วิจารณ์ผลการทดลอง

การเกิดโรคมะเร็งปากมดลูกในสตรี เป็นข้อสันนิษฐานที่ Zur Hausen (12) ตั้งขึ้นเมื่อปี 1977 หลังจากนั้นมีความพยายามศึกษาตรวจหาไวรัส HPV ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ ด้วยวิธีต่างๆ (5,59,61,62) เมื่อเทคโนโลยีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมจำนวนน้อยให้มีมากขึ้นที่เรียก PCR ซึ่งเสนอโดย Saiki, J. และคณะ ในปี 1985 (63) ทำให้การศึกษาเกี่ยวกับ HPV เป็นไปได้กว้างขวางมากขึ้น

ในการวิจัยนี้เป็นการตรวจหา HPV-DNA ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากกลุ่มสตรีที่ป่วยเป็นมะเร็งปากมดลูกเฉพาะในระยะลุกลาม จำนวนทั้งหมด 100 ราย โดยเนื้อเยื่อจะถูกเก็บรักษาในรูป paraffin-embedded tissue ก่อนนำมาสกัดแยก DNA และ ทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้วิธี PCR และตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนหรือ amplified product โดยใช้ oligonucleotide probe ชนิดตรวจจับทั่วไป (GP) และ จำเพาะต่อ type (TS) 5 type คือ HPV-6, 11, 16, 18, และ 33

การเพิ่มขยายจำนวน DNA จำเพาะต่อ HPV โดยวิธี PCR ในงานนี้เลือกใช้ primer ที่ทำการเพิ่มขยายยีน บริเวณ L1 region ซึ่งเป็นช่วงที่มีคุณสมบัติของการเรียงลำดับเบสคงที่ (25) L1 region นี้มีความสำคัญเพราะเป็นยีนต้นแบบสำหรับการสร้างแคพสิดโปรตีนของไวรัส (81) และเนื่องจาก L1 region ไม่มีความสำคัญใดๆ กับการกลายเป็นมะเร็งของเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 1) ทำให้ยีนส่วนนี้ไม่ถูกตัด (deletion) หรือสอดแทรก (insertion) ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นมะเร็งของเซลล์เนื้อเยื่อ (82) แม้ว่าจะมีรายงานพบว่า ยีนส่วนนี้จะหายไปในกรณีที่เป็น vulvar carcinoma (83) L1 primers ที่สังเคราะห์ขึ้น และใช้ในการวิจัยนี้ มีรายงานการทดสอบแล้วแสดงพบว่า เป็นช่วงที่เหมาะสมสามารถเพิ่มขยาย HPV-DNA ได้เป็นจำนวนมากถึง 25 types (76) แต่ในการประชุมวิชาการที่ประเทศ Finland ปี 1993 Syjanen, S. และคณะ (84) รายงานว่า L1 primers ชุดนี้ครอบคลุมเพียง 7 types เท่านั้นคือ HPV-1, 6, 11, 16, 18, 31, และ 33

แม้ว่าจะมีการศึกษาพบว่า E6 region โดยเฉพาะ HPV-16 และ 18 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นเซลล์มะเร็ง การตรวจหาการสอดแทรกของ E6 จึงน่าจะมีความหมายมากขึ้น แต่เนื่องจากการศึกษาการเรียงตัวของลำดับเบสในช่วง E6 region พบว่ามีความแตกต่างกันมากในแต่ละ type (25) ดังนั้นในการศึกษาจึงต้องใช้ E6 primer จำเพาะแต่ละ type ทำให้มีความยุ่งยากมากกว่าการใช้ L1 primers นอกจากนี้มีรายงานเปรียบเทียบการตรวจหา HPV-DNA โดยใช้ E6 primer และ L1 primers พบว่ามีความไวในการตรวจหาไม่แตกต่างกัน (69)

ในการทดสอบสภาวะการทำงานของวิธี PCR กับ purified plasmid HPV-DNA ทั้ง 5 types คือ HPV-6, 11, 16, 18, และ 33 แสดงให้เห็นว่า L1 primers ชุดนี้ในสภาวะที่กำหนด มีความสามารถในการเพิ่มจำนวน HPV-DNA ใน 4 types ได้เท่ากัน ยกเว้น HPV-11 ต้องใช้ปริมาณ DNA ตั้งต้นสูงคือ อย่างน้อย 1 ng (รูปที่ 9,10) อธิบายว่า HPV-11 อาจมีความแตกต่างของลำดับเบส ในการจับเกาะกับ L1 primers มากกว่า type อื่นๆ ความไวของระบบ PCR ในการทดลองนี้คือ 1 copy/cell เมื่อทดสอบกับ purified plasmid HPV-16 แต่เมื่อทดสอบความไวกับ HeLa DNA พบว่าสามารถตรวจได้ที่ความไวอย่างน้อย 20-50 copies

ตัวอย่างส่งตรวจที่นำมาสกัด DNA และทำการเพิ่มจำนวนโดย PCR ดังรายละเอียดในบทที่ 3 วัสดุและวิธีการนั้น ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า ถ้าปริมาตรตัวอย่างที่สกัดได้มากกว่า 1 ul จะไม่สามารถทำการเพิ่มจำนวนได้ (รูปที่ 13) ซึ่งพิสูจน์ได้ว่า ในตัวอย่างที่ปริมาตรมากดังกล่าว (3, 5, 10 ul) มี inhibitor ขัดขวางขบวนการทำ PCR เพราะเมื่อเติม HPV-DNA บริสุทธิ์ลงไปทุกหลอดก็ยังไม่สามารถทำการเพิ่มขยายและตรวจพบได้ ซึ่งต่างจากหลอดควบคุม (รูป 13) เฉพาะที่ปริมาตร 1 ul เท่านั้นที่สามารถทำการเพิ่มขยาย DNA ได้ จึงใช้ 1 ul ตลอดการทดลอง

Inhibitors ที่พบนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ ผ่านขบวนการ fix ด้วย 10% formalin แล้วฝังลงใน paraffin ซึ่งในขบวนการสกัด DNA จะต้องทำการแยก paraffin จากเนื้อเยื่อโดยใช้ xylene หลายขั้นตอน เป็นไปได้ว่า

ตัวอย่างสกัดที่ได้ยังคงมีสารตกค้าง ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มขยาย หรือ การทำงานของเอ็นไซม์ Taq polymerase ในขบวนการ PCR (85,86)

ผลการเพิ่มขยายโดยวิธี PCR และตรวจสอบ amplified product ด้วย GE พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก 63% (ตารางที่ 6) Morison และคณะ (78) รายงานว่า การทำ hybridization PCR product จะมีความไวสูงกว่าการตรวจโดย GE 100 เท่า ดังนั้นเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจหา HPV-DNA จึงทำการตรวจ amplified product โดยใช้วิธี DH แต่ใช้สารปลอดกัมมันตภาพรังสีชนิด chemiluminescense แทนสารกัมมันตภาพรังสี ชุดน้ำยาสำเร็จรูป ECL ที่นำมาใช้นี้มีรายงานให้ผลดีมากกับการตรวจสอบทำ typing ของ HLA (77) ผลการตรวจสอบความไวของวิธี DH พบว่ามีความไวมากกว่าวิธี GE อย่างน้อย 10 เท่า (รูปที่ 11,12,16 และ 17) เนื่องจากการตรวจสอบใช้สารปลอดกัมมันตภาพรังสีผลที่ได้จึงมีความไวต่ำกว่าการใช้สารกัมมันตภาพรังสีโดยประมาณ 10 เท่า

เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ GP และวิธี DH ผลปรากฏว่า ตัวอย่างที่ให้ผลบวกมี 82 ตัวอย่างคิดเป็น 82% และ 18 ตัวอย่าง หรือ 18% จากตัวอย่างทั้งหมดให้ผลลบคือไม่สามารถตรวจพบ HPV-DNA แม้ผ่านขบวนการ PCR และ DH อย่างไรก็ตามผลนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า 18 ตัวอย่างนี้ไม่มี HPV-DNA เพราะ L1 primers ที่ใช้ไม่สามารถเพิ่มจำนวน HPV ทุกๆ type ได้ (76) ซึ่งปัจจุบันมีประมาณ 65 types (10) และเมื่อปี 1991 Tawheed, A.R. และคณะ ได้ค้นพบ HPV-66 เพิ่มขึ้นอีก (87) มีรายงานในต่างประเทศหลายรายงานที่ทำการตรวจหา HPV-DNA ในเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลามโดยใช้ L1 primers ชุดเดียวกับที่การทดลองนี้ ตรวจพบ 69% (40,69)

ได้ทำการทดสอบตรวจหา HPV-DNA จากตัวอย่างสกัดโดยตรงที่ไม่ผ่านขบวนการ PCR โดยใช้วิธี DH และตรวจจับด้วย GP ผลการตรวจสอบพบเพียง 5 ตัวอย่างคิดเป็น (5/82) 6% แม้จะเพิ่มปริมาณ DNA ในการตรวจสอบถึง 10 ug ผลการตรวจนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจ DH โดยใช้ตัวอย่างสกัดโดยตรงมีความไวต่ำมากซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hamlam, N และคณะ (88) ที่ตรวจพบเพียง 7% โดยวิธี DH แต่ใน

ทางกลับกัน ตรวจโดยใช้ PCR และ GE ได้ 53%

ทำการตรวจแยก type ของ HPV จาก amplified PCR product โดยใช้ TS ตรวจจับโดยวิธี DH ตรวจพบ HPV-16 มากที่สุดคือ 35 ตัวอย่างคิดเป็น 42.7% รองลงมาคือ HPV-18 จำนวน 17 ตัวอย่างคิดเป็น 20.7% โดยพบว่ามี 5 ตัวอย่าง (6.1%) เป็นการติดเชื้อร่วมคือ ตรวจพบทั้ง HPV-16 และ 18 อีก 3 ตัวอย่าง (3.6%) เป็น type 33 และไม่สามารถตรวจพบ type 6 และ 11 เลย (ตารางที่ 6) ผลการทดลองนี้สนับสนุนรายงานของต่างประเทศ ซึ่งพบ HPV-16 มากที่สุด (35-65%) และรองลงมาคือ HPV-18 (25%) (89) ส่วน HPV-6,-11 มีรายงานสนับสนุนการตรวจไม่พบในมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม แต่จะพบในเนื้อเยื่อระยะก่อนเป็นมะเร็ง (precancerous stage) เป็นส่วนใหญ่ (69,90,91) ปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายเหตุผลความเกี่ยวข้องของ HPV-6 และ -11 ในระยะก่อนเป็นมะเร็งและ หายไปในระหว่างการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง (90,92,93) อย่างไรก็ตาม ในเนื้อเยื่อระยะก่อนเป็นมะเร็งก็สามารถตรวจพบ HPV-16 และ -18 ได้โดยประมาณร้อยละ 20 (94) มีรายงานการศึกษาการติดเชื้อ HPV ชนิดต่างๆในสตรีปกติในประเทศไทย สามารถการติดเชื้อร้อยละ 18.8 โดยจำแนกตาม type-6, -16, -18, และ -33 ได้เป็นร้อยละ 3.5, 89.5, 15.3, และ 1.7 ตามลำดับ (95) สำหรับในต่างประเทศ มีรายงานการตรวจพบเชื้อ HPV ในสตรีปกติคิดเป็นร้อยละ 46 โดยจำแนกตาม type-6 และ -11, 16, 18, และ -33 ได้เป็นร้อยละ 7.5, 18.7, 11.26, และ 5.6 ตามลำดับ (72) ดังนั้นบทบาทของ HPV-type จึงต้องทำการศึกษาค้นคว้าในรายละเอียดต่อไป

จากทั้งหมดมี 19 ตัวอย่างที่ตรวจพบโดยวิธี DH ซึ่งสามารถระบุ type ได้ 8 ตัวอย่าง อีก 11 ตัวอย่างไม่สามารถตรวจได้โดย GE และยืนยันโดยการ typing ด้วย TS เพื่อพิสูจน์ว่า 11 ตัวอย่างนี้มี HPV-DNA อยู่จริง จึงทำการตรวจยืนยัน amplified product โดยวิธี Southern hybridization (รูปที่ 21) ผลการตรวจพบแถบบริเวณตำแหน่ง 450 bp. โดยวิธี hybridization แต่ไม่สามารถอ่านผลโดย GE ยืนยันข้อความที่ว่า วิธีการตรวจ amplified product โดยวิธี hybridization มีความไวกว่า GE ดังนั้นทั้ง 11 ตัวอย่างจึงเป็นผลบวกจริง

ผลการวิจัยนี้แสดงถึงความชุกของการติดเชื้อ HPV ในสตรีที่เป็นมะเร็งปากลูกระยะลุกลาม และชี้ถึงความสัมพันธ์ของ HPV type ในกลุ่ม high risk group ได้แก่ 16, 18, และ 33 เป็นต้น กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลแรกในประเทศไทยที่ทำการตรวจสอบโดยใช้ PCR และ typing ด้วย TS โดยวิธี DH แม้จะได้ผลที่แสดงความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างสูง (82%) และสนับสนุนการคงอยู่ของ L1 region แต่ปัจจุบันก็ยังไม่มีรายงานใดที่ยืนยันชัดเจนว่า HPV เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากยังมีตัวอย่างประมาณ 15% (ในการทดลองนี้พบ 18%) ที่ไม่สามารถตรวจพบ HPV-DNA (88) ถ้า p53 tumor suppressor genes เป็นเป้าหมายของการเปลี่ยนแปลงเซลล์ที่เกิดจาก HPV [บทที่ 2 การสำรวจเอกสาร: บทบาทของ HPV กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก] ดังนั้นในตัวอย่างเหล่านี้น่าจะมีความผิดปกติของยีน p53 Werness และคณะ จึงทำการศึกษาในรายละเอียดตัวอย่างเหล่านี้พบว่า มีความผิดปกติที่ p53 protein โดยมี mutation ที่ยีน p53 จริง (47) บทบาทหรือกลไกการเกิดมะเร็งโดย HPV ยังไม่แน่นอน แต่เข้าใจว่า การติดเชื้อ HPV น่าจะเป็นปัจจัยร่วมที่สำคัญอย่างหนึ่งในการกระตุ้น ทำให้มีการเริ่มเปลี่ยนแปลงของเซลล์ นอกจากนี้ ปัจจัยร่วมอื่นๆได้แก่ การสูบบุหรี่ การมีคู่เพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุน้อย การมีเพศสัมพันธ์มากกว่า 1 คน, การกินยาคุมกำเนิด, การเป็น genital herpes เหล่านี้เป็นต้น (96,97) ก็อาจมีส่วนในการทำให้เซลล์กลายเป็นมะเร็งได้ ซึ่งมีผู้พยายามศึกษา และหาความสัมพันธ์เหล่านี้อยู่

การศึกษาการติดเชื้อของ HPV type ต่างๆในสตรีปกติ และสตรีที่มีพบความผิดปกติของเซลล์ เช่น ระยะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง ระยะก่อนเป็นมะเร็งระยะลุกลาม และระยะมะเร็งลุกลามจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในด้านระบาดวิทยาและอาจใช้เป็นข้อมูลศึกษาการพัฒนาการเกิดโรคมะเร็งในระยะต่างๆได้ ที่สำคัญอาจนำไปสู่การคัดเลือกสายพันธุ์ในการทำวัคซีนในอนาคต