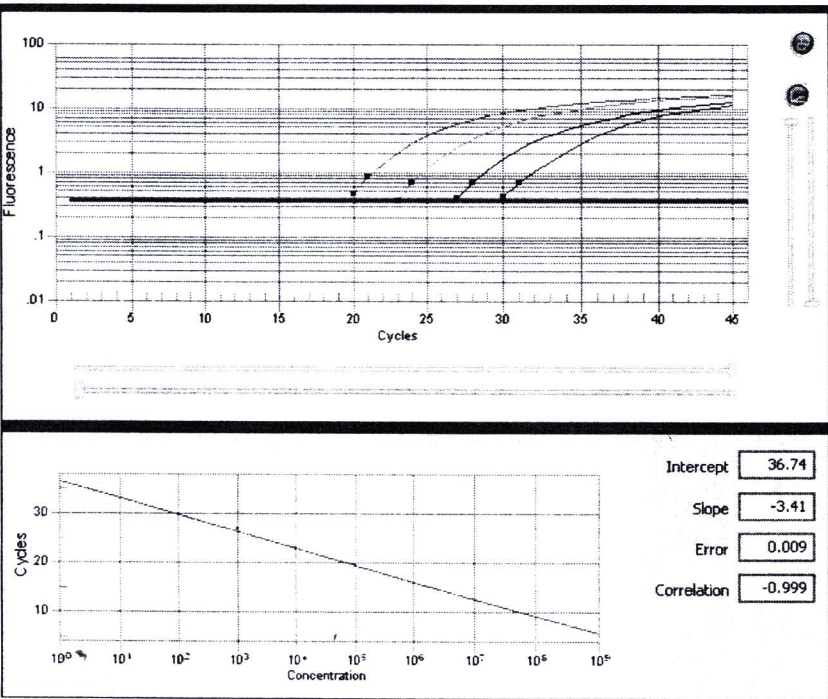


รูปที่ 11 Standard curve ของ TNF- α gene.





รูปที่ 12 Standard curve ของ IL-10 gene.



รูปที่ 13 Standard curve ของ β -actin gene(Internal control).

8. การตรวจวัดหาระดับการแสดงออกของจีน IFN- γ , IL-10 และ TNF- α โดยวิธี quantitative real time PCR

8.1 การตรวจวัดหาระดับการแสดงออกของจีน IFN- γ , IL-10 และ TNF- α ก่อนการรักษา

ผลการตรวจวัดการแสดงออกของจีน IFN- γ , TNF- α และ IL-10 โดยการตรวจวัดปริมาณ mRNA ของแต่ละจีน พบว่าในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติแบบ LSIL จำนวน 100 ราย มีการแสดงออกของ IFN- γ , TNF- α และ IL-10 mRNA ร้อยละ 93, 97 and 93 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การแสดงออกของจีน IFN- γ , TNF- α และ IL-10 ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติแบบ LSIL จำนวน 100 ราย

LSIL (100 samples)	Cytokine gene expression					
	IFN- γ		TNF- α		IL-10	
	Pos. (%)	Neg. (%)	Pos. (%)	Neg. (%)	Pos. (%)	Neg. (%)
HPV neg. (40)	34 (85%)	6 (15%)	39 (97.5%)	1 (2.5%)	36 (90%)	4 (10%)
HPV pos. (60)	59 (98.3%)	1 (1.7%)	58 (96.7%)	2 (3.3%)	57 (95%)	3(5%)
Total (100)	93 (93%)	7 (7%)	97 (97%)	3 (3%)	93 (93%)	7(7%)

นอกจากนี้พบว่าค่า Median level ของ IFN- γ , TNF- α ในกลุ่ม HPV DNA negative และกลุ่ม HPV DNA positive ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ Median level ของ IL-10 ในกลุ่ม HPV DNA positive สูงกว่ากลุ่ม HPV DNA negative อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.044$)

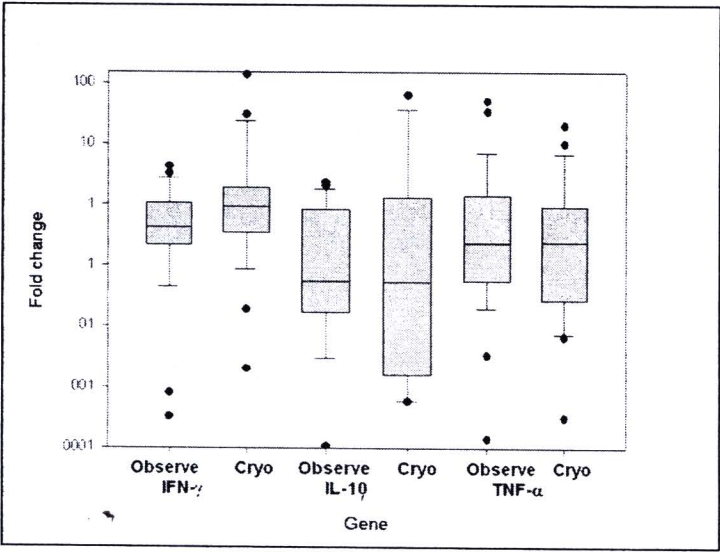
8.2 การตรวจวัดหาระดับการแสดงออกของจีน IFN- γ , IL-10 และ TNF- α หลังการรักษา

ตัวอย่างที่ให้ผล HPV DNA positive 60 รายถูกแบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการรักษา 29 ราย (cryosurgery treated group) และกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา 31 ราย (observe group) ผลการตรวจวัดการแสดงออกของจีน IFN- γ , TNF- α และ IL-10 ในเซลล์ปากมดลูกหลังการรักษาโดยการตรวจวัดปริมาณ mRNA ของแต่ละจีน พบว่าในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยวิธี cryosurgery มีการแสดงออกของจีน IFN- γ , TNF- α และ IL-10 ร้อยละ 89.7, 96.6 and 93.1 ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (Observes group) มีการแสดงออกของจีนร้อยละ 93.5, 96.8 and 93.5 ตามลำดับ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การแสดงออกของจีน IFN- γ , IL-10 และ TNF- α ในเซลล์ปากมดลูกของผู้หญิงจำนวน 29 ราย หลังการรักษาด้วยวิธี cryosurgery 6 เดือน เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา

LSIL with HPV positive (n = 60)	Gene expression					
	IFN- γ		TNF- α		IL-10	
	+	-	+	-	+	-
Cryosurgery (29)	26 (89.7)	3 (10)	28 (96.6)	1 (3.4)	27 (93.1)	2 (6.9)
Observes (31)	29 (93.5)	2 (6.5)	30 (96.8)	1 (3.2)	29 (93.5)	2 (6.5)
Total (60)	55 (91.7)	5 (8.3)	58 (96.7)	2 (3.3)	56 (93.4)	4 (6.6)

ผลการตรวจวัดการแสดงออกของจีน IFN- γ และ TNF- α พบว่าระดับ mRNA ของทั้งสองกลุ่มมีการการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และระดับของการแสดงออกของจีน IL-10 ของทั้งสองกลุ่มมีการแสดงออกลดลง นอกจากนี้พบว่า TNF- α mRNA ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นและ IL-10 mRNA ที่แสดงออกลดลงในทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ IFN- γ mRNA ที่แสดงออกเพิ่มขึ้นนั้น พบว่าในกลุ่มที่ได้รับการรักษา (cryosurgery group) มีแสดงออกของ IFN- γ mRNA เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (observe group) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 14



รูปที่14 ระดับ IFN- γ , IL-10 และ TNF- α mRNA ในกลุ่ม cryosurgery group และ observe group