

การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอนเอ ของอินเตอร์เฟอรอน อัลฟา ในรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิกวิมอดคริม
เทียบกับยาหลอกในการรักษาหูดผิวหนัง โดยมีกลุ่มควบคุมแบบสุ่ม



นางสาว รัชต์ธร หมอนจันทร์

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุศาสตร์ ภาควิชาอายุศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mRNA EXPRESSION OF INTERFERON ALPHA IN COMMON WARTS TREATED WITH
TOPICAL 5% IMIQUIMOD CREAM, A RANDOMIZED, PLACEBO-CONTROLLED,
DOUBLE-BLIND STUDY



Miss Ratchathorn Mornchan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic year 2006

Copyright of Chulalongkorn University


หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของอินเตอร์เฟอรอน อัลฟา ในรอยโรคที่ใช้
ยา 5% อิมิดควิมอดครีม เทียบกับยาหลอกในการรักษาหูดผิวหนัง โดยมี
กลุ่มควบคุมแบบสุ่ม

โดย นางสาว รัชต์ธร หมอนจันทร์

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิวัฒน์ ก่อกิจ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาดมหลักสูตรปริญญาโท

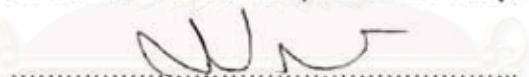

.....
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณบดีคณะแพทยศาสตร์

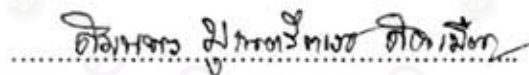
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิชัย จิตะพันธ์กุล)

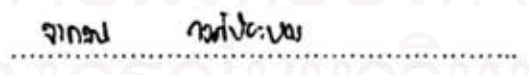
ประธานกรรมการ


.....
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิวัฒน์ ก่อกิจ)

อาจารย์ที่ปรึกษา


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สมนพร บุญชะรัตเวช สองเมือง)

กรรมการ


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. จงกลณี วงศ์ปิยะบวร)

กรรมการ

4874775830 : MAJOR MEDICINE (DERMATOLOGY)

KEY WORDS : IMIQUIMOD, COMMON WARTS, INTERFERON ALPHA, REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

RATCHATHORN MORNCHAN : mRNA EXPRESSION OF INTERFERON ALPHA IN COMMON WARTS TREATED WITH TOPICAL 5% IMIQUIMOD CREAM, A RANDOMIZED, PLACEBO-CONTROLLED, DOUBLE-BLIND STUDY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIWAT KORKIJ. M.D. 214 pp.

Background : Imiquimod 5% cream, an immune response modifier, has been approved for the topical treatment of external genital warts and clinical studies suggest activity against common warts as well. The effectiveness of imiquimod in treating this disease is thought to be mediated by activation of components of the innate immune response through the production of cytokines, mainly interferon alpha, potentiating the cellular arm of acquired immune response. The exact underlying mechanisms are not fully understood.

Objective : To study mRNA levels of interferon alpha in common warts treated with topical 5% imiquimod cream in comparison with placebo under occlusion combined with 20% salicylic acid

Methods : Nineteen patients with common warts were recruited into this study. In each patient, at least two identical lesions were selected for treatment. Each identical wart was randomized to receive five weekly application of either 5% imiquimod cream or placebo cream under occlusion combined with 20% salicylic acid. Shave biopsies were taken from lesions at pre-study and 4th weeks after treatment. Real-time Polymerase chain reaction (PCR) for messenger (m)RNAs were used to identify cytokines, interferon (IFN)- α in these biopsies.

Results: Treatment with imiquimod, stimulated significant increases in mRNA expression for interferon (IFN)- α ($P=0.0265$) compared with placebo. Clinically, the upregulated expression of a pro-inflammatory cytokine, interferon (IFN)- α , correlated with local inflammation such as erythema induced by imiquimod and 20% salicylic acid.

Conclusion : For common warts, increased expression of mRNA for interferon (IFN)- α has been shown to be induced by imiquimod and believed to be a major mediator of its antiviral activity.

Department.....Medicine.....

Student's signature.....*Ratchathorn Mornchan*.....

Field of study.....Medicine.....

Advisor's signature.....*Wiwat Korkij*.....

Academic year.....2006.....

รัศม์ธร หมอนจันทร์ : การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของอินเทอร์เฟอรอน อัลฟา ในรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิกวิมอดครีม เทียบกับยาหลอกในการรักษาหูดผิวหนัง โดยมีกลุ่มควบคุมแบบสุ่ม (mRNA EXPRESSION OF INTERFERON ALPHA IN COMMON WARTS TREATED WITH TOPICAL 5% IMIQUIMOD CREAM, A RANDOMIZED, PLACEBO-CONTROLLED, DOUBLE-BLIND STUDY) อ. ที่ปรึกษา : รศ. นพ. วิวัฒน์ ก่อกิจ. 214 หน้า.

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย : หูดเป็น โรคผิวหนังที่พบบ่อย เกิดจากการติดเชื้อฮิวแมน แพปิลโลมา ไวรัส การรักษาหูดมีหลายวิธี ปัจจุบันยังไม่มียูวิธีมาตรฐาน ยา 5% อิมิกวิมอดครีมเป็นยาตัวใหม่ในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ต่อต้านไวรัสผ่านทางไซโตไคน์ โดยเฉพาะอินเทอร์เฟอรอน อัลฟา ยามีข้อบ่งใช้ในการรักษาหูดที่อวัยวะเพศ และมีหลายงานวิจัยแสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีต่อหูดบริเวณผิวหนังด้วย จนถึงปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของยาระดับโมเลกุลในแน่ชัด

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอ ของอินเทอร์เฟอรอน อัลฟา (IFN α) ในรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิกวิมอดครีม เทียบกับยาหลอกในการรักษาหูดผิวหนัง โดยใช้ร่วมกับ 20% ซาลิไซลิก แอซิด และ แผ่นปิด

วิธีการศึกษา : ทำการศึกษาในผู้ป่วยจำนวน 19 คน ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นหูดผิวหนังชนิดธรรมดา มีลักษณะ และขนาดใกล้เคียงกันมาทำการทดลองเปรียบเทียบ ด้านหนึ่งทายา 5% อิมิกวิมอดครีม อีกด้านหนึ่งทายาหลอก ตามด้วยแผ่นปิดทั้ง 2 บริเวณ ทายา 5 ครั้ง ต่อสัปดาห์ ทำการตัดชิ้นเนื้อที่หูดทั้ง 2 ตำแหน่งก่อน และ 4 สัปดาห์หลังจากทายา นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ เอ็มอาร์เอ็นเอ สัมพัทธ์ของอินเทอร์เฟอรอน อัลฟา ด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกโซ่ไทม์เรียลไทม์แบบบอกรปริมาณ (Real-time-PCR)

ผลการศึกษา : การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio change from baseline) ของระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ ของอินเทอร์เฟอรอน อัลฟา (IFN α) ในรอยโรคหูดผิวหนังที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม มีค่าสูงกว่าที่ได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.0265$) โดยพบว่าในรอยโรคกลุ่มที่มีระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของอินเทอร์เฟอรอน อัลฟา เพิ่มขึ้นหลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีม จะมีรอยโรคที่มีความแดงจำนวนมากกว่า กลุ่มที่ระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของอินเทอร์เฟอรอน อัลฟา ไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.048$)

สรุปผล : จากการศึกษาบ่งชี้ว่ายา 5% อิมิกวิมอดครีมมีผลกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของระดับระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ ของอินเทอร์เฟอรอน อัลฟา ในรอยโรคหูด ซึ่งเชื่อว่าเป็นไซโตไคน์หลักในการทำงานต่อต้านไวรัสของยานี้

ภาควิชาอายุรศาสตร์.....
สาขาวิชา..... ออายุรศาสตร์.....
ปีการศึกษา..... 2549.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์นายแพทย์ วัฒน ์ ก่อกิจ อาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดร.จกกลณี วงศ์ปิยะบวร และศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ และ ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุดารัตน์ อภิราชกมล และคุณวสันต์ ปัญญาแสง ที่ได้ให้คำแนะนำในการใช้สถิติในการคำนวณขนาดตัวอย่าง และการวิเคราะห์ และแปลผลข้อมูลแก่ผู้วิจัยเรื่อง นี้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่และพยาบาลแผนกผู้ป่วยนอก โรคผิวหนัง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในการช่วยคัดกรองผู้ป่วยที่มาทำการรักษา รวมทั้งพยาบาลแผนกผู้ป่วยนอก โรคผิวหนังที่ได้ช่วย ผู้วิจัยในการจ่ายยา การตัดและเก็บชิ้นเนื้อ และให้คำอธิบายแก่ผู้ป่วยใน โครงการวิจัยนี้ทุกท่าน

ขอขอบคุณ คุณพรหมทิพา พรตเจริญ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการหน่วยภูมิคุ้มกันที่ได้กรุณา ให้คำแนะนำในการเลือกใช้เครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัย เมื่อเข้ามาใช้เครื่องมือมาโดยตลอด

ขอขอบคุณบริษัท 3 เอ็ม ประเทศไทยจำกัด และคุณสุภาพรรณ มาพะสกุลเจริญเจ้าหน้าที่ บริษัทที่ช่วยสนับสนุนยา อุปกรณ์ในการวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนแพทย์ทุกท่านที่ได้กรุณาส่ง และคัดเลือกผู้ป่วยมาเข้าการศึกษานี้ และ ขอขอบคุณผู้ป่วยทุกท่านที่ได้ร่วมมือเป็นอย่างดีในงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ซึ่งให้การสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา จนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ฌ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2. คำถามการวิจัย.....	4
1.3. วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
1.4. สมมุติฐานการวิจัย.....	5
1.5. กรอบความคิดในการวิจัย.....	5
1.6. ขีดกลางเบื้องต้น.....	5
1.7. คำสำคัญ.....	6
1.8. การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการ.....	6
1.9. ปัญหาทางจริยธรรม.....	7
1.10. ข้อจำกัดในการวิจัย.....	7
1.10 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
1.11 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข.....	8
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
2.1. ทบทวนวรรณกรรม.....	9
3. โรคหูด.....	19
3.1 ระบาดวิทยา.....	19
3.2 สาเหตุ.....	21
3.3 กลไกการเกิดโรค.....	26
3.4 ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อหูด.....	28

	หน้า
3. 4.1. ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อหูดเฉพาะที่.....	30
3. 4.2. การหายเองของหูด.....	31
3.5. ลักษณะอาการที่ปรากฏ.....	34
3.6. ความสัมพันธ์ของเชื้อ HPV กับการเกิดมะเร็ง.....	41
3.7. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของหูด (histopathology)	42
3.8. การรักษา.....	45
4. ยา 5% อิมิกวิมอด กรีม	52
4.1. การจัดกลุ่มยา.....	52
4.2. การศึกษาทางเภสัชวิทยาด้านระบบภูมิคุ้มกัน	53
4.2.1. ผลของยาต่อระบบภูมิคุ้มกันทาง innate immunity	53
4.2.2. ผลของยาต่อระบบภูมิคุ้มกันทาง acquired immunity	54
4.2. ผลของยาต่อระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ	55
4.3. เภสัชพลศาสตร์.....	57
4.3.1. ฤทธิ์การต่อต้านไวรัส	57
4.3.2. ฤทธิ์การต่อต้านเนื้องอก	58
4.4. เภสัชจลนศาสตร์.....	59
4.5. กลไกการออกฤทธิ์ของยา	60
4.6. การเป็นพิษของยา	62
4.7. ข้อบ่งชี้ในการใช้ยา.....	63
4.8. ข้อห้ามใช้.....	65
4.9. ผลข้างเคียงจากการใช้ยา.....	66
4.10. ฤทธิ์ยากับยาอื่น	66
4.11. ขนาดบรรจุยา.....	66
4.12. การเก็บรักษา.....	66
5. ฤทธิ์ยาถูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ	67
5.1. ฤทธิ์ยาถูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR)	67
5.2. องค์ประกอบของวิธีPCR.....	67
หลักการออกแบบ Primers.....	69
5.4. ขั้นตอนของPCRและวงรอบปฏิกิริยา	70
5.5. การป้องกันการปนเปื้อนใน PCR.....	75

	หน้า
5.6. การจัดแบ่งห้องสำหรับทำ PCR.....	76
5.7. การแยกอาร์เอ็นเอ	77
5.8. การสร้าง Complementary DNA.....	80
5.9. เอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอ (Reverse transcriptase; RT)	81
5.10.ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกรีมาณ (Real Time PCR)	81
5.11.ประวัติความเป็นมาของ Real time PCR.....	81
5.12.เครื่องมือที่ใช้ทำ Real time PCR.....	82
5.13.ข้อจำกัดของ PCR แบบดั้งเดิม	86
5.14.หลักการของ Real time PCR	87
5.15.SYBR Green.....	87
5.16.Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)	90
5.17.Hybridization probe.....	91
5.18.Hydrolysis หรือ Tagman probe.....	92
5.19.Molecular Beacons.....	94
5.20.Scorpions.....	95
5.21.การแปรผล	100
5.22.การประยุกต์ใช้ Real time PCR.....	104
6. วิธีดำเนินการวิจัย	105
6.1. ประชากรศึกษาและตัวอย่าง.....	105
6.2 การคำนวณขนาดตัวอย่าง	105
6.3 กฎเกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา	106
6.4 กฎเกณฑ์การตัดออกจากการศึกษา.....	106
6.5 เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง (Sampling technique)	107
6.6 รูปแบบการวิจัย.....	108
6.7 วิธีดำเนินการวิจัย	108
6.8 การเก็บรวบรวมข้อมูล	119
6.9 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	119
7. รายงานผลการวิจัย	121
7.1. คุณลักษณะของประชากร	121
7.2. ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ Real time PCR.....	122

	หน้า
7.3 การประเมินผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมิน)	152
7.4 การประเมินผลข้างเคียงจากการใช้ยา (แพทย์ประเมิน).....	155
7.5. สรุปผลการวิจัยโดยรวม.....	157
8. อภิปรายผลการวิจัย	159
9. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	167
รายการอ้างอิง.....	170
ภาคผนวก.....	183
ภาคผนวก ก. แบบฟอร์มบันทึกข้อมูล	184
ภาคผนวก ข. แบบฟอร์มใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย.....	194
ภาคผนวก ค. รูปภาพการเปลี่ยนแปลงของรอยโรค	198
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	214

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางลำดับที่	หน้า
1. แสดงการเปรียบเทียบวิธีการและผลการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของยา 5% อิมิกวิมอดครีม ในการรักษาหูดชนิด common warts บทคัดย่อภาษาไทย.....	14
2. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ HPV กับอาการแสดงทางคลินิก.....	24
๓ แสดงชนิดของซัยโตไคน์ที่กระตุ้นด้วยยาอิมิกวิมอด.....	54
4. แสดงผลของยาอิมิกวิมอดต่อเซลล์ต่างๆในผิวหนัง.....	57
5. แสดงจำนวนและร้อยละของประชากรเกี่ยวกับปัจจัยส่วนบุคคลและข้อมูลทั่วไป.....	122
6. แสดงความหนาของหูดก่อนการรักษาเปรียบเทียบระหว่างรอยโรคสองตำแหน่ง.....	125
7. แสดงตำแหน่งหูดที่ได้รับยา5% อิมิกวิมอดเทียบกับยาหลอกในผู้ป่วยแต่ละราย.....	127
8. แสดงค่า mRNA สัมพัทธ์ของ IFN- α (เทียบกับ18S) ในรอยโรคหูดทั้ง 2 ตำแหน่ง ก่อนและหลังการรักษาในผู้ป่วยแต่ละราย.....	130
9. แสดงค่าเฉลี่ย mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดทั้ง 2 ตำแหน่ง ก่อนและหลังการรักษา....	135
10. แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของ mRNA ของ IFN α ในผู้ป่วยแต่ละราย.....	138
11. แสดงลักษณะค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN α ในรอยโรคหูดทั้ง 2 ตำแหน่ง.....	139
12. แสดงสัดส่วนของผู้ป่วยที่มีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของระดับ mRNA ของ IFN α เพิ่มขึ้นหรือลดลง ในรอยโรคหูดผิวหนังที่ได้รับยาทั้ง 2 ชนิด.....	141
1๓ แสดงสัดส่วนจำนวนของผู้ป่วยที่มีความแดงของหูดหลังการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดครีม และมีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของระดับ mRNA ของ IFN α เพิ่มขึ้น หรือลดลง..	148
14. แสดงสัดส่วนจำนวนของผู้ป่วยที่มีความแดงของหูดหลังการรักษาด้วยยาหลอก และมีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของระดับ mRNA ของ IFN α เพิ่มขึ้น หรือลดลง.....	149
15. แสดงสัดส่วนและค่าเฉลี่ยของปัจจัยต่างๆ เปรียบเทียบในกลุ่มที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้น หรือไม่เพิ่มขึ้นหลังการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดครีม.....	150
16. แสดงสัดส่วนและค่าเฉลี่ยของปัจจัยต่างๆ เปรียบเทียบในกลุ่มที่มี ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้น หรือไม่เพิ่มขึ้นหลังการรักษาด้วยยาหลอก.....	151
17. แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยาโดยผู้ป่วยประเมิน.....	152
18. แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยาโดยแพทย์ประเมิน.....	155

ตารางลำดับที่	หน้า
19. แสดงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นเป็นร้อยละในแต่ละสัปดาห์.....	169



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิลำดับที่	หน้า
แผนผังที่ 1 แสดงผลของยาอิมิกวิมอดต่อเซลล์ต่างๆในระบบภูมิคุ้มกัน.....	56
แผนภูมิที่ 1 กราฟแสดง Amplification curves.....	101
แผนภูมิที่ 2 กราฟแสดงความเข้มแสงที่เปลี่ยนไปใน PCR แต่ละรอบ.....	101
แผนภูมิที่ Standard curve	102
แผนภูมิที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $-d(F2/F1)/dT$ กับอุณหภูมิ ($^{\circ}C$).....	
แผนภูมิที่ 5 แสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	110
แผนภูมิวงกลมที่ 1 แสดงสัดส่วนของเพศชายและเพศหญิง	105 125
แผนภูมิแท่งที่ 1 แสดงกลุ่มอายุของประชากร.....	126
แผนภูมิแท่งที่ 2 แสดงอาชีพของประชากร	126
แผนภูมิแท่งที่ ๓แสดงตำแหน่งรอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม	128
แผนภูมิแท่งที่ 4 แสดงตำแหน่งรอยโรคหูดที่ได้รับยาหลอก	128
แผนภูมิแท่งที่ 5 แสดงตำแหน่งรอยโรคหูดรวมทั้งสองตำแหน่ง	129
แผนภูมิแท่งที่ 6 แสดงระยะเวลาที่เป็นหูด	129
แผนภูมิวงกลมที่ 2 แสดงสัดส่วนประวัติการเป็นหูดมาก่อน	130
แผนภูมิแท่งที่ 7 แสดงจำนวนครั้งที่เคยเป็นหูดมาก่อน.....	132
แผนภูมิแท่งที่ 8 แสดงวิธีการรักษาหูดเก่า.....	134
แผนภูมิวงกลมที่ ๓แสดงสัดส่วนประวัติการรักษาโรคหูดครั้งนี้.....	135
แผนภูมิแท่งที่ 9 แสดงวิธีการรักษาหูดครั้งนี้.....	137
แผนภูมิแท่งที่10 แสดงค่าเฉลี่ยของ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดทั้ง 2 ตำแหน่ง	138
แผนภูมิ Boxplot ที่ 1 แสดงค่า mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอด	138
แผนภูมิ Boxplot ที่ 2 แสดงค่า mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดที่ได้รับยาหลอก.....	139
แผนภูมิแท่งที่ 11 เปรียบเทียบระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดก่อนการรักษา ทั้งในตำแหน่งที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอด และยาหลอก	140
แผนภูมิแท่งที่ 12 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN α ในรอยโรคหูดทั้ง 2 ตำแหน่ง.....	140
แผนภูมิเส้นที่ 1 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN α ในรอยโรคที่ได้รับยา5% อิมิกวิมอดและยาหลอกแต่ละราย.....	141

แผนภูมิลำดับที่	หน้า
แผนภูมิแท่งที่ 1๗ แสดงค่าระดับ mRNA for IFN α / 18S ในรอยโรคหูดของผู้ป่วยรายที่ 5.....	140
แผนภูมิแท่งที่ 14 แสดงค่าระดับ mRNA for IFN α / 18S ในรอยโรคหูดของผู้ป่วยรายที่ 6.....	144
แผนภูมิแท่งที่ 15 แสดงค่าระดับ mRNA for IFN α / 18S ในรอยโรคหูดของผู้ป่วยรายที่ 12	145
แผนภูมิแท่งที่ 16 แสดงค่าระดับ mRNA for IFN α / 18S ในรอยโรคหูดของผู้ป่วยรายที่ 10.....	146
แผนภูมิแท่งที่ 17 แสดงค่าระดับ mRNA for IFN α / 18S ในรอยโรคหูดของผู้ป่วยรายที่ 11.....	147
แผนภูมิแท่งที่ 18 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมน) ในสัปดาห์ที่ 2.....	152
แผนภูมิแท่งที่ 19 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมน) ในสัปดาห์ที่ 4.....	154
แผนภูมิเส้นที่ 2 แสดงปริมาณหูดที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละสัปดาห์ (ดัดแปลงจาก Sukwong O. Chulalongkom Derm Research 2005).....	162
แผนภูมิแท่งที่ 20 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยาในการรักษา common wart เทียบกับผลการศึกษาวิจัยก่อนหน้า.....	165
แผนภูมิแท่งที่ 21 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยาในการรักษา common wart เทียบกับผลของการศึกษาใช้ยาใน genital warts	165

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปภาพลำดับที่	หน้า
1. แสดงโครงสร้างของ genome เชื้อ HPV 16	20
2. แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ papillomavirus	27
แสดงบทบาทของภูมิคุ้มกันในการต่อต้านเชื้อ HPV ในจุดที่มีการหายเองและจุดที่ยู่ยาวนาน	
4. แสดงการกระตุ้นต่อ T-cells และ regulatory pathways ของภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ ในการต่อต้านเชื้อไวรัส.....	28
5. แสดงการเคลื่อนที่ของเซลล์ปฏิบัติการ (Recruitment of the effector cells)	30
6. แสดงรอยโรคหูดชนิด common warts ที่นิ้วมือ.....	32
7. แสดงรอยโรคหูดชนิด common warts บริเวณโคนนิ้วมือ.....	33
8. แสดงรอยโรคหูดชนิด common warts บริเวณหลังนิ้วเท้า.....	35
9. แสดงรอยโรคหูดชนิด periungual warts ของนิ้วชี้.....	37
10. แสดงรอยโรคหูดชนิด plantar warts บริเวณนิ้วโป้งเท้า.....	38
11. แสดงรอยโรคหูดชนิด perianal warts	39
12. แสดงรอยโรคหูดชนิด condyloma acuminata.....	41
1๓. แสดงรอยโรคหูดชนิด epidermodysplasia verruciformis	42
14. แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของหูดชนิด common warts.....	43
15. แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของหูดชนิด common warts.....	44
16. แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของหูดชนิด common warts เพิ่มกำลังขยาย.....	45
17. แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของหูดชนิด common warts เพิ่มกำลังขยาย.....	52
18. แสดงสูตรโครงสร้างโมเลกุลของยาอิมิกวิมอด.....	56
19. แสดงผลของยาอิมิกวิมอดในการกระตุ้นออกไปทาง Th1	58
20. แสดงระดับซัยโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดที่เพาะเลี้ยงของมนุษย์ (PBMCs)	61
21. แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาผ่านทางตัวรับ Toll like receptor 7.....	62
22. แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่มีผลกระตุ้นเซลล์ต่างๆ ให้หลั่งซัยโตไคน์.....	71
แสดงการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ในแต่ละรอบเป็นทวีคูณ	72
24. แสดงการทำปฏิกิริยาถูก โซโพลีเมอร์เรส ณขั้นตอน	74
25. แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาถูก โซโพลีเมอร์เรส denaturing step.....	74
26. แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาถูก โซโพลีเมอร์เรส annealing step	74
27. แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาถูก โซโพลีเมอร์เรส extension step	74

รูปภาพลำดับที่	หน้า
28. แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอร์เรส ในรอบที่สอง.....	75
29. แสดงอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการสกัด mRNA และการทำ PCR ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	76
30. แสดงการสร้าง cDNA เกิดจาก mRNA ด้วยวิธี Reverse Transcriptase-PCR.....	81
31. แสดงเครื่อง PCR รุ่น 7700 Applied Biosystems	82
32. แสดงเครื่อง PCR รุ่น 5700 Applied Biosystems	82
33. แสดงเครื่อง PCR รุ่น FluorTracker Stratagene.....	83
34. แสดงเครื่อง PCR รุ่น FluorImager Molecular Dynamics.....	84
35. แสดงเครื่อง PCR รุ่น iCycler BioRad.....	84
36. แสดงเครื่อง PCR รุ่น LightCycler (Roche)	84
37. แสดงเครื่อง Real Time PCR รุ่น LightCycler ต่อกับเครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับประมวลผล.....	85
38. แสดงเครื่อง LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) ที่ใช้ในการวิจัยนี้.....	85
39. แสดงขั้นตอนการทำ PCR แบบดั้งเดิม	86
40. แสดงหลักการของ SYBR Green.....	88
41. แสดงการตรวจวัด PCR product ด้วย SYBR Green I	89
42. แสดงFluorescent Resonance Energy Transfer (FRET)	91
43. แสดงการใช้ Hybridization probe เพื่อตรวจวัด PCR product.....	92
44. แสดงหลักการของ Hydrolysis หรือ Taqman probe	93
45. แสดงลักษณะของ Molecular Beacon.....	94
46. แสดงหลักการของ Molecular Beacon.....	95
47. แสดงหลักการของ Scorpions	96
48. แสดงการเปรียบเทียบหลักการของ Real-Time Quantitative PCR	97
49. แสดงการเปรียบเทียบ fluorescence monitoring system	99
50. แสดงอุปกรณ์การตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วย (shave biopsy)	111
51. แสดงน้ำยา RNA later ใน tube	111
52. แสดงตู้ความเย็น เก็บชิ้นเนื้อ ที่อุณหภูมิ - 80°C	112
53. แสดง hand homogenizer	113
54. แสดงเครื่อง centrifuge ที่ใช้ในการสกัด mRNA.....	114
55. แสดงเครื่อง spectrophotometer (BIO-RAD SmartSpect ๓600)	114
56. แสดงชุด kit ของน้ำยาและสารที่ใช้ในการสร้าง cDNA (ImProm-II™ RT system)	115

รูปภาพลำดับที่	หน้า
57. แสดงอุปกรณ์เครื่อง Thermal Cycle ที่ใช้ในงานวิจัย.....	115
58. แสดงช่องใส่สารตัวอย่างที่ใช้ในการทำ RT-PCR ในเครื่อง Thermal Cycle.....	116
59. แสดงเครื่อง Real time PCR รุ่น The LightCycle (Roche)	116
60. แสดงช่องใส่สารตัวอย่างที่ใช้ในการทำ Real time PCR ในเครื่อง The LightCycle	117



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

หูด (Wart or Verrucae) เป็นโรคที่พบได้บ่อยโดยทั่วไป เกิดจากการติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) ทำให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (hyperplasia) ของผิวหนังและเยื่อในชั้น epithelial cell เฉพาะที่ เกิดเป็นก้อนเนื้อที่โตขึ้นช้าๆ มักไม่มีอาการอยู่เป็นระยะเวลานาน

เชื้อไวรัสหูดมีประมาณ 130 ชนิด (HPV genotype) แต่ละชนิดทำให้มีลักษณะทางคลินิกแตกต่างกันไป เช่น HPV ชนิดที่ 1, 2 และ 4 ทำให้เกิดหูดที่ฝ่าเท้า (plantar wart), HPV ชนิดที่ 2, 4, 27 และ 29 ทำให้เกิดหูดที่ผิวหนังทั่วไป (common wart or verruca vulgaris), HPV ชนิดที่ 6, 11, 16 และ 18 ทำให้เกิดหูดหงอนไก่ ที่ anogenital area (condyloma acuminata) โดยส่วนใหญ่หูดเป็นก้อนหรือคุ่มนูนที่ไม่ร้ายแรง แต่มีหูดบางชนิด (HPV genotype) ที่สามารถกลายเป็นเนื้อร้าย หรือมะเร็งได้ เช่น หูดที่ปากมดลูก (cervical carcinoma) ที่เกิดจากเชื้อ HPV ชนิด 16 และ 18, epidermodysplasia verruciformis เป็นต้น[1]

หูดชนิดที่พบบ่อย ได้แก่หูดบริเวณผิวหนังชนิดธรรมดา (common warts) มีความชุกของโรคตั้งแต่ 0.78% - 22% พบมากในอายุช่วงวัยรุ่น และในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของภูมิคุ้มกันชนิดที่ซิมเพล็กซ์ เช่น HIV infection และ acquired immunodeficiency due to organ transplant ทำให้เกิดเป็นคุ่มนูนหนา ผิวหยาบขรุขระ มีสะเก็ด ขอบชัดเจนออกจากผิวหนัง โตขึ้นช้าๆ มักจะไม่มีอาการอยู่เป็นระยะเวลานาน เกิดเป็นคุ่มเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มก็ได้ พบได้ทุกส่วนของผิวหนังในร่างกาย แต่ส่วนมากมักเกิดกลุ่มที่มือ นิ้วมือ และนิ้วเท้า มักเป็นซ้ำอยู่บ่อยๆ

ผู้ป่วยอาจมีการติดเชื้อ HPV และมีรอยโรคอยู่ได้นานหลายปีไม่ถูกกำจัดออกไป เนื่องจากรอยโรคหูดอาจไม่ถูกรับรู้โดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย [2] เหมือนเช่นเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสปกติ แต่ในการติดเชื้อไวรัส HPV มีกลยุทธในการบุกรุกระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง ทำให้ร่างกายไม่สามารถทำลายเชื้อหูดได้จึงมีการติดเชื้ออยู่ได้นาน

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่เฉพาะเจาะจง ที่เป็นมาตรฐานในการรักษาการติดเชื้อหูด [1] วิธีการรักษาในปัจจุบัน ได้แก่ การจี้ด้วยความเย็น (cryosurgery) , จี้ด้วยไฟฟ้า (electrodesiccation), คาร์บอนไดออกไซด์เลเซอร์ (CO₂ laser), ฉีด bleomycin, 5-fluorouracil หรือ cantharidin เข้าบริเวณรอยโรค หรือการใช้สาร trichloroacetic acid, podofilox, silver nitrate, salicylic acid และ lactic acid

ป้ายเป็นต้น โดยการรักษานี้ส่วนใหญ่ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ (tissue local destruction) หรือทำให้เกิดการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อ (induction of cytotoxic against infected cells) เนื่องจากโรคหูดเป็นโรคที่ไม่ร้ายแรง (benign) สามารถหายได้เองประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์แม้จะไม่ได้รักษา ดังนั้นการรักษาหูดจึงไม่ควรทำให้เกิดแผลเป็น (scar) หลังการรักษา โดยไม่พบว่ามีการรักษาใดที่สามารถกำจัดการติดเชื้อ (viral infection) หรือการแบ่งตัวของไวรัส (replication) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และลดการกลับเป็นซ้ำได้

ยา Imiquimod (Aldara™) เป็นยาใหม่ จัดอยู่ในกลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulators) ชนิด Toll-like receptor (TLR7) agonist ซึ่งพัฒนามาจาก imidazoquinoline heterocyclic amine ตัวยามีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_{14}H_{16}N_4$ ลักษณะยาสีขาวนวล 5% cream ของ imiquimod ในเนื้อครีม 1 กรัมประกอบด้วย ตัวยา imiquimod 50 mg ผสมใน oil-in-water vanishing cream base

กลไกการออกฤทธิ์ของยา พบว่า ยานี้เป็น potent immune response modifier ยาไปจับและกระตุ้นต่อ Toll-like receptor 7 (TLR7) บนผิวของ Antigen presenting cell เช่น โมโนไซต์ (monocytes), มาโครฟาจ (macrophages), เคราติโนไซต์ (keratinocyte) และ dendritic cells (เป็นเซลล์นำเสนอแอนติเจนที่สำคัญของผิวหนัง) ให้มีการสร้างสารไซโตไคน์ (proinflammatory cytokines) และสารเคมีไคน์ (chemokines) สำหรับกระบวนการอักเสบ หลายตัว เช่น interferon alpha (IFN- α), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukins 1, 5, 6, 8, 10 และ 12, colony-stimulating factor เช่น G-CSF, GM-CSF เป็นต้น ซึ่งสารไซโตไคน์เหล่านี้มีผลกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้านฟิงเซลล์ (cell-mediated immunity) ทำให้เกิดการต่อต้านไวรัสเฉพาะที่ (local antiviral) ต่อต้านเนื้องอก (antitumor) ควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน (immunoregulatory activity) [3, 4, 5] โดยพบว่า Interferon alpha (Type I หรือ leukocyte IFN) IFN- α เป็นส่วนหนึ่งของ innate immune system ทำหน้าที่หลักในการกำจัดการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ และปกป้องเซลล์ข้างเคียงจากการติดเชื้อไวรัส โดยกระตุ้นให้เซลล์นั้นสร้างเอ็นไซม์ที่หยุดการเพิ่มจำนวนของไวรัส [6,7]

พบว่ายาสามารถกระตุ้นการทำงานของ Natural killer (NK) cell ให้หลั่งไซโตไคน์ และสารไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) ออกมากระตุ้นให้เกิดการเติบโตและเปลี่ยนแปลง (proliferation and differentiation) ของ B lymphocyte ทำให้มีผลต่อ Langerhans cell โดยกระตุ้นให้มีการเคลื่อนตัวของ activated Langerhans cell ไปที่ต่อมน้ำเหลืองมากขึ้น ไปกระตุ้น T-helper (Th)-1 cells ให้หลั่ง cytokines เช่น IFN- γ เพื่อกระตุ้นการสร้าง specific (cytotoxic) T-cells ต่อไป [4-5,8] เนื่องจากมีการศึกษาทดลองในสัตว์ชนิด guinea pigs ที่มีการติดเชื้อ herpes simplex virus พบว่าหลังการรักษาด้วยยาอิมิควิมอดสามารถลดอัตราการกลับเป็นซ้ำ [9] และการศึกษาทดลองในหนู (mice) เมื่อรักษาก่อนเนื้องอกของหนูด้วยยาอิมิควิมอดจนหาย ไม่มีก้อนเนื้องอกเกิดขึ้นใหม่หลังการรักษา 8 เดือน [5]

การลดอัตราการกลับเป็นซ้ำในสัตว์ทดลอง ได้อาจเนื่องมาจาก cytotoxic T-lymphocytes ซึ่งเซลล์เหล่านี้สามารถฆ่าเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์เนื้องอก และเป็นตัวสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันความจำ (immunological memory) ซึ่งจะป้องกันในการติดเชื้อไวรัสครั้งต่อไป [10]

ปัจจุบันยา 5% อิมิกวิมอดครีม มีข้อบ่งใช้ (approved indication) ในการรักษาหูดที่อวัยวะเพศ (anogenital warts) (ค.ศ.1997) และกลุ่มมะเร็งผิวหนัง คือ โรค actinic keratosis (ค.ศ.2004) และ superficial basal cell carcinoma (ค.ศ.2004) โดยพบว่าอัตราการกลับเป็นหูดซ้ำโดยการใช้นี้รักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศค่อนข้างต่ำกว่าวิธีอื่น อาจเป็นเพราะมีภูมิคุ้มกันความจำอยู่ (recall of a specific immune response) [9, 11]

เมื่อพิจารณาจากกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ ยานี้อาจจะมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ได้ด้วย แม้ว่าสำหรับหูดบริเวณผิวหนังชนิดธรรมดา (common warts) ยา 5% imiquimod cream ยังไม่เป็นที่ยอมรับในการรักษา (approved indication) เนื่องจากเป็นยาใหม่ รายงานการศึกษาวินิจฉัยยังออกมาน้อย รายงานที่ออกมาพบว่า ถ้าใช้วิธีการทายาอย่างเดียวเหมือนหูดบริเวณอวัยวะเพศ ยาถูกดูดซึมผ่านหูดที่ผิวหนังน้อยกว่า ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้ไม่เต็มที่ แต่มีหลายรายงานที่ใช้นี้ร่วมกับวิธีการรักษาอื่น เช่น ร่วมกับการทา 20% salicylic acid เนื่องจากยานี้เป็นกลุ่มยาลอกขุย (keratolytic agents) ทำให้หูดลดความหนาแน่น เพิ่มการดูดซึมของยา หรือใช้พลาสติกปิดทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ยาสัมผัสกับรอยโรคได้นานขึ้น พบว่าได้ผลค่อนข้างดี อัตราการหายสนิทของหูดแปรผันตั้งแต่ร้อยละ 60 ถึง 90 แล้วแต่วิธีการทายา และการรักษาอื่นร่วมด้วย ไม่พบการกลับเป็นซ้ำ (recurrence) และผลข้างเคียงที่รุนแรงจากการใช้นี้ ผลข้างเคียงที่พบบ่อยสุดจากการใช้ 5% อิมิกวิมอดครีม คืออาการแดง (erythema) , คัน (itching) และแสบร้อน (burning) บริเวณที่ทายา [12]

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าตัว imiquimod เองไม่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อไวรัส (antiviral), ยับยั้งการแบ่งตัว (antiproliferative), ทำลายเซลล์ (cytotoxic) หรือต่อต้านเนื้องอก (antitumor) โดยตรง แต่เชื่อว่ายากระตุ้นให้ร่างกายฆ่าไวรัส หรือเนื้องอกเอง จาก cytokine ที่หลั่งออกมา และจาก cytotoxic T cell [3] แต่อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่แน่ชัดในการกำจัดเชื้อไวรัส ทั้งในการรักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศ และหูดบริเวณผิวหนัง (common warts) รวมไปถึงการที่รอยโรคหูดบริเวณที่ผิวหนัง (common warts) เกิดจากเชื้อ HPV คนละสายพันธุ์กับรอยโรคหูดที่อวัยวะเพศ และมีชั้นหนังกำพร้า (stratum corneum) หนามากกว่า ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของยา ทำให้ไม่รู้แน่ชัดว่ายาสามารถซึมผ่าน skin barrier ไปกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ cytokines ได้มากน้อยแค่ไหน [13] ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยา imiquimod ระดับ โมเลกุล (molecular mechanisms) ในการรักษาหูดผิวหนังชนิด common warts

การศึกษานี้ได้เลือกใช้วิธีการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ (real Time PCR) เพื่อหาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอสำหรับสารซัยโตไคน์ ที่ตำแหน่งรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิควิมอดครีมเทียบกับยาหลอก ซึ่งวิธี real time PCR นี้สามารถตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้น (early phase) ซึ่งดีกว่า traditional PCR ที่ใช้ agarose gels สำหรับตรวจวัด PCR amplification ในระยะสุดท้าย (final phase) ที่มีข้อจำกัดมาก โดยเลือกวัดปริมาณ mRNA สำหรับ Interferon alpha ซึ่งเป็นซัยโตไคน์หลักในการทำงานของยานี้ แสดงค่าเป็น relative mRNA expression เทียบกับ House keeping genes คือ 18S ribosomal RNAs เลือกทำการตัดชิ้นเนื้อ (shave biopsies) จากรอยโรคหูดสองตำแหน่งในผู้ป่วยคนเดียวกัน เพื่อลดปัจจัยในด้านภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ (viral-host defense) ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล และมีผลต่อการเกิดและการหายของหูด โดยให้ผู้ป่วยไช้ยา 5% อิมิควิมอดครีมร่วมกับวิธีอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา คือร่วมกับการทา 20% salicylic acid ซึ่งเป็นยากลุ่มลอกขุย (keratolytic agents) ทำให้รอยโรคหูดบางลง การซึมผ่านของยาคีขึ้น อาจมีผลต่อการออกฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันด้วย ใช้พลาสติกปิดหลังทายา 5% อิมิควิมอดครีมและยาหลอก ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ยาสัมผัสกับรอยโรคได้นานขึ้น ส่วนอีกตำแหน่งหนึ่งให้ทายาหลอก ร่วมกับ 20% salicylic acid รอยโรค ให้ผู้ป่วยทายา 5% imiquimod cream 5 วันต่อสัปดาห์ตามที่เคยมีผู้ทำการศึกษามาก่อนที่ไช้ยาน้อยที่สุดและได้ผลกับหูดชนิดนี้

คำถามของการวิจัย (Research Question)

คำถามหลัก (Primary research question)

ระดับ mRNA ของอินเตอร์เฟอรอน อัลฟา (IFN α) ในรอยโรคหูดที่ไช้ยา 5% อิมิควิมอดครีม เทียบกับยาหลอกในการรักษาหูดผิวหนัง มีความแตกต่างกันหรือไม่

คำถามรอง (Secondary research question)

ผลข้างเคียงของการไช้ยา 5% อิมิควิมอดครีมในการรักษาหูดผิวหนังเป็นอย่างไร

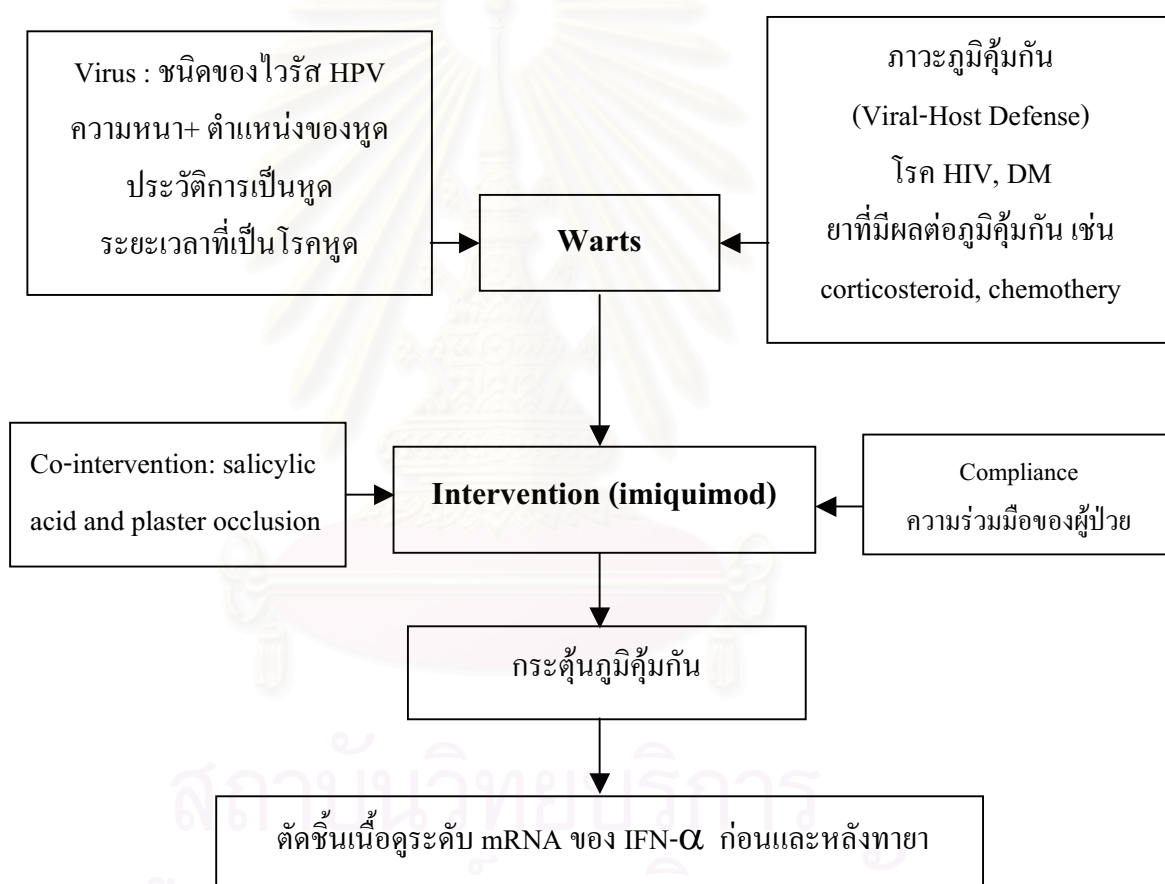
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

เพื่อศึกษาระดับ mRNA ของอินเตอร์เฟอรอน อัลฟา (IFN- α) ในรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิควิมอดครีม เทียบกับยาหลอกในการรักษาหูดผิวหนัง

สมมติฐาน (Hypothesis)

ระดับ mRNA ของอินเตอร์เฟอรอน อัลฟา (IFN- α) ในรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิกวิมอดครีม มีความแตกต่างกันกับยาหลอกในการรักษาหูดผิวหนัง

กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

ทำการศึกษาผู้ป่วยที่มีสุขภาพแข็งแรงแต่มีหูดชนิด common warts ที่คล้ายกันอย่างน้อย 2 แห่ง ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีการตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วย เพื่อไปตรวจทางห้องปฏิบัติการ

คำสำคัญ (Key words)

Imiquimod
 Common warts
 Interferon alpha
 Real time polymerase chain reaction

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definitions)

1. การวินิจฉัยหูดชนิด common warts

วินิจฉัยจากการ

1. ตรวจร่างกาย ลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับหูดชนิด common warts ลักษณะรอยโรคเป็นตุ่มนูนแข็ง โตช้า ผิวขรุขระ และมีสะเก็ด
2. ประวัติ ไม่เคยมีประวัติเคยมีการอักเสบบริเวณที่เป็นหูด

2. การประเมินผลทางห้องปฏิบัติการ (Real time PCR)

แบ่งเป็น

1. ระดับ mRNA ของ IFN α สัมพัทธ์ ในรอยโรคหูดก่อนทายา 5% อิมิกวิมอดครีม
2. ระดับ mRNA ของ IFN α สัมพัทธ์ ในรอยโรคหูดก่อนทายาหลอก
3. ระดับ mRNA ของ IFN α สัมพัทธ์ ในรอยโรคหูดหลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีม 2-4 สัปดาห์
4. ระดับ mRNA ของ IFN α สัมพัทธ์ ในรอยโรคหูดหลังทายาหลอก 2-4 สัปดาห์
5. ระดับ mRNA ของ IFN α สัมพัทธ์ หมายถึงระดับ mRNA ของ IFN α เทียบกับระดับ mRNA ของ 18S มีหน่วยเป็นจำนวนเท่า เทียบกับ House keeping genes (18S)

3. หูดใหม่ หมายถึง หูดซึ่งเป็นมาที่ปีก็ได้ และไม่เคยรักษาหูดมาก่อน

4. หูดเก่า หมายถึง หูดซึ่งเป็นมาที่ปีก็ได้ และเคยผ่านการรักษามาแล้วแต่ไม่หายหรือหายแล้วแต่เป็นซ้ำที่เก่า

5. ยาหลอก (topical placebo) คือ Hydrophilic base จากหน่วยเภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

6. 20%salicylic acid นำมาจากหน่วยเภสัชกรรม ร.พ. จุฬาลงกรณ์

7. ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน, โรคไต และ โรคเอดส์

ในการศึกษาวิจัยที่ตัดออกนี้ อาศัยการซักประวัติ ตรวจร่างกาย

1. โรคเบาหวาน หมายถึง ผู้ป่วยที่เคยทราบมาก่อนว่าเป็นเบาหวาน หรือมีอาการสงสัยโรค

2. โรคไต หมายถึง ผู้ป่วยที่เคยทราบมาก่อนว่าเป็นโรคไตหรือมีอาการสงสัยโรคนี้ เช่น บวมหน้าตา บวมตามตัว
3. โรค AIDS หมายถึง ผู้ป่วยที่เคยทราบมาก่อนว่าเป็นโรคนี้ หรือมี Oral candidiasis(OC), Oral hairy leukoplakia(OHL), Pruritic papular eruption(PPE)

ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations)

ยา 5% อิมิกวิมอดครีมนี้ ปัจจุบันได้นำมาใช้รักษาต่างๆ มากมาย ได้แก่โรคติดเชื้อไวรัสที่ผิวหนัง เช่น หูดบริเวณอวัยวะเพศ, หูดชนิด common warts, หูดข้าวสุก และโรคเรื้อรังที่เกิดซ้ำที่อวัยวะเพศ โรคในกลุ่มมะเร็งผิวหนัง superficial squamous cell carcinoma และรอยโรคก่อนมะเร็งผิวหนังเช่น bowen's disease, extramammary paget's disease และ lentigo maligna ไม่พบผลข้างเคียงที่รุนแรงจากการใช้ยานี้ ผลข้างเคียงที่อาจพบได้จากการใช้ยานี้ เช่นอาการคัน (itching), แดง (erythema), แสบร้อน (burning), ตุ่มน้ำใส (vesiculation), แผลถลอกตื้นๆ (erosion), แผลลึกถึงชั้นหนังแท้ (ulceration), รอยถลอกจากการเกา (flaking or excoriation) และบวมบริเวณที่ใช้ยา (edema) การทดลองต้องได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (informed consent) จากผู้ป่วย อธิบายประโยชน์ที่จะได้รับ อันตรายหรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น รวมทั้งสิทธิของผู้เข้าร่วม โดยข้อมูลทั้งหลายจะถูกเก็บเป็นความลับ

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

ผู้ป่วยต้องอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 15 ปี แต่ไม่เกิน 65 ปี มีสุขภาพแข็งแรง เป็นหูดชนิด common warts ที่คล้ายกันอย่างน้อยสองที่

การศึกษาวิจัยต้องอาศัยความร่วมมือของผู้ป่วยในการปฏิบัติตามขั้นตอนการวิจัย (compliance) และการวัดผลทางการตรวจทางห้องปฏิบัติการต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านในการตรวจวัด และการตรวจวัดผลมีต้นทุนสูง

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits & Application)

1. ทราบผลของยา 5% อิมิกวิมอดครีมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในการรักษาโรคหูดบริเวณผิวหนัง (common warts) โดยวัดระดับ mRNA expression ของ IFN- α เทียบกับยาหลอก

2. ทราบผลข้างเคียงจากการใช้ยา 5% อิมิควิมอดครีม ทั้งจากการประเมินผลโดยตัวผู้ป่วยเอง และประเมินโดยแพทย์

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacle)

ผู้ป่วยใช้ยาสลับกัน ไม่ใช้ยาตามคำแนะนำ ลืมทายา แก้ไขโดยอธิบายวิธีการใช้อย่างละเอียด เน้นไม่ทำให้ยาสลับกัน ประเมินความร่วมมือของผู้ป่วย (compliance) อธิบายผู้ป่วยถ้าอีกข้างหนึ่งไม่หายขอให้ผู้ป่วยปฏิบัติตามการวิจัยก่อน หลังจบการศึกษาวิจัยจะรักษาหูดให้ผู้ป่วยโดยใช้ยาตัวนี้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ผู้ป่วยรู้สึกว่าการรักษาที่ใช้เวลานาน แก้ไขโดยอธิบายระยะเวลา วิธีการศึกษาวิจัยอย่างชัดเจน และอธิบายว่าการหายด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของตนเองจึงจำเป็นต้องใช้ระยะเวลา นานกว่าวิธีการรักษาที่ทำลายหูดอื่นๆ

ผู้ป่วยไม่มาตรวจตามนัด แก้ไขโดยขอความร่วมมือจากผู้ป่วย ประเมินว่าผู้ป่วยสามารถเข้าร่วมโครงการวิจัย และมาตามนัดได้หรือไม่

ในการตัดชิ้นเนื้อ (shave biopsy) เพื่อนำไปตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ 4 สัปดาห์หลังทายารอยโรคหูดอาจเหลืออยู่น้อย จนมีขนาดไม่เพียงพอจะตัด หรือขนาดที่ตัดได้ไม่เพียงพอที่จะนำไปตรวจหาทางห้องปฏิบัติการ แก้ไขโดยนัดให้ผู้ป่วยมาประเมินการเปลี่ยนแปลงของขนาดหูดบ่อยๆ ทุก 2 สัปดาห์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of Related Literatures)

หูดที่ผิวหนัง (Common warts) มักเกิดจากเชื้อ HPV ชนิดที่ 2, 4 และ 29 โดยพบประมาณ 10% ในเด็กอายุ 2-12 ปี จัดเป็น โรคทางผิวหนังที่พบบ่อยเป็นอันดับที่ 3 ในช่วงอายุนี้นี้ ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่เป็นมาตรฐาน (standard treatment) เนื่องจากไม่มีวิธีการรักษาที่ดีที่สุด ทุกวิธีมีอัตราการกลับเป็นซ้ำ ผู้ป่วยบางรายหูดรักษาหายยากต้องใช้หลายวิธีร่วมกัน

ในคนทั่วไปถ้าไม่รักษาหูดสามารถหายได้เอง (spontaneous regression) ประมาณ 10-30% ในระยะเวลาเป็นสัปดาห์ ถึงหลายเดือน เชื่อว่าเป็นผลมาจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย

มีการพิสูจน์แล้วว่าเป็นการยากที่จะติดตามการทำงานของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อหูด ทั้งภูมิคุ้มกันเฉพาะที่ และทั่วร่างกาย (local and systemic immune response) อาจเป็นเพราะว่า เวลาเริ่มต้นในการติดเชื้อของหูดยังไม่ทราบแน่ชัด ทำให้ไม่สามารถวัดระดับภูมิคุ้มกันในระยะแรก (early immune response) ได้, การที่หูดมีหลายชนิด แต่ละชนิดอาจจะมี หรือไม่มีภูมิคุ้มกันข้ามกันได้ (immunological cross reaction), มีลักษณะทางคลินิกแตกต่างกันหลากหลาย หรือมีการติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ (subclinical infection) และความสัมพันธ์ระหว่าง HPV type กับ host มีความผันแปรมาก ดังนั้นเป็นไปได้ยากที่จะแยก recent HPV exposure กับ past HPV exposure ที่อยู่นาน (persistent) และที่สำคัญมันจะเป็นการยุ่งยากและไม่ตรงไปตรงมาที่จะได้ viral agents หรือ epitopes มาเพื่อใช้ในการทำ immunological assays [6]

ในปี 1980 Obalek S, Glinski W และคณะ [14] ได้ทำการศึกษา cell-mediated immunity ในผู้ป่วยหูดชนิดต่างๆกัน (common 84 คน; flat 88 คน; plantar 22 คน; genital 14 คน และ EV 15 คน โดยการวัด in vitro lymphocyte response to PHA และ in vivo experimental DNCB sensitization พบว่า lymphocyte response to PHA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยทุกกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับ normal controls โดยพบว่า T cell function บกพร่องมากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็น EV และ flat warts ในผู้ป่วย common warts พบว่ามีภูมิคุ้มกันต่ำลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ CMI ในผู้ป่วยทั้ง plantar และ genital warts พบว่าเกือบจะปกติ ส่วนการวัด DNCB sensitivity พบได้น้อยและ less intensive ในผู้ป่วยที่เป็นหูดชนิด common และ flat warts เมื่อเทียบกับ normal population และ 60% ของผู้ป่วย EV พบว่า anergic ต่อ challenging doses ของ DNCB จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างใน

แม้ CMI defect ในผู้ป่วยที่เป็นหูดต่างชนิดกัน มี HPV types ต่างๆ กันไป ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อ HPV types ต่างกัน มีผลต่อ host cell-mediated resistance ซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส

ในปี 1985 Chardonnet และคณะ [15] ได้ทำการศึกษาคู CMI ต่อ HPV พบว่า T-cell mediated response จะมีมากในผู้ป่วยที่โรคหูดสามารถหายไปได้เอง (spontaneous regression) มีผู้ป่วยน้อยคนที่ จะพบว่าไม่มี response เมื่อกำลังเป็นหูดอยู่ และพบว่า weak response or negative ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นหูด เป็นๆหายๆ มานาน

ในปี 1974 Warwic L.Morison และคณะ [16] ได้ทำการศึกษาโดยการตรวจ leukocyte migratory inhibition test ต่อ wart antigen ในคนที่เป็นหูดชนิดต่างๆ ยกเว้นหูดที่อวัยวะเพศ ที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีต่างๆ (apply salicylic acid 20%, formalin 20%, cryotherapy, excision) พบว่าขณะที่ หูดกำลังหาย จะมี immunity เพิ่มขึ้น โดยพบว่ามี antibody ในผู้ป่วยที่มี active หรือ recent infection แต่ไม่มีหลักฐานที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างการพบ antibody กับการหายของหูด

ในปี 1976 A.K.Y. Lee และ Magdalena Eisinger [17] ได้ทำการวัด lymphocyte transformation และ leukocyte migratory inhibition เพื่อศึกษาถึง CMI response ต่อ purified human wart virus และ wart tissue extract ในผู้ป่วย โดยคัดเลือกแบ่งผู้ป่วยเป็น 4 กลุ่ม พบว่ากลุ่มที่เป็นหูดมา นานน้อยกว่า 1 ปี ส่วนมากมี positive CMI response ต่อ virus และ wart tissue extract ในขณะที่มี ผู้ป่วยจำนวนน้อยในกลุ่มที่เป็นหูดมานานกว่า 1ปี ที่มี response โดยค่า mean SI ทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในผู้ป่วยกลุ่มที่มีประวัติเคยเป็นหูด พบว่ามี positive response เช่นกันแต่ response จะลดลงเมื่อหูดเป็นหูดมาเป็นระยะเวลาานแล้ว และที่น่าสนใจคือในกลุ่มที่ไม่เคยมีประวัติ เป็นหูดมาก่อน ก็ยังมี response ต่อ purified human wart viral stimuli แต่ไม่มี response ต่อ tissue extract การที่มี positive response ต่อ wart tissue extract สะท้อนให้เห็นว่ามีคุณสมบัติในการเป็น wart associated antigen มากกว่า wart virus CMI response ต่อ wart virus และ wart tissue extract อาจช่วยในการป้องกัน persistence หรือ establishment ของโรค แต่ protective immunity นี้มีระยะเวลาสั้น นอกจากนี้การศึกษานี้ยังชี้ให้เห็นว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง LT กับ LMIF production

ในปีเดียวกัน L.Ivnyi และ W.L.Morison [8] ใช้ lymphocyte transformation test ในการศึกษา ผู้ป่วยที่กำลังเป็นหูด เทียบกับผู้ป่วยที่มีประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน และกลุ่มควบคุม พบว่า ผู้ป่วยที่ กำลังเป็นหูดมี mild response ($SI < 4$) ต่อ semipurified HPV และ response นี้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ หลังจาก หูดหายแล้ว และยังคงพบได้นานถึง 6 เดือน หลังจากโรคหายแล้ว และในกลุ่มผู้ป่วยที่เคยเป็นหูดมา ก่อนจะพบมี DNA synthesis ของ lymphocytes มากที่สุด (strong response $SI > 4$) ส่วนในกลุ่มควบคุมที่ไม่เคยเป็นหูดมาก่อน ไม่ถูกกระตุ้น โดย wart antigens

ในปี 1980 Berman A. และคณะ [18] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ clinical และ Histological

findings ในหูดที่กำลังหายทั้งในคนและสัตว์ พบว่าพยาธิวิทยาของหูดที่หายเองได้ จะมี lymphoid cell infiltration ยิ่งเป็นการสนับสนุนความสำคัญของ cellular response ในการควบคุมการติดเชื้อหูด

จากหลายรายงานที่ศึกษาถึงภูมิคุ้มกันต่อเชื้อหูดชี้ให้เห็นว่า ภูมิคุ้มกันชนิดฟิงเซลล์ (Cell mediated immunity) เป็นภูมิคุ้มกันหลักในร่างกายที่ใช้ควบคุมและกำจัดการติดเชื้อไวรัสหูด ในผู้ป่วยที่ความบกพร่องของภูมิคุ้มกันชนิดนี้ทำให้เกิดโรคหูดที่รุนแรง หายเองได้ยาก และต้องการรักษา แต่ในผู้ป่วยที่มีความบกพร่องในระบบภูมิคุ้มกันชนิดน้ำ (humeral immune response) หรือมีความบกพร่องในการผลิตสารแอนติบอดีกลับไม่ทำให้เกิดโรคหูดมากขึ้น [6]

ทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการค้นพบยาใหม่ คือ Imiquimod cream 5% หรือ R-837 หรือ S-26308 (Aldara™) ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้รับการยอมรับ (approved indication) ในการรักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศ (anogenital warts) และกลุ่มมะเร็งผิวหนัง คือ โรค actinic keratosis และ Superficial basal cell carcinoma [9, 11] จาก Phase III clinical studies (Beutner et al., Edwards et al., 1998) โดยพบว่ายานี้มีประสิทธิภาพรักษารอยโรคหูดบริเวณอวัยวะเพศหายสนิทต่างกับยาหลอก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอัตราการกลับเป็นหูดซ้ำในการใช้ยานี้ค่อนข้างต่ำกว่าวิธีอื่น อาจเป็นเพราะว่ายานี้สามารถกำจัดเชื้อไวรัส และสร้างภูมิคุ้มกันและภูมิคุ้มกันความจำมาควบคุมการติดเชื้อ [19]

5% อิมิควิมอดครีม เป็นยาทาผู้ป่วยใช้เองได้สะดวก ผลข้างเคียงน้อย จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำมารักษาหูดชนิดอื่นๆ ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยหลายงานที่แสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีของยานี้ในการรักษาหูดบริเวณผิวหนัง (common warts)

ในปี ค.ศ. 2000 Hengge UR และคณะ [13] ทำการศึกษาทดลองในผู้ป่วยเป็นหูดบริเวณผิวหนัง (common warts) ที่รักษายาก ที่รักษาด้วยวิธีอื่นไม่ได้ผล จำนวน 50 ราย ทายา 5% อิมิควิมอดครีมวันละครั้ง ทิ้งยาไว้ตลอดคืน ตอนเช้าล้างออก 5 วันต่อสัปดาห์ ติดตามประเมินผลการรักษาทุก 4 สัปดาห์จนกว่าหายหรือครบ 16 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า 15 ราย ใน 50 ราย รอยโรคหายสนิท (total clearance = 30%) หูดไม่หายสนิทแต่ลดขนาดลงมากกว่าร้อยละ 50 (>50% reduction in wart size = 26%) จำนวน 13 ราย ใน 50 ราย ระยะเวลาการรักษาเฉลี่ย 9.2 สัปดาห์ ไม่มีผู้ใดกลับเป็นซ้ำหลังรักษาหายแล้ว เมื่อติดตามเป็นระยะเวลาเฉลี่ย 32 สัปดาห์ (ระยะเวลาตั้งแต่ 24-64 สัปดาห์) ในการศึกษานี้ได้แยกดูผลการตอบสนองต่อการรักษาในด้านเพศ ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยภูมิแพ้ผิวหนัง (Atopic dermatitis) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในการตอบสนองต่อการรักษา และผลข้างเคียงที่พบได้บ่อย คือ อาการแดง (erythema) เพียงเล็กน้อย และเป็นชั่วคราว สรุปผลการศึกษาทดลอง ยา 5% อิมิควิมอดครีมมีประสิทธิภาพในการรักษาหูดที่ต่อการรักษาด้วยวิธีอื่น

ในปี ค.ศ. 2002 Grussendorf-Conen E-I และคณะ [20] ทำการศึกษาประสิทธิภาพของทายา 5% อิมิควิมอดครีมในการรักษาหูดบริเวณผิวหนังที่เป็นมาระยะเวลาานาน (ระยะเวลาเป็นหูดเฉลี่ย 6.3

ปี) ที่ต้องต่อการรักษาด้วยวิธีอื่นจำนวน 38 ราย ทายา 5% อิมิควิมอดครีมวันละ 2 ครั้ง ติดตามประเมินผลการรักษาทุก 4 สัปดาห์ จนกว่าหายหรือครบ 24 สัปดาห์ มีผู้ป่วย 31 ราย เข้าร่วมการวิจัยจนจบผลการทดลองพบว่า 10 ราย ใน 37 ราย รอยโรคหายสนิท (total clearance = 27%) หูดไม่หายสนิทแต่ลดขนาดลงมากกว่าร้อยละ 50 จำนวน 18 ราย (49%) รอยโรคหูดขนาดลดลงน้อยกว่าร้อยละ 50 จำนวน 5 ราย (14%) ระยะเวลาการรักษาเฉลี่ย 19.2 สัปดาห์ สรุปผลการศึกษาดังกล่าว ยา 5% อิมิควิมอดครีมมีประสิทธิภาพในการรักษาหูดที่ติดต่อการรักษาดูด้วยวิธีอื่น การทายาระยะเวลานานไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรง

และในปีเดียวกัน Grussendorf-Conen E-I [21] ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของยาในการรักษาหูดบริเวณผิวหนังในผู้ป่วยเด็กที่เป็นมานาน 2-7 ปี และต้องต่อการรักษาด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การทา Verrumal (5-FU, salicylic acid, dimethylsulfoxide), การผ่าตัด, การจี้ด้วยความเย็น, เลเซอร์ และการใช้ 60% salicylic plaster เป็นต้น โดยให้ทายาวันละ 2 ครั้งทุกวัน และผ่านหูดออกด้วยไบมิดโกน (scapel parring) ทุก 2 สัปดาห์ มีผู้ป่วยจำนวน 18 คน เข้าร่วมการวิจัย พบว่าผู้ป่วย 16 ใน 18 คน รอยโรคหายสนิท (clear = 88.9%) และหูดไม่หายสนิทแต่ลดขนาดลงมากกว่า แต่มีผู้ป่วย 16 คนที่เข้าร่วมการวิจัยจนจบ

ในปี ค.ศ. 2002 Housman TS และคณะ [22] รายงานผลการรักษาผู้ป่วยหูดบริเวณผิวหนัง (common warts) ที่ต้องต่อการรักษาด้วยวิธีอื่น 3 ราย วิธีรักษา ให้ผู้ป่วยจี้ด้วยความเย็น (cryosurgery) ทายา 17% ซาลิไซลิก แอซิด (salicylic acid) ก่อนนอนทุกคืน และทา 5% อิมิควิมอดครีมทุกเช้า ผู้ป่วย 1 ราย รอยโรคหายสนิทในสัปดาห์ที่ 7 ผู้ป่วยอีก 2 ราย รอยโรคหูดขนาดลดลงแต่ไม่หายสนิทเมื่อรักษาได้ 7 และ 9 สัปดาห์ ผู้ป่วยไม่ขอรับการรักษาคือ ผลข้างเคียงที่พบบริเวณผิวหนังที่ทายามีรอยแดงเล็กน้อย ไม่มีผลข้างเคียงอื่น

ในปี 2002 Muzio G และคณะ [23] ได้ทำการศึกษาทดลองในผู้ป่วยที่เป็นหูดบริเวณผิวหนังที่ทำการรักษาไม่หาย (resistant warts) จำนวน 10 ราย ทายา 5% อิมิควิมอดครีมตามด้วยแผ่นปิด (under occlusion) ทายาวันละครั้ง ทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ 4 สัปดาห์ การรักษาได้ผลในผู้ป่วย 9 ราย ไม่มีรอยโรคหูดเกิดขึ้นใหม่หลังติดตามผู้ป่วย 3 เดือน

ในปี ค.ศ. 2003 Hesterberg U และคณะ [24] ทำการศึกษาทดลองผู้ป่วยเป็นหูดที่ติดต่อการรักษาคือ 22 คน รอยโรคหายสนิทร้อยละ 41 รอยโรคหูดหายบางส่วนร้อยละ 50 รอยโรคหูดไม่ดีขึ้นร้อยละ 9 สังเกตว่าผู้ป่วยที่ทำการรักษาถ้าเกิดบริเวณรอบๆ รอยโรคแดง แสดงว่ามีการตอบสนองต่อการรักษาคือ สรุปผลการทดลองยา 5% อิมิควิมอดครีมมีประสิทธิภาพการรักษาคือติดต่อการรักษาคือ ใช้สะดวก ผลข้างเคียงน้อย (งานวิจัยนี้ไม่สามารถหาเนื้อหาทั้งหมดได้ เนื่องจากเป็นงานวิจัยตีพิมพ์ภาษาเยอรมัน ศึกษาได้จากบทคัดย่อเท่านั้น ซึ่งไม่ได้บอกวิธีการทายา)

ในปี 2005 แพทย์หญิงอรพินท์ สุขวงษ์ และคณะ [12] ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างยา 5% อิมิควิมอดครีม กับยาหลอกในการรักษาหูดธรรมดาโดยนำผู้ป่วยที่เป็นหูดธรรมดาที่มีรอยโรคหูดขนาดใกล้เคียงกัน และอยู่คนละด้านซ้ายขวาของร่างกาย ตอนเช้าให้ทายา 20% ซาลิไซลิก แอซิดทั้งสองข้าง กลางคืนด้านหนึ่งทายา 5% อิมิควิมอดครีม อีกด้านหนึ่งทายาหลอกตามด้วยแผ่นปิดทั้งคู่ ทายา 5 ครั้งต่อสัปดาห์ นัดติดตามการรักษาทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ผลการวิจัยพบว่ายา 5% อิมิควิมอดครีมกับแผ่นปิดร่วมกับทา 20% ซาลิไซลิก แอซิดรักษารอยโรคหูดหายสนิทต่างกับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังการรักษากลุ่มผู้ป่วยที่รักษาด้วยยา 5% อิมิควิมอดครีมมีปริมาตรเฉลี่ยของหูดน้อยกว่ากลุ่มที่รักษาด้วยยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value = 0.002) ระยะเวลารักษาเฉลี่ย 8.625 สัปดาห์ โดยปริมาตรหูดลดลงต่ำกว่ากรวยโรคหูดเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 หลังรักษา (p -value = 0.002) อัตราการหายสนิทของหูดเมื่อใช้ยา 5% อิมิควิมอดครีมเท่ากับร้อยละ 61.54 ผลข้างเคียงน้อย และอัตราการกลับเป็นซ้ำร้อยละ 6.25

ในการวิจัยนี้มีข้อสังเกตได้ว่ารอยโรคหูดในกลุ่มที่ทายาหลอก มีขนาดเล็กลงตามลำดับคล้ายกับการรักษาด้วย 5% อิมิควิมอดครีม ในจำนวนผู้ป่วย 26 คนที่ร่วมการทดลอง ในกลุ่มยาหลอกมีผู้ป่วยถึง 6 รายที่รอยโรคหายสนิท คิดเป็น 23% ของทั้งหมด โดยสังเกตว่าส่วนใหญ่ผู้ป่วยในกลุ่มนี้จะเป็นผู้ป่วยที่มีหูดที่รักษายาก เป็นหูดในตำแหน่งที่รักษายาก เช่น periungual warts หรือ คือต้องการรักษาด้วยวิธีอื่นๆ ก่อนหน้าจะเข้าร่วมการทดลอง แต่รอยโรคกลับหายสนิทได้โดยการทา placebo ร่วมกับ 20% salicylic acid เพียงอย่างเดียว และมีอัตราการเป็นซ้ำต่ำ คือ 0% หรือไม่มีเลย จึงเป็นที่น่าสังเกตว่า ยา 5% อิมิควิมอดครีม ซึ่งการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า ยานี้มีผลกระตุ้นให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์เฉพาะที่ (applied site) ดังนั้นจึงเป็นที่มาที่จะนำมาศึกษาวิจัยต่อว่ายา 5% อิมิควิมอดครีมนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแล้วมีผลทั่วร่างกายได้หรือไม่ (systemic)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบวิธีการและผลการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของยา5% อิมิควิมอคครีม ในการรักษาหูดชนิด common warts ในงานวิจัยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ลำดับที่	Sukwong O. และคณะ	Hengge UR และคณะ	Grussendorf และคณะ	Hesterberg U และคณะ	Muzio G. และคณะ
ปีที่ศึกษา	2005	2000	2002	2003	2002
ชนิดหูด	Common warts	Common warts	Common warts	-	Common warts
จำนวนผู้เข้าร่วมวิจัย (คน)	30	50	38	22	10
เพศ (ชาย:หญิง)	2 : 1	1.5 : 1	0.4 : 1	-	-
อายุเฉลี่ย (ปี)	27.9	34.2	37.4	-	-
ประวัติรักษาเคย : ไม่เคย	1 : 1.4	7.3 : 1	8.5 : 1	-	-
ระยะเวลาเฉลี่ย (เดือน)	29.13	29.2	76	-	-
วิธีการวัดขนาดหูดก่อนรักษา	ปริมาตรหูด (μL)	ขนาด (mm ²)	ปริมาตรหูด (กว้าง×ยาว×ลึก) (mm.)	-	-
วิธีการทายา	5 ครั้งต่อสัปดาห์	5 ครั้งต่อสัปดาห์	วันละ 2 ครั้ง	-	วันละครั้ง
การรักษาร่วม	20% ซาลิไซลิก และแผ่นพลาสติก	ไม่มี	ไม่มี	-	แผ่นพลาสติก
อัตราการหายสนิท (ร้อยละ)	61.54 (failure analysis) 53.3 (intent to treat analysis)	30	27	4	90

มีการศึกษาหลายงานที่ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยานี้ โดยพบว่ายา 5% อิมิควิมอดคริม เป็น imidazoquinoline amine ทำหน้าที่ในสัตว์ทดลองเป็น immune response modifier พร้อมทั้งเป็น potent antiviral และ antitumor ด้วย กลไกการออกฤทธิ์ของยาใน การต่อต้าน ไวรัส(antiviral) ถูกค้นพบครั้งแรกในหมู (guinea-pigs) โดย Harrison CJ. และคณะ [24] พบว่าสัตว์ที่ได้รับยาอิมิควิมอด(imiquimod) หรือ S-28463 ไม่ว่าจะให้ผ่านทางช่องคลอด(transvaginal) เยื่อช่องท้อง(intrasperinoeal) ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ(intramuscular) ใต้ผิวหนัง(intradermal) ใต้ชั้นไขมัน(subcutaneous) หรือให้กินทางปาก(by mouth) ก็สามารถป้องกันการติดเชื้อ Herpes simplex virus (HSV) ได้ โดยหนูที่ได้รับยาอิมิควิมอดก่อน หรือภายใน 24 ชั่วโมงของการติดเชื้อ (inoculation of HSV) จะไม่เป็นโรคเลย (no primary disease) ไม่มีระยะแฝง (latency) และไม่กลับเป็นซ้ำ (recurrences) แต่ก็ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ ในหนูที่ติดเชื้อ genital HSV แล้ว พบว่าการให้ยาอิมิควิมอด ในระยะ 24-48 ชั่วโมงหลังจาก inoculation ทำให้หนูเป็นโรคน้อย (less primary disease) ระยะแฝงตัวสั้น (latency) และกลับเป็นซ้ำน้อย (recurrences) เมื่อเทียบกับยาหลอก ส่วนการให้ยาในระยะ very late 72 ชั่วโมงหลังจาก inoculation พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ primary disease และระยะแฝง (latency) แต่ลดจำนวนการกลับเป็นซ้ำได้ ในการศึกษาทดลองหนูที่มีประวัติเป็นเริ่มที่อวัยวะเพศซ้ำๆ (recurrent genital Herpes) พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ lesion score ในกลุ่มหนูที่ได้รับยาอิมิควิมอด เมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle [25]

นอกจากนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมพบว่ายาอิมิควิมอดยังมีผลในการป้องกันการติดเชื้อ cytomegalovirus, Rift Valley Fever และ Bansi influenza virus ในหมู (guinea-pigs), เชื้อ arbovirus ในหนู (mice) และใช้รักษาโรคไข้เหลือง (Yellow fever) ในลิงด้วย [26]

นอกจากฤทธิ์ในการต่อต้านไวรัสแล้ว ยานี้ยังมีผลในการต่อต้านเนื้องอก (antitumor) ในสัตว์ทดลองด้วย ในปี คศ 1990 Sidky YA. และคณะ [27-28] พบว่ายานี้สามารถยับยั้งการขยายตัว หรือแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้องอก ทั้งในหนูที่เป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ (MC-26 colon carcinoma), B16-F10 melanoma, MCF-7 human mammary tumor, มะเร็งปอด (Levis lung carcinoma), RIF-1 sarcoma, เนื้องอกที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดจากสารก่อมะเร็ง (chemical carcinogen) เช่น N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ(FCB bladder tumor) โดยใน FCB bladder tumor นอกจากยาจะมีฤทธิ์ต่อต้านเนื้องอกแล้ว(antitumor) พบว่ายานี้ทำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อเนื้องอก (tumor-specific immunity) ได้อีกด้วย โดยการทดลองแบ่งเป็น 2 ระยะ ระยะแรกคือรักษาหนูที่เป็นเนื้องอก โดยให้อิมิควิมอดพบว่าการหายไปของเนื้องอก (complete reduction in tumor size) เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา และระยะที่สองได้ทำการ Rechallenge เนื้องอกกลับไปใหม่ โดยพบว่าไม่เกิดเนื้องอกขึ้นในหนูที่หายจากเนื้องอกหลังได้รับการรักษาด้วยอิมิควิมอด เทียบกับหนูปกติ (naïve animals) ซึ่งมีเนื้องอกเกิดขึ้น [29]

ในปี ค.ศ.1995 Testerman TL.และคณะ [30] ได้ทำการทดลองดูผลของยา imiquimod (R-837, S-26308) และ analogue S-27609 ต่อระดับ cytokine ใน human blood cells (PBMC) โดยนำ supernatant มาดูพบว่า ยาสามารถกระตุ้น human monocytes ให้มีการหลั่ง $IFN\alpha$, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ เป็นหลักมากกว่า 5-10 เท่า นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้น $IL-1\alpha$, $IL-1$ receptor antagonist, $IL-10$, $IL-12$, p40, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 α และ MIP-1 β และจาก kinetic studies พบว่าการผลิต cytokines ต่างนี้สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 1-4 ชั่วโมงหลังจาก imiquimod stimulation

ในปี ค.ศ. 1998 Imbertson L.M. และคณะ [31] ทำการทดลองวัดระดับ cytokines จาก biopsy specimen ที่ถูกกระตุ้นเมื่อทายา topical 1-5% imiquimod ให้กับ hairless mice พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ $IFN\alpha$ และ $TNF\alpha$ ในผิวหนังตำแหน่งที่ทายา มากกว่าในผิวหนังตำแหน่งตรงข้ามที่ไม่ได้ทายา โดยวัด mRNA local transcription นอกจากนี้ในการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ interferon and tumor necrosis factor ใน cultures of cells แยกได้มาจาก hairless mouse และมีการเพิ่มขึ้นของ interleukin-8 ใน human keratinocyte และ fibroblast cultures

ในปีเดียวกัน Tying และคณะ [32] ทำการทดลองเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยา 5% อิมิควิมอดครีမ် ในการรักษาหูดหงอนไก่ที่อวัยวะเพศจำนวน มีผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัยจำนวน 22 คน แต่มีผู้ป่วยที่หายไปจำนวน 3 คน ให้ผู้ป่วยทายา ทำการตัดชิ้นเนื้อหูดก่อนการรักษา ผู้ป่วย 16 คน ทายา 5% อิมิควิมอดครีမ် และ 3 คนทายาหลอก ทำการตัดชิ้นเนื้อก่อนการทดลอง, ที่ 6 สัปดาห์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำมาทำ PCR เพื่อหา HPV DNA และทำ RT-PCR สำหรับ mRNA for cytokines จากผู้ป่วยหูดหงอนไก่ที่อวัยวะเพศที่ตอบสนองดีต่อการรักษาด้วย 5% อิมิควิมอดครีမ် พบว่ามีระดับการแสดงออกของ mRNA สำหรับ $IFN-\alpha$ และ $TNF-\alpha$ สูงมากกว่ากลุ่มที่ตอบสนองต่อยาเพียงเล็กน้อย หรือไม่ตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในปี 1999 Istvan Arany และคณะ [33] ทำการทดลองเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยา imiquimod โดยให้ผู้ป่วยที่เป็นหูดที่อวัยวะเพศจำนวน 16 คนทายา 5% อิมิควิมอดครีမ် และ 3 คนทายาหลอก 3 ครั้งต่อสัปดาห์ต่อกันเป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับยา 5% อิมิควิมอดครีမ် ทุกคนหูดมีขนาดลดลงมากกว่า 75% และมี 1 คนในจำนวน 3 คนของกลุ่มยาหลอกที่หูดเล็กลงเหมือนกัน คณะทดลองได้ทำการตัดชิ้นเนื้อก่อนการทดลอง, ที่ 6 สัปดาห์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำมาทำ PCR เพื่อหา HPV DNA และทำ RT-PCR สำหรับ mRNA for cytokines, cellular markers, viral genes products และ cell cycle markers พบว่าในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย imiquimod ระดับ mRNA for $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, 2',5' oligoadenylate synthetase (2',5'-AS) และ CD4 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และ $TNF\alpha$, $IL-12$ p40 และ CD8 มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้แล้วพบว่าในผู้ป่วยกลุ่มนี้มีปริมาณไวรัส (viral load) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากทายา โดยวัดจากปริมาณ HPV DNA และ

L1mRNA เป็นการสนับสนุนว่ามีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดที่พึ่งเซลล์ ส่วนผลต่อ HPV markers พบว่ามีการลดลงในการแสดงออกของ mRNA for markers of cell proliferation และมีการเพิ่มขึ้นของ mRNA for markers of keratinocyte differentiation และ tumor suppressors

และในปีเดียวกัน Renata L.A. Bottrel และคณะ [34] ได้ทำการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลที่ยา imiquimod สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IFNs, IFN-stimulated genes (ISGs) และ proinflammatory cytokines ในคน โดยการใช้หนูที่ขาด IFN signaling system ต่างๆกัน พบว่าหนูที่ขาด transcription factor interferon regulatory factor1 (IRF-1) หรือ serine/threonine protein kinase (PKR) จะตอบสนองปกติต่อ imiquimod และหลั่ง circulatory IFN และ ISGs ในระดับสูง แต่ในหนูที่ขาด Signal transducer and activator of transcription reverse transcription-PCR (STAT-1) พบว่าจะมีระดับ circulatory IFN ลดลง 32 เท่า และไม่มีการกระตุ้น 2-5 oligoadenylate synthetase IRF-1 genes และ IL-6 genes แสดงให้เห็นว่า STAT-1 สำคัญ (critical role) ในกลไกการกระตุ้นการแสดงออกของยีน โดยยา imiquimod และการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ IL-6 genes ไม่ขึ้นกับ IFN signaling cascade

ในปี 2000 LARANY และคณะ [35] ทำการศึกษาเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองทางคลินิก (clinical response) กับระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการออกฤทธิ์ของยา imiquimod ก่อนการรักษา (pretreatment or constitutive) โดยทำ RT-PCR วัดระดับการแสดงออกของยีน JAK/STAT Signaling pathways และ IRFs ในชั้นเนื้อที่ตัดก่อนรักษาในกลุ่ม complete responders (99-100% reduction rate) เทียบกับกลุ่ม incomplete responders พบว่ามีการแสดงออกของ mRNA สำหรับ STAT-1 และ IRF-1 สูงในกลุ่ม complete responders ก่อนรักษาด้วย IQ ส่วนในกลุ่ม incomplete responders พบว่ามีการแสดงออกของ mRNA สำหรับ STAT-3, IRF-2 และ protein inhibitor of activated STAT-1 (PIAS-1) จำนวนมากก่อนรักษาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม complete responders จึงอาจสรุปได้ว่า การแสดงออกของ STAT-1 และ IRF-1 ที่สูงจะมีการตอบสนองต่อยา IQ ได้ดีกว่า

และในปี 2004 Jacobs S. et al [36] ได้ศึกษาผลของยา imiquimod ต่อปริมาณ mRNA gene expression ด้วยวิธี RT-PCR และ cDNA microassay hybridization และ ผลของยาต่อปริมาณ viral load ด้วย real-time PCR ใน HPV type 2/27/57 induced common warts โดย mRNA ถูกสกัดจาก keratinocyte culture จาก ผิวหนังปกติ, untreated common warts 3 ชั้น, common warts treated with 5% imiquimod cream วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 6-10 สัปดาห์ จำนวน 3 ชั้น ผลการศึกษาพบว่า ในกลุ่ม HPV infection กระตุ้นให้มีการหลั่ง IL-6, IL-10, IFN- γ และ TGF- β เพิ่มขึ้นมากกว่าในผิวหนังปกติ ส่วน PCTAIRE-3, WNT2B, frizzled-3, notch-2, notch-4 และ BRCA-2 พบทั้งในรอยโรคหูดและผิว

หนังปกติ ในกลุ่มรอยโรคหูดที่ทายา imiquimod พบว่ามีระดับ IL-6, IL-8, GM-CSF, MRP-8 และ MRP-14 สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ายาสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสะสมของ macrophage ในรอยโรคหูดมากขึ้น โดยการดู immunostaining ต่อ CD68 และ ระดับ viral copy ในหูดลดลงภายใน 3 เดือน หลังการรักษา

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ตัว imiquimod เองไม่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อไวรัส (antiviral), ยับยั้งการแบ่งตัว (antiproliferative), ทำลายเซลล์ (cytotoxic) หรือต่อต้านเนื้องอก (antitumor) โดยตรง แต่เชื่อว่ายากระตุ้นให้ร่างกายฆ่าไวรัส หรือเนื้องอกเอง จาก cytokine ที่หลั่งออกมา และจาก cytotoxic T cell [3] แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่แน่ชัดในการกำจัดเชื้อไวรัส ทั้งในการรักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศ และหูดบริเวณผิวหนัง (common warts) รวมไปถึงผลการต่อต้านเนื้องอกในการรักษารอยโรคก่อนมะเร็งชนิด actinic keratoses และมะเร็งผิวหนังชนิด superficial basal cell carcinoma ด้วย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

หูด (Warts)

หูด (Wart or Verrucae) เป็นโรคที่พบได้บ่อยโดยทั่วไป เกิดจากการติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) ทำให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation and hyperplasia) ของผิวหนัง และเยื่อบุผิวหนัง (mucosa) เกิดเป็น ก้อนเนื้อ หรือตุ่มนูนชนิดไม่ร้ายแรง (benign proliferation) ไม่มีอาการ ก้อนโตขึ้นช้าๆ เป็นอยู่นาน เชื้อ HPV บางชนิดที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง (epithelial malignancies) เช่น HPV สายพันธุ์ที่ 16 และ 18 เป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดมะเร็งบริเวณปากมดลูก อวัยวะเพศและทวารหนัก การที่หูดเป็นซ้ำได้บ่อยทั้งที่ผิวหนัง และบริเวณอวัยวะเพศส่งผลต่อจิตใจของผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยต้องเสียเวลาเดินทางมารักษาพบแพทย์บ่อยครั้ง

ระบาดวิทยา (Epidemiology)

หูดจะเกิดขึ้นเฉพาะในมนุษย์ การติดเชื้อ HPV ส่วนมากเกิดโดยสัมผัสเชื้อไวรัสทางตรง (direct contact) กับผู้ที่มีเชื้อทั้งที่มี (clinical infection) และไม่มีอาการ (subclinical infection) หรือสัมผัสเชื้อทางอ้อม ผ่านสิ่งแวดล้อม แหล่งสะสมของเชื้อ เช่น ในสระว่ายน้ำ สนามกีฬาสาธารณะ เป็นต้น

การติดต่อของเชื้อ HPV ขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ ตำแหน่งรอยโรค หรือตำแหน่งที่ได้รับเชื้อ (location of lesions) ปริมาณเชื้อไวรัส (quantity of infectious virus) ลักษณะการสัมผัสเชื้อ (degree and nature of contact) และ สถานะภูมิคุ้มกันทั่วไปและที่จำเพาะต่อ HPV ของผู้ป่วย (general and HPV-specific immunologic status)

ผู้ป่วยที่มีความบกพร่องในภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immunity) เช่น ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV หรือผู้ป่วยเปลี่ยนอวัยวะที่ได้รับการรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกัน ทำให้ติดเชื้อ HPV ได้ง่ายขึ้น คือต่อการรักษา และกลายเป็นเนื้องอก (intraepithelial neoplasia) หรือมะเร็งได้ง่ายนอกจากนี้ยังตรวจพบ HPV DNA ในรอยโรคสะเก็ดเงิน และมะเร็งผิวหนังในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยการฉายแสง PUVA

หูดชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่หูดที่อวัยวะเพศ (Nongenital warts) มักพบในเด็กและผู้ใหญ่ตอนต้น โดยพบประมาณ 10% [37] แตกต่างจากหูดบริเวณอวัยวะเพศ (genital warts) ที่ไม่ค่อยพบในเด็ก (prepuberty children)

หูดที่ผิวหนัง (Cutaneous warts) พบประมาณ 10 % ในเด็กอายุ 2-12 ปี จัดเป็นโรคทางผิวหนังที่พบบ่อยเป็นอันดับที่ 3 ในช่วงอายุนี้ พบในเพศหญิงเท่ากับเพศชาย มักพบในผู้ป่วยที่อาศัยอยู่เป็นครอบครัวใหญ่ ซึ่งส่งผ่านเชื้อกัน โดยการสัมผัสจากบุคคลหนึ่งสู่บุคคลหนึ่ง (person-to-person transmission) โดยส่วนใหญ่หูดสามารถหายได้เอง (spontaneous regression) ภายใน 1-2 ปี การติดเชื้อซ้ำ (reinfection) จากเชื้อ HPV สายพันธุ์เดิมหลังจากที่รอยโรคหายไปแล้ว พบได้น้อย เกิดจากการที่มีภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อสายพันธุ์ (protective type-specific immunity) เกิดขึ้น

หูดบริเวณอวัยวะเพศและทวารหนัก (anogenital warts) จัดเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ (sexual transmitted disease) ในกลุ่มวัยรุ่นหรือผู้ใหญ่ตอนต้น เชื้อหูดชนิด genital-mucosa HPV นอกจากจะทำให้เกิดรอยโรคที่บริเวณอวัยวะเพศภายนอก (external genitalia) แล้ว ยังทำให้เกิดการติดเชื้อที่บริเวณปากมดลูกได้อีกด้วย โดยพบว่าอัตราการอุบัติการณ์ของหูดที่บริเวณปากมดลูกในเพศหญิงมีความแตกต่างกันไปตามแต่ละประเทศ ประมาณ 20-46 % พบมากในหญิงวัยเจริญพันธุ์ที่อายุน้อยกว่า 25 ปี ในในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีผู้ที่ติดเชื้อ HPV 20 ล้านคนโดยประมาณ ณ เวลาหนึ่ง และพบว่าในแต่ละปีจะมีผู้ติดเชื้อใหม่เพิ่มขึ้นประมาณ 5.5 ล้านคน พฤติกรรมเสี่ยงในการติดเชื้อ ได้แก่ การมีเพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุน้อย จำนวนของกลุ่มนอน (the number of lifetime sexual partners) จำนวนคู่ของกลุ่มนอน (the partners number of sexual partners)[38] ความถี่การมีเพศสัมพันธ์ การดื่มแอลกอฮอล์ และการใช้ยาเม็ดคุมกำเนิดเป็นต้น[39] กลุ่มนอนที่มีเชื้อสามารถแพร่เชื้อไวรัสได้สูง [40] รอยโรคหูดบริเวณองคชาติในเพศชายพบได้บ่อยในผู้ชายที่มีเพศสัมพันธ์กับผู้หญิงที่มีเนื้องอกบริเวณปากมดลูก (cervical intraepithelial neoplasia) [41]

การพบหูดบริเวณอวัยวะเพศและทวารหนัก (anogenital warts) ในเด็ก ต้องพึงระวังสาเหตุจากการถูกคุกคามทางเพศ (sexual abuse) ส่วนหูดชนิดเดียวกันที่พบบริเวณทางเดินหายใจส่วนใหญ่ในทารกและเด็ก เกิดจากการติดต่อจากแม่ที่มีการติดเชื้อหูดบริเวณอวัยวะเพศ เด็กสัมผัสและได้รับเชื้อเข้าไปในขณะคลอด [42] ปัจจัยของแม่ที่มีผลต่อการเกิดหูดบริเวณทางเดินหายใจในเด็ก ได้แก่ การตั้งครรภ์ครั้งแรก และมารดาอายุน้อย [43]

หูดในทางเดินหายใจที่เป็นซ้ำบ่อย (recurrent respiratory papillomatosis หรือ RRP) ในผู้ป่วยวัยเด็กตอนโต และวัยรุ่น มีอัตราการอุบัติการณ์ของโรคไม่สูง อยู่ประมาณ 0.4-1.2 ต่อประชากร 100,000 คน แต่นับว่าเป็นเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง (benign tumors) ที่พบบ่อยที่สุดในกล่องเสียง (larynx) และเป็นสาเหตุอันดับสองของอาการเสียงแหบ (hoarseness) ในวัยเด็ก [38]

มีการทดลองทำการตรวจบริเวณปากมดลูกด้วยวิธีหาสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อ HPV พบว่าบริเวณปากมดลูกที่พบสารพันธุกรรมของ HPV ส่วนใหญ่ไม่มีรอยโรคปรากฏ [44] ผิวหนังหรือเยื่อหุ้มผิวหนังที่ดูภายนอกปกติอาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อได้

ส่วนใหญ่การติดเชื้อหูดบริเวณอวัยวะเพศสามารถหายเองได้ โดยการตรวจไม่พบ HPV DNA โดยวิธี PCR ระยะเวลาเฉลี่ยของการติดเชื้อ high risk HPV ในผู้หญิงประมาณ 8 เดือน จากการติดตามต่อพบว่าผู้ติดเชื้อ 30% ยังพบ HPV DNA คงอยู่นาน 1 ปี และ 9% พบเชื้ออยู่นาน 2 ปี [39] การติดเชื้อ high-risk HPV types ซ้ำที่เดิมหลายๆ ครั้งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดความผิดปกติของเซลล์บริเวณปากมดลูก (cervical dysplasia) และมะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) โดยพบเชื้อหูดสายพันธุ์ HPV-16 ประมาณ 50% ในรอยโรคมะเร็งปากมดลูกชนิด high-grade cervical dysplasias และเชื้อหูดสายพันธุ์ HPV-16, 18, 31 และ 45 พบได้ประมาณ 80% ในรอยโรคมะเร็งปากมดลูกทั่วโลก [9]

ไม่พบหลักฐานว่าเชื้อหูดสามารถติดต่อเลือดได้ (hematogenous spread) ประมาณ 60% ของผู้ป่วยที่มีหูดที่บริเวณอวัยวะเพศและทวารหนักมีแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อหูดในปริมาณต่ำระหว่างที่ติดเชื้อหูด ปริมาณแอนติบอดีเหล่านี้จะลดลงอย่างช้าๆ และคงอยู่นานเป็นปีหลังจากเชื้อไวรัสหูดหมดไป ดังนั้นจึงใช้การตรวจคัดกรองหาแอนติบอดีต่อส่วนเปลือกหุ้มไวรัส (capsid of HPV) เพื่อประเมินคุณภาพการติดเชื้อ HPV ในประชากร

สาเหตุ (Etiologic agent)

หูดเกิดจากการติดเชื้อ Human papilloma virus (HPV) จัดอยู่ใน Papovaviridae family ซึ่งประกอบด้วย Papilloma, Polyoma และ Vacuolating virus ไวรัสกลุ่มนี้ตัวเล็ก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 55 nm [46] ไม่มีเปลือกหุ้ม (envelopes) รูปร่างเป็นรูปห้าเหลี่ยมด้านเท่า (icosahedral) มี coiled doubled-stranded DNA โดยเชื้อต้องอาศัยอยู่ในนิวเคลียสของโฮสต์เซลล์เท่านั้นถึงจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ (obligate intranuclear parasite)

คำว่า “Papova virus” ถูกตั้งขึ้นโดย Melnick ในปี ค.ศ.1962 [47] ใช้เรียกกลุ่มของ DNA-containing ether-resistant, oncogenic viruses ขนาดเล็ก ที่มีโครงสร้างทาง electron microscope เหมือนกัน Papillomaviruses ทุกชนิดมีความสามารถในการติดเชื้อในสัตว์ได้จำเพาะแต่ละชนิด (highly host specific) สายพันธุ์หนึ่งของ PV ติดเชื้อในสายพันธุ์ของสัตว์เฉพาะกลุ่ม ไม่ทำให้เกิดโรคในสัตว์สายพันธุ์ (species) อื่น เช่น HPV (human papillomaviruses) ติดเชื้อเฉพาะในคน, papilloma virus of rabbits (Shope papilloma virus), papilloma virus of mice และ papilloma virus of monkey (simian virus40 หรือ SV40) เป็นต้น จึงเป็นเหตุผลหนึ่งซึ่งเป็นข้อจำกัดในการทดลองทางห้องปฏิบัติการ โดยการใส่สัตว์ทดลอง [48]

ขณะนี้เชื้อ HPV ถูกแบ่งออกเป็นชนิด (genotypes) ต่างๆ ตามส่วนประกอบของ DNA โดยมีการตั้งชื่อเชื้อชนิดต่างๆ เป็นหมายเลขตามลำดับการค้นพบก่อนหรือหลัง ในปัจจุบันมี HPV ชนิดต่างๆ ที่ทราบส่วนประกอบของ DNA ทั้งหมดแล้วประมาณ 100 ชนิด [49] และยังมีที่ทราบเพียงบาง

ส่วน (partial DNA sequences) รวมแล้วมีเชื้อทั้งหมดประมาณ 130-150 ชนิด โดยการค้นพบสายพันธุ์ใหม่ของ HPV จะต้องมีความแตกต่างของ DNA sequences ของ HPV genes (E6, E7 และ L1) จากเดิม 10% ถ้ามีความแตกต่าง 2-10% หรือ น้อยกว่า 2% จัดว่าเป็นสายพันธุ์ย่อย (subtypes) หรือ variants ตามลำดับ

สายพันธุ์ของ HPV แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามบริเวณที่พบรอยโรค, ลักษณะทางพยาธิวิทยา และทางชีววิทยา ดังนี้

1. Cutaneous (nongenital) types เช่น HPV-1, -2, -3, -4
2. Genital-mucosal types เช่น HPV-6, -11, -16, -18
3. Epidermodysplasia verruciformis (EV) เช่น HPV-5, -8

Papillomavirus genome มีความยาวประมาณ 8 kb ประกอบด้วยยีนซึ่งควบคุมการสร้างไวรัส (ตารางที่ 1) อยู่ 3 กลุ่ม [50] คือ

1. URR (upstream regulatory region)

มีความยาวประมาณ 1kb ซึ่งประกอบด้วย ส่วนที่ทำหน้าที่เริ่มต้นแบ่งตัว (origin of replication) และ ส่วนที่ควบคุมการ transcription และ replication แต่จะไม่มี open reading frame (ORFs)

2. E (early) genes

มีความยาวประมาณ 4 kb ประกอบด้วย 6 protein coding region ได้แก่ 6 protein coding region คือ E1, E2, E4, E5, E6 และ E7

E1 และ E2 เป็นตัวควบคุม viral genome replication และ expression และสำคัญในการติดเชื้อแบบ permissive infection

E1 protein เป็น phosphoprotein ที่มีขนาด 70-80 kd ประกอบด้วย DNA-dependent adenosine triphosphate และ DNA helicase [51] นอกจากนี้ยังมี DNA-binding domain, E2 protein – binding domain และ catalytic domain ด้วย

E2 protein เป็น phosphoprotein ประกอบด้วย 3 functional domain คือ N-terminal domain, C-terminal domain และ hinge region ที่อยู่ระหว่าง 2 terminal domain โดย N- domain มีขนาด 220 amino acids และทำหน้าที่เป็น transactivator ส่วน C-domain มี 90 amino acids และ dimeric form สามารถจับกับ DNA ได้ โดย E2 มีหน้าที่กีดการ transcription ของ E6 และ E7 โดยไปจับกับ E2 binding site ใน URR [52]

E6, E7 และ E5 สำคัญมากเพราะเป็น transforming genes เป็นตัวก่อให้เกิดมะเร็ง

E4 เป็น late protein เพราะแสดงออกในช่วงท้ายของการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสเกี่ยวข้องกับ การปล่อยเชื้อไวรัส ออกจาก host cell โดยการทำลาย host cell keratin framework [53]

ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน สำหรับการแบ่งตัวของไวรัส (viral replication), transcription control และ cellular transformation โดย E proteins ถูกสร้างออกมาก่อน L proteins และไม่ได้เข้าไปอยู่ใน infectious virus particle เนื่องจาก E gene ไม่ได้ สร้าง DNA polymerase หรือ thymidine kinase ยา Acyclovir จึงใช้ไม่ได้ผลในการรักษาการติดเชื้อไวรัสในกลุ่มนี้

ในผู้ป่วยที่เซลล์กลายเป็นมะเร็ง E1/E2 ratio จะเปลี่ยนแปลง เมื่อไวรัสเข้าไปรวมตัวกับ โครโมโซมของโฮสต์เซลล์ และทำให้การทำงานของ E6 และ E7 transcription ที่ถูกกดอยู่หายไป [53]

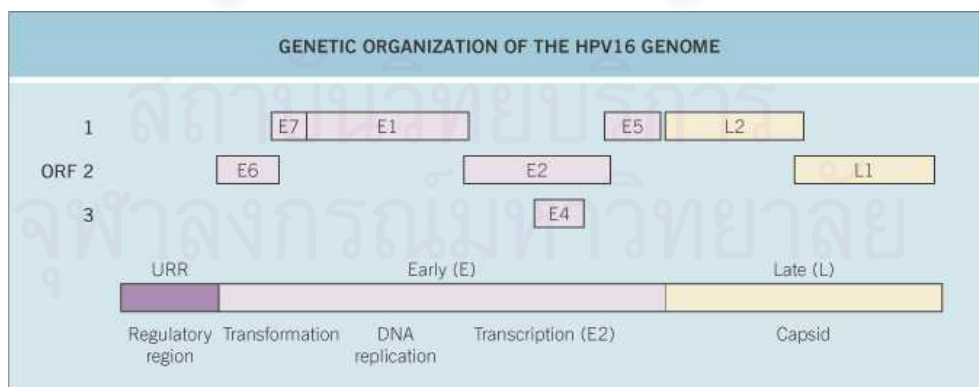
3. L (late) genes

มีความยาวประมาณ 3 kb ประกอบไปด้วย 2 genes คือ L1 และ L2 ซึ่งควบคุมการสร้าง โปรตีนของเปลือกหุ้มไวรัส ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างเชื้อไวรัส [54]

L1 สร้าง major viral capsid protein พบมากประมาณ 95% ไวรัสโปรตีนทั้งหมด

L2 สร้าง minor capsid protein

โดย early gene เป็นตัวควบคุม host cell ให้สร้างเครื่องมือเครื่องมือในการสร้าง HPV specific proteins ต่อเมื่อ host cell เจริญเติบโตขึ้นและมี differentiation แล้ว ส่วน late gene ของไวรัส ก็จะกระตุ้น host cell ให้สร้าง viral capsid protein ขึ้นมารวมเป็นตัว virus-like particle (VLP) ซึ่งมี รูปร่างลักษณะคล้าย native virions เมื่อ host cell เจริญเต็มที่ก็จะปล่อย infectious viral particle ออก มา



© 2003 Elsevier - Bologna, Jorizzo and Rapini: Dermatology - www.dermtext.com

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ genome เชื้อ HPV 16 เป็นรูปวงกลมสายคู่ ที่มีความยาว 7.9 kb

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ HPV กับอาการแสดงทางคลินิก

Clinical manifestation	HPV Frequently Genotypes	Less Frequently Genotypes
<i>Skin lesions</i>		
Common warts	2, 4	26, 27, 29, 41, 57, 60, 63, 65
Plantar warts	1	
Myrmecia warts	63	
Mosaic warts	2	
Pigmented warts	65	
Flat wart	3, 10	28, 29, 41, 49
Butcher's wart	7, 2	1, 3
Extragenital Bowen disease and digital squamous cell carcinoma	16, 34, 35	2, 3, 5, 18, 20, 31, 33, 54, 56, 58, 61, 62, 73
Epidermodysplasia verruciformis (EV)	3, 5, 8	9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36-38, 46, 47, 49, 50, etc.
EV- squamous cell carcinoma	5	8, 14, 17, 20, 47
Keratoacanthoma	37	
Cutaneous squamous cell carcinoma	38, 41, 48	
Cutaneous wart	78	
Common wart in renal allograft recipient	75-77	
<i>Mucosal lesions</i>		
Genital warts (Condyloma acuminata)	6, 11	42-44, 54, 55, 70
Flat condylomata	6, 11, 16, 18, 31	
Bowen disease	6, 11	
Buschke-Löwenstein tumor	6, 11	

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ HPV กับอาการแสดงทางคลินิก

Clinical manifestation	HPV Frequently Genotypes	Less Frequently Genotypes
Intraepithelial neoplasias (vulvar, penile, anal)	16, 18	6, 11, 18, 33
High grade intraepithelial neoplasias (cervical condylomata plana, bowenoid papulosis and erythroplasia of Queyrat)	16, 18	31, 33-35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51-59, 61, 62
Cervical cancer	16, 18 (strong association)	31, 33, 35, 45, 51, 52, 56 (moderate association) 6, 11, 42, 43, 44 (weak association)
Vulvar papillomas	70	
Oral and inverted nasal papillomas	57	
Oral papillomas in HIV	72, 73	
Recurrent respiratory papillomatosis, conjunctival papillomas	6, 11	
Heck's disease (oral focal epithelial hyperplasia)	13, 32	

กลไกการเกิดโรค (Pathogenesis)

การติดเชื้อ HPV เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเข้าไปในชั้นผิวหนังที่มีชีวิต ผ่านทางรอยถลอกที่ผิวหนัง ผิวหนังที่เปื่อยยุ่ย และฉีกขาด (maceration) เป็นปัจจัยการเกิดโรคที่สำคัญ ดังที่พบอุบัติการณ์ของหูดบริเวณฝ่าเท้าสูงขึ้นในผู้ที่ไปว่ายน้ำในสระว่ายน้ำสาธารณะ [55]

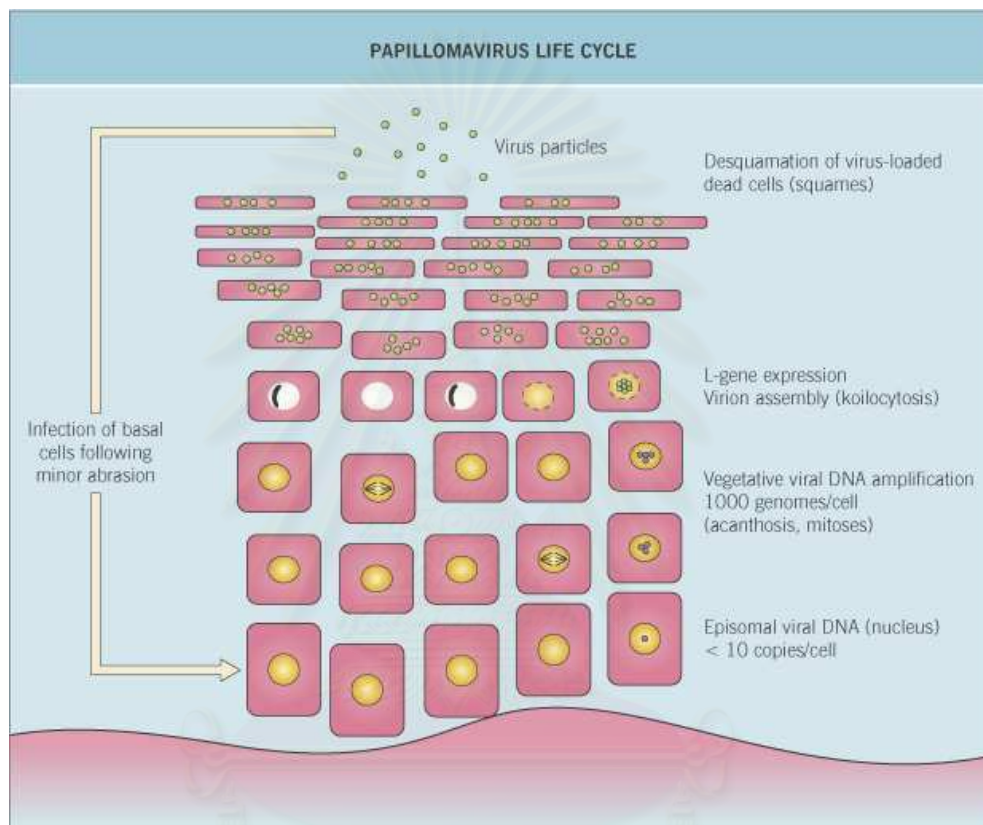
การติดเชื้อ HPV ของโฮสต์เซลล์ ทำให้เกิดผลแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

1. **permissive infection** หมายความว่าไวรัสมีการแบ่งตัวสมบูรณ์ ตาม classic viral productive cycle คือมีการผ่านของไวรัสเข้าเซลล์ (adsorption และ penetration), การแบ่งตัวของไวรัส (transcription), การแปล (translation), การเพิ่มจำนวน DNA (DNA replication) และ การเติบโตขยายขนาด (maturation) จนกระทั่งเป็นตัวไวรัสที่สมบูรณ์โดยไม่มีการขัดจังหวะในการแบ่งตัว
2. **persistent infection** หมายถึงมีการหยุดหรือขัดจังหวะในขบวนการการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส เชื้อไม่สามารถสร้างตัว ไวรัสที่สมบูรณ์เลยเกิดเป็น persistent infection เกิดขึ้น ดังจะพบจากการศึกษาผู้ป่วย cervical intraepithelial neoplasia (CIN) ที่เกิดจากการติดเชื้อ HPV นั้นพบว่า CIN stage II และ III นั้น เชื้อมีการ express early gene เพิ่มขึ้น แต่ express late gene น้อยลงหรือไม่ express เลย [56, 57] จึงทำให้พบแต่ชนิด integrated form ของไวรัสในเนื้อเยื่อมะเร็งเท่านั้น

แม้ว่าปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่าตัวรับ (receptors) ตัวไหนที่เป็นตัวพา HPV เข้าไปในเซลล์ แต่การติดเชื้อ HPV ขึ้นอยู่กับ L1 major และ L2 minor capsid protein และต้องการสารที่อยู่รอบเซลล์คือ heparan sulfate ในการจับกับ virus particles [58] และเชื้ออาจทำให้มีการติดเชื้อบริเวณเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเซลล์ผิวหนัง (epidermal stem cell) เมื่อเซลล์ชั้นล่างมีการแบ่งตัวสารพันธุกรรมของไวรัสจะแบ่งตัวและเข้าไปอยู่ในเซลล์ที่มีการแบ่ง ตัวออกไป และเคลื่อนขึ้นไปสู่ผิวหนังชั้นบนเรื่อยๆ ทำให้เกิดการที่ติดเชื้อเป็นระยะเวลานาน (persistent infection) ในขณะที่มีการติดเชื้อในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวจำกัด ทำให้เกิดการติดเชื้อหูดชั่วคราว (transient infection)

มีการทดลองเพาะเชื้อ papillomavirus ใช้เวลา 2-9 เดือนจึงมีรอยโรคปรากฏ สอดคล้องกับที่ว่าอาจมีการติดเชื้ออยู่เป็นเวลานานก่อนรอยโรคจะปรากฏ แม้ว่าผิวหนังชั้นหนังกำพร้าในรอยโรคหูดหนาตัวขึ้น (acanthosis) เซลล์ชั้นล่างของผิวหนังไม่ได้มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นชัดเจน สอดคล้องกับการมีรอยโรคหูดโตช้าๆ

เมื่อมีการติดเชื้อหูดเกิดขึ้น รอยโรคหูดอาจเกิดขึ้นใช้เวลาเป็นสัปดาห์ถึงเป็นเดือน รอยโรคใหม่ของหูดอาจเกิดจากเพิ่งได้รับเชื้อบริเวณนั้น หรือกระจายมาจากหูดบริเวณอื่น ไม่มีหลักฐานว่าหูดกระจายมาทางกระแสเลือด การเกิด autoinoculation พบบ่อยบริเวณนิ้วที่ติดกันและบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์และทวารหนัก



© 2003 Elsevier - Bologna, Jorizzo and Rapini: Dermatology - www.dermtext.com

รูปที่ 2 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อ papillomavirus เมื่อเซลล์ชั้นล่างที่การติดเชื้อไวรัสมีการแบ่งตัว และเคลื่อนที่สู่ชั้นบน แต่มีบางส่วนที่ยังคงอยู่ชั้นล่าง ทำให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อต่อไป

การสังเคราะห์ของ RNA ไวรัสอยู่ในระดับต่ำเมื่ออยู่บริเวณเซลล์ชั้นล่าง เมื่อเซลล์มาเกือบชั้นบนก่อนถึงชั้น granular layer สารพันธุกรรมของไวรัสมีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้นเป็นร้อย ๆ ชุด ส่วนของโปรตีนที่หุ้มไวรัส (capsid proteins) คือ L1 และ L2 ถูกสร้างและประกอบเป็นชิ้นส่วนของไวรัส (virions) ภายในนิวเคลียส โปรตีนของไวรัส คือ E1 – E4 อาจกระตุ้นให้เกิดการทำลายเครือข่ายเคราตินฟิลาเมนต์ (keratin filaments) ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม

ไวรัสที่เกิดหูดไม่มีเปลือกหุ้ม เพราะไม่ได้แบ่งตัวออกมาจากนิวเคลียสหรือเยื่อหุ้มเซลล์ไวรัส ที่มีเปลือกหุ้มเป็นสารพวก ไลโปโปรตีน (lipoprotein) ถูกทำลายได้ง่ายโดยสถานะของสิ่งแวดล้อม เช่น การแช่แข็ง การทำให้แห้ง หรือสารเคมี ได้แก่ เอทานอล (ethanol) ตรงข้ามกับไวรัสเกิดหูดทนต่อการทำให้แห้ง [59] สาร nonoxynol-9, formalin, sodium dodecyl sulfate หรือ อุณหภูมิสูง ๆ สามารถลดความสามารถในการติดเชื้อ ไวรัสหูดยังคงความสามารถในการติดเชื้อ ได้หลายปีเมื่อเก็บในกลีเซอรอล (glycerol) ที่อุณหภูมิห้อง ยิ่งกว่านั้น L1 และ L2 เป็นโปรตีนที่ประกอบกันแน่นหนา สามารถต้านเอนไซม์ proteases ได้

มีหลักฐานทางการทดลอง พบว่ายีนของ papillomavirus สามารถเปลี่ยนทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น [60, 61] ยีนของไวรัสที่มีผลกับเรื่องนี้ ได้แก่ E5, E6 และ E7 จากการศึกษาในหลอดทดลองการศึกษาหนึ่ง นำสารพันธุกรรมของ HPV-16 หรือ HPV-18 เข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยงของมนุษย์ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ การพัฒนาการของเซลล์มีความผิดปกติและมีความสามารถแบ่งตัวเรื่อยๆ ต่างจากการนำสารพันธุกรรมของ HPV ชนิดที่ 6 หรือ 11 ใส่เข้าไป ดังนั้นเชื้อหูดบริเวณอวัยวะเพศบางชนิดมีความสัมพันธ์อย่างมากในการกระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปและสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง

ในผิวหนังหรือเซลล์บริเวณปากมดลูก เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไม่ดีสัมพันธ์กับทั้ง E6 และ E7 จาก HPV-16 หรือ HPV-18 กลไกหนึ่ง คือ โปรตีน E6 และ E7 จับกับส่วนของโปรตีนที่อยู่ในเซลล์บางชนิด มีผลทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ผิดปกติ ดังเช่น E6 จับกับ โปรตีน p53 และ E7 จับกับ retinoblastoma susceptibility protein (Rb) อย่างไรก็ตาม โปรตีน E6 จากบางสายพันธุ์ของหูด รวมทั้งสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในโรค EV และตัวกดภูมิคุ้มกันไม่ได้ผ่าน ทาง p53 หลาย ๆ การทดลองแสดงให้เห็นว่า E6 และ E7 มีหลายเป้าหมายในเซลล์ การเป็นหูดลดลง ในอายุที่มากขึ้น อาจบอกได้ว่าการต่อต้านการติดเชื้อต้องอาศัยเวลาและอาจเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cellular mediated immune response) มีบทบาทสำคัญที่สุดในการหายของหูด

ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อหูด (Host immune response)

พบว่าเป็นการยากที่จะศึกษาเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันทั้งแบบเฉพาะที่ (local) และทั่วร่างกาย (systemic immune response) อาจเป็นเพราะหลายเหตุผล ดังนี้

1. ไม่ทราบการจุดเริ่มต้นของการติดเชื้อ จึงทำให้ไม่ทราบถึงภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในช่วงแรกได้
2. มีเชื้อหลายสายพันธุ์ ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันข้ามสายพันธุ์หรือไม่ก็ได้

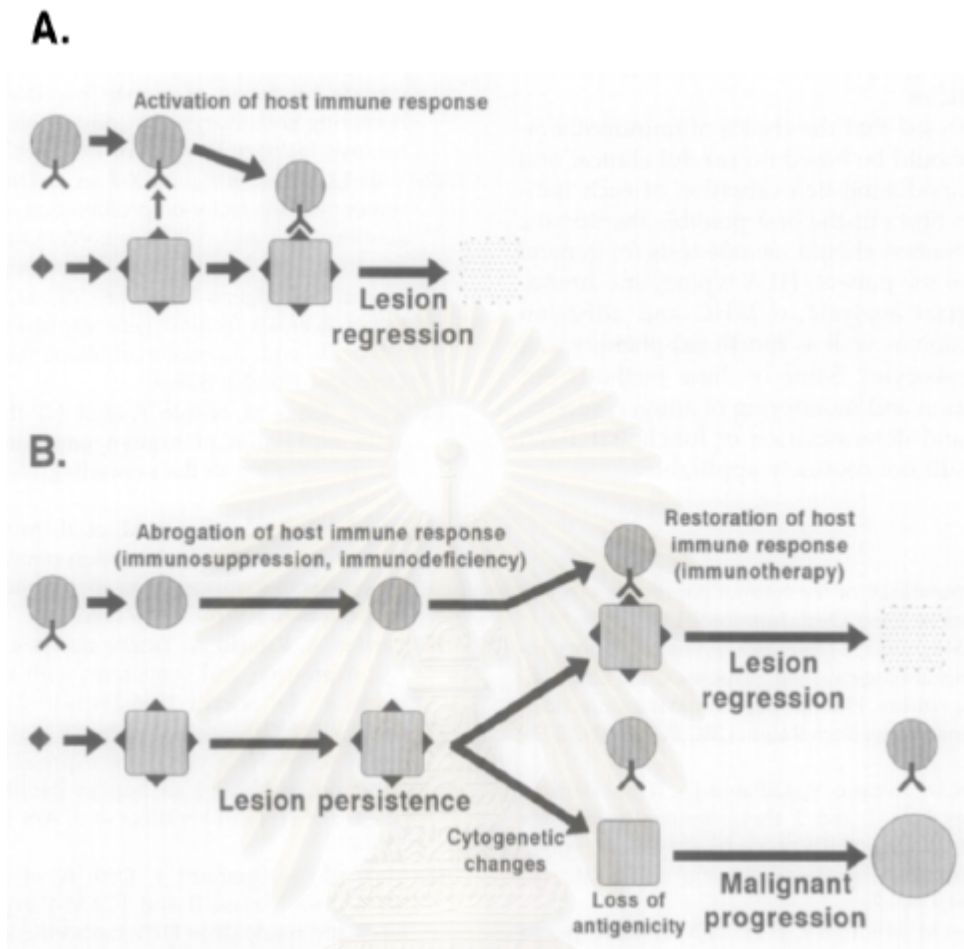
3. การติดเชื้ออาจทำให้เกิดอาการทางคลินิกได้หลากหลาย หรือไม่ทำให้เกิดอาการเลยก็ได้ (subclinical infection)
4. ภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (dynamic) จึงเป็นการยากที่จะแยกแยะที่มีการติดเชื้อไม่นานมานี้ (recent HPV exposure) กับการติดเชื้อเป็นระยะเวลานาน (persistent exposure) ได้

มีหลายการศึกษาวินิจฉัยที่ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของภูมิคุ้มกันชนิดฟั้งเซลล์ในการกำจัดเชื้อไวรัส HPV โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีความบกพร่องของภูมิคุ้มกันชนิดฟั้งเซลล์ ไม่ว่าจะเกิดแต่กำเนิด หรือว่าเป็นสาเหตุมาจากยา, เนื้องอก หรือมะเร็ง และการติดเชื้อ HIV ทำให้เกิดรอยโรคหูดที่รุนแรง และยากต่อการรักษา ในทางตรงกันข้ามในผู้ป่วยที่มีความบกพร่องของภูมิคุ้มกันชนิดน้ำ (Humeral immune response) หรือบกพร่องในการสร้าง antibody จะไม่เกิดการติดเชื้อหูดที่รุนแรง และ ยาวนาน

โดยส่วนใหญ่ผู้ป่วยอาจมีการติดเชื้อ HPV และเกิดรอยโรคได้นานหลายปี เนื่องจากรอยโรคอาจไม่ถูกรับรู้โดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายรอยโรคจึงไม่ถูกกำจัดออกไป การที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายกำจัดรอยโรคไม่ได้เนื่องจาก [38]

1. HPV ไม่ใช่ตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดี โดยเชื้อไม่ทำให้เกิดการแตกของเซลล์ในชั้นล่าง ดังนั้นจึงมี HPV protein เพียงเล็กน้อยที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งทำให้ไม่สามารถถูกตรวจจับจาก Langerhans cells และ lymphocyte ที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น
2. HPV ทำให้เกิดการติดเชื้อที่เซลล์ของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (keratinocytes) และเซลล์นี้เป็น antigen presenting cells ที่ไม่ดีเพราะขาด costimulatory molecules คือ CD 80 และ CD 86 ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้ทำหน้าที่กระตุ้น T cells กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต่อไป
3. HPV ไม่ได้ทำให้เกิดไวรัสเข้ากระแสเลือด (viremic phase) และการติดเชื้ออยู่ในระดับชั้นหนังกำพร้า ซึ่งเป็นชั้นที่ระบบเลือดเข้ามาเลี้ยงจำกัด ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั่วร่างกาย (systemic immune response)
4. HPV อาจลดการสร้าง interferon (IFN) โดยผ่านทาง STAT-1 เนื่องจาก STAT-1 มีบทบาทสำคัญในการสร้างและตอบสนองของ IFN มีรายงาน high oncogenicrisk HPV 31 สามารถกด STAT-1 [39]

ซึ่งพบว่าความสามารถของเชื้อในการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของผิวหนัง (skin immune system) จะสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อให้เกิดมะเร็งของเชื้อ HPV สายพันธุ์นั้นๆ [62]



รูปที่ 3 แสดงบทบาทของ ภูมิคุ้มกันในการต่อต้านเชื้อ HPV ในรอยโรคหูดที่มีการหายเอง และรอยโรคหูดที่คงอยู่นาน (regression and persistence of HPV-associated lesions)

A: มีการเหนี่ยวนำให้เกิดภูมิคุ้มกันที่เฉพาะเจาะจง ทำให้เกิดการหายได้เองของรอยโรคหูด

B: มีความผิดปกติของภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ทำให้ไม่สามารถกำจัดเซลล์ที่มีเชื้อไวรัส (HPV-harboring cells) ได้ และเกิดเป็นรอยโรคที่เป็นอยู่นาน (persistence) และการที่มีการขาด antigenicity ของ HPV-harboring cells เหล่านี้ก็นำไปสู่การเกิดเนื้องอก และมะเร็งได้ต่อมา (tumor growth and malignant progression)

ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อหูดเฉพาะที่ (Local immunity)

เนื่องจากการติดเชื้อ HPV จะไม่กระจายไปจากผิวหนังบริเวณแรกที่เชื้อเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้น ภูมิคุ้มกันชนิดปฐมภูมิ (innate immune response) จึงเป็นด่านแรกในการต่อต้านเชื้อ โดยพบว่า ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อหูดประกอบด้วย [62, 63]

1. Epidermal langerhans cell ซึ่งทำหน้าที่เป็น Antigen presenting cell มีจำนวน [64] และมีความสามารถในการกระตุ้นต่อ T cells ลดลง [63] นอกจากนี้ LC ยังถูกกระตุ้นน้อยลงด้วยเนื่องจาก HPV antigen และ inflammatory signals ต่างๆ ถูกปล่อยออกมาจาก HPV infected keratinocytes อย่างจำกัด
2. Keratinocyte มีการแสดงออกของ human leukocyte antigen (HLA)-DR+ และ ICAM-1 มากขึ้น แต่ไม่พบ co-stimulation molecules [65]
3. มีการแสดงออกของ intraepithelial ICAM-1 และ lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 มากขึ้น
4. มีการยับยั้งของ IFN activity ทั้ง IFN- α และ - β รวมไปถึง IFN-responsive genes ส่งผลให้ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อไวรัส, ไม่มีการกระตุ้นการแสดงออกของ MHC class I และ NK cell
5. มีการลดลงของการแสดงออกของ MHC class I และ II ทำให้ไม่มีการกระตุ้นการทำงานของ cytotoxic T cell activity และ ขาดการนำเสนอแอนติเจนต่อ CD4+ T cells ตามลำดับ
6. มีการลดลงของ IL-18 ทำให้ไม่มีการกระตุ้นต่อ Th1 และ NK cell ผ่าน IFN- γ

โดยพบว่าการที่มีการแสดงออกของ HLA-DR มากขึ้นในชั้น epidermis รวมไปถึง ICAM-1 และ adhesion molecules ต่างๆ ส่งผลให้มีการเข้ามาของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte มากขึ้น ซึ่งจะส่งเสริมให้มีการนำเสนอแอนติเจนต่อ CD4+ T cells ในบริเวณนั้น ทำให้สามารถกำจัดการติดเชื้อไวรัสได้

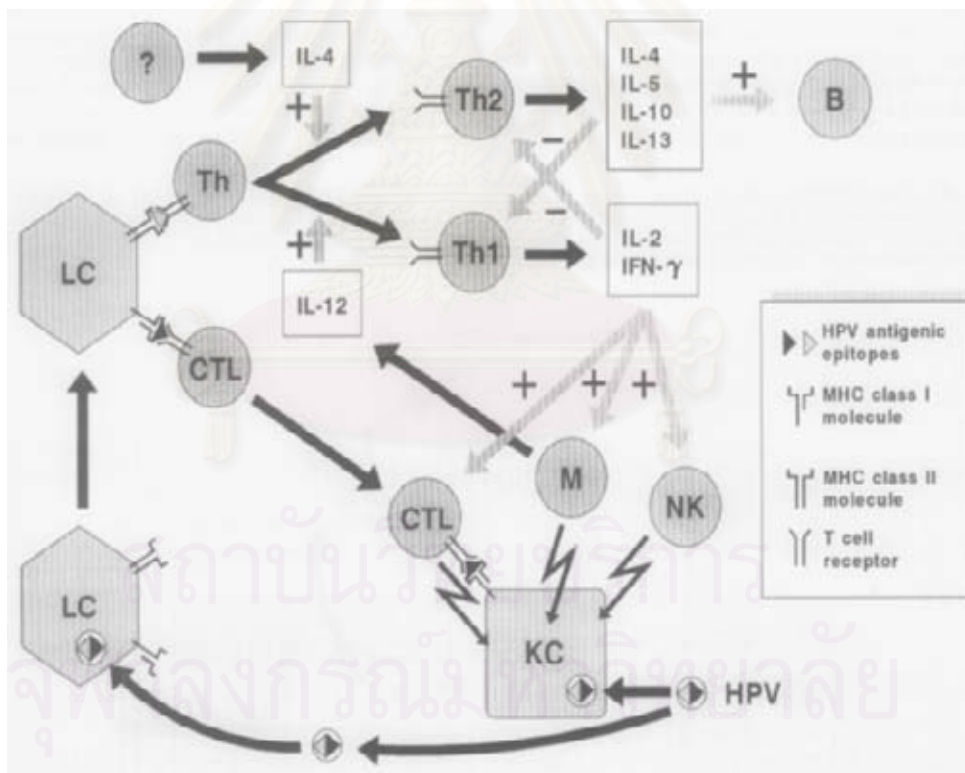
จากการศึกษาถึงระดับการแสดงออกของยีนสำหรับ cytokines ต่างๆ พบว่ามีเฉพาะ IL-10 mRNA ที่มีปริมาณลดลงในหูด ในขณะที่ IL-1 α รวมไปถึง amphiregulin เพิ่มขึ้น โดยในหูดบริเวณอวัยวะเพศชนิด condyloma acuminata ที่เกิดจากเชื้อ HPV ชนิดที่ 6 และ 11 จะมีระดับ mRNA สำหรับ TNF- α , TGF- β 1 รวมไปถึง IFN- γ , IL-1 α และ IL-1 β ลดลง แต่ในหูดชนิด EV กลับพบมีระดับ TNF- α และ TGF- β 1 เพิ่มมากขึ้น การติดเชื้อหูด นอกจากนี้ในหูดบริเวณอวัยวะเพศชนิด condyloma acuminata ระดับ mRNA สำหรับ growth-inhibitory products เช่น p53 ลดลง แต่มี growth-stimulating products เพิ่มขึ้น [66] โดยการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้มี keratinocyte proliferation โดยไม่มี differentiation

การหายเองของหูด (Regression)

ถึงแม้ว่าเชื้อไวรัสหูดจะมีกลยุทธ์ในการบุกรุกภูมิคุ้มกันของร่างกายโฮสต์ แต่พบว่าประมาณ 20-30% ของผู้ป่วย รอยโรคหูดสามารถหายไปตัวเอง (spontaneous regression) ภายใน 2 ปี และแม้แต่

รอยโรคที่มีอยู่หลายบริเวณในร่างกาย (multifocal infections) ก็สามารถหายไปตัวเองพร้อมๆ กัน โดยการหายเองของหูดนั้นต้องอาศัยการกระตุ้นจาก viral proteins หรือ epitopes ต่อระบบภูมิคุ้มกันเป็นสำคัญ โดยพบว่าการหายเอง หรือการไม่กลับเป็นซ้ำของหูดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ในผู้ป่วยที่มีหูดหลายตำแหน่ง การรักษาให้หูดหายหนึ่งตำแหน่ง ส่งผลทำให้เกิดการหายของหูดในตำแหน่งที่เหลือได้ด้วย ซึ่งอาจเกิดจากการที่แอนติเจนของไวรัส หรือ ตัวไวรัสเองที่หลุดออกมาจากรอยโรคหูดที่ถูกรักษา สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อหูดชนิด common warts กำลังหาย จะพบว่าไม่มีเม็ดเลือดขาว, มาโครฟาจ เข้ามายังบริเวณรอยโรคมากขึ้น และเซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) มีการเกิด cytopathic effects โดยพบว่าหูดชนิดราบ (plane warts) หายเองได้เร็วกว่าหูดชนิดอื่นๆ โดยพบว่าการเข้ามาของเม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cells) ซึ่งแสดงออกเป็นชนิด CD4+ ในชั้นหนังแท้มากขึ้น [67]



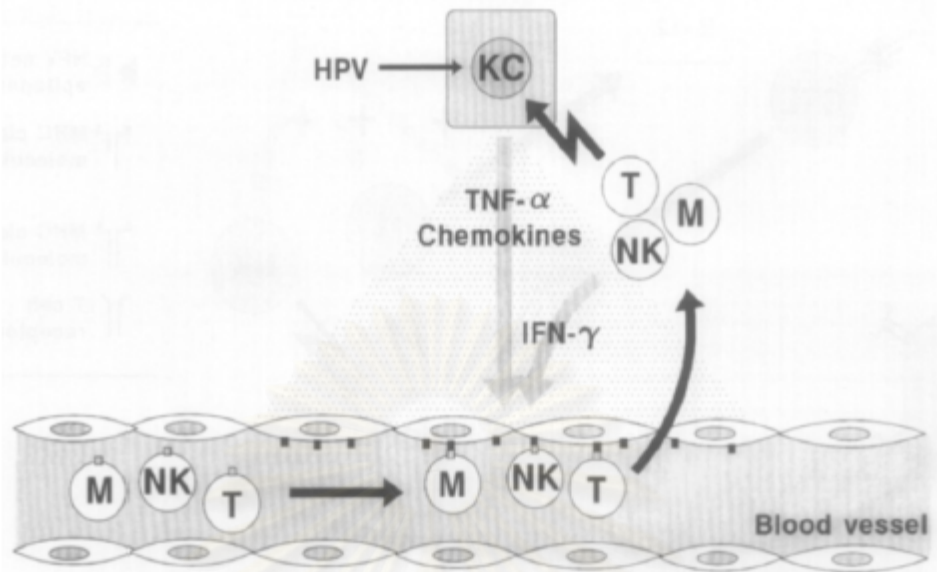
รูปที่ 4 แสดงการกระตุ้นต่อ T-cells และ regulatory pathways ของภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ในการต่อต้านเชื้อไวรัส (anti-HPV cell-mediated immune response) KC, keratinocyte; LC, Langerhans cell; Th, T helper cell; CTL, cytotoxic T cell; M, macrophage; NK, natural killer cell.

จากการศึกษาของ Coleman และคณะ [10] พบว่าภูมิคุ้มกันชนิดฟั้งเซลล์เป็นกลไกหลักในการหายเองของหูด โดยพบมีการเข้ามาของ T cells และมาโครฟาจ โดยอัตราส่วนของ CD4+/CD8+ T cells ในชั้นหนังกำพร้า และใน stroma เท่ากับ 1: 0.9 ในขณะที่หูดที่ไม่หาย (nonregressing warts) อัตราส่วนเท่ากับ 1: 1.5 นอกจากนี้ยังพบมีการแสดงออกของ CD25 บน T cell, HLA-DR และ ICAM-1 บน keratinocyte และ E-selectin และ VCAM-1 บน endothelial cells มากขึ้นด้วย โดยการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จัดว่าเป็นปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันไวเกินชนิดที่ 4 (delay type hypersensitivity (DTH) response)

อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบว่าจะปัจจัยใดที่ทำให้เกิดการหายเองของหูด แต่เชื่อว่า keratinocyte ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง cytokine environment ในบริเวณที่มีการติดเชื้อ ทำให้เกิดการกระตุ้นต่อเซลล์ที่ทำหน้าที่กำจัดเชื้อไวรัส (immune effector cells) และ langerhans cells และผลที่ตามมาจะเกิดมีการกระตุ้นต่อ local dendritic cells ทำให้เกิดการเข้ามาของ homing HPV-specific CD4+ และ CD8+ T cells รวมไปถึงการผลิตแอนติบอดีจาก B cells ที่อยู่บริเวณรอยโรคด้วย [68]

ในการสนับสนุนทฤษฎีนี้ พบว่ายาอิมมิควิมอด เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้น ใช้รักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศ มีผลกระตุ้นการทำงานของ proinflammatory cytokines หลายตัว โดยเฉพาะ IFN- α , IL-6 และ IL-8 จาก keratinocytes [69] และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจ และมีผลต่อ LC ทำให้มีการเคลื่อนที่ และกระตุ้นไปทาง Th1 cytokines เช่น IL-12 รวมไปถึงมีผลเพิ่มจำนวนของ T cell ที่เข้ามายังรอยโรคด้วย

เม็ดเลือดขาวชนิด intraepithelial memory T lymphocytes ที่ถูกสร้างขึ้นอันเนื่องมาจากการติดเชื้อ HPV เป็นตัวหลักที่ทำให้ไม่เกิดการกลับเป็นซ้ำของหูด (resistance to reinfection) [68] โดยพบว่า memory Th response ต่อ HPV-16 E2 และ E4 โดยการตรวจด้วยวิธี IFN- γ ELISPOT assay แต่ในคนปกติส่วนมากไม่พบมีการตอบสนองนี้ [70] ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า peripheral blood memory T cells ผลิต IFN- γ ในการตอบสนองต่อ nonstructural HPV-16 protein ซึ่งเป็นตัวหลักในการป้องกันการติดเชื้อเป็นระยะเวลานาน (persistent infection) และการก่อให้เกิดมะเร็ง (HPV-associated malignancies)



รูปที่ 5 แสดงการเคลื่อนที่ของเซลล์ปฏิบัติการ (Recruitment of effector cells) ไปยังตำแหน่งที่มีการติดเชื้อ HPV และทำให้รอยโรคหูดหาย (regression) โดยการเรียกเซลล์ปฏิบัติการนั้นอาศัยสาร TNF- α และเคโมไคน์ (chemokines) ต่างๆ ที่หลั่งออกมาจากเซลล์หนังกำพร้าที่ติดเชื้อ (HPV-infected keratinocytes) ทำให้เกิดการแสดงออกของ adhesion molecule และ chemokine บน endothelial cells และ circulating effector cells ทำให้เกิดการต่อต้านเชื้อไวรัสในที่สุด (anti-HPV reaction) KC, keratinocyte; T, T cell; M, macrophage; NK, natural killer cell.

ลักษณะอาการที่ปรากฏ (Clinical manifestations)

หูดแบ่งได้หลายแบบ แต่ที่นิยมมักแบ่งตามตำแหน่งรอยโรคและลักษณะรอยโรคหูด ในที่นี้แบ่งหูดเป็น

1. หูดบริเวณผิวหนัง (cutaneous and muco-cutaneous infections)
2. หูดเกิดบริเวณอื่นที่ไม่ใช่ผิวหนัง (extracutaneous infections)

1. หูดบริเวณผิวหนัง มีหลายชนิด ได้แก่

1. หูดธรรมดา (common warts หรือ verruca vulgaris)

หูดธรรมดาชนิดที่พบบ่อย ลักษณะเป็นตุ่มนูนแข็ง ผิวหยาบขรุขระ มีสะเก็ด สีผิวหนังหรือสีดำ ขนาด 2-3 มิลลิเมตร ถึงหลายเซนติเมตร พบได้ทุกตำแหน่งบนผิวหนัง มักพบเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่มบริเวณมือและนิ้วมือ พบประมาณร้อยละ 70 ของหูดที่พบบริเวณผิวหนัง [1] (รูปที่ 6-9)



รูปที่ 6 แสดงรอยโรคหูดชนิด common warts ที่นิ้วมือ



รูปที่ 7 แสดงรอยโรคหูดชนิด common warts บริเวณ โคนนิ้วมือ



รูปที่ 8 แสดงรอยโรคหูดชนิด common warts ขนาดใหญ่ บริเวณหลังนิ้วเท้า



รูปที่ 9 แสดงรอยโรคหูดชนิด periungual warts ของนิ้วชี้

2. หูดผิวเรียบ (flat warts หรือ verruca plana)

ลักษณะเป็นตุ่มแบน ค่อนข้างเรียบ หรือนูนเล็กน้อย มีสะเก็ดบางๆ พบบ่อยบริเวณหน้า, มือ และเท้าส่วนล่าง อาจมีจำนวนมาก บางครั้งดูยากต้องอาศัยลักษณะที่เรียก Koebner phenomenon คือ เม็ดหูดเรียงเป็นแถวตามรอยขีดข่วน หูดชนิดนี้อาจคล้าย Lichen planus ระยะแรกๆ และเนื้องอกผิวหนัง เช่น Syringoma และ trichoepithelioma

3. ชนิด plantar and palmar warts

หูดหนาแข็ง อาจเจ็บเมื่อมีการกดทับ อยู่บริเวณฝ่ามือ ฝ่าเท้า (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงรอยโรคหูดชนิด plantar warts บริเวณนิ้วโป้งเท้า

4. ชนิด mosaic warts

เกิดจากการรวมกันของหูดบริเวณฝ่ามือหรือฝ่าเท้า ทำให้เกิดรอยโรคหูดเป็นปื้นใหญ่ขึ้น

5. ชนิด Butcher's warts

ตุ่มนูนขรุขระ มักมีหลายตุ่ม พบบนหลังมือหรือรอบเล็บและนิ้วมือของคนขายเนื้อ

6. ชนิด anogenital warts

ฝั่มมีขนาดต่างๆกัน โดยมากประมาณ 1-10 mm อาจเป็นตุ่มเดี่ยวหรือหลายตุ่ม ส่วนมากมีประมาณ 5-15 ตุ่ม สีของฝั่มมีความแตกต่างกันตั้งแต่สีชมพู แดงส้มในบริเวณ non-keratinised สีเทาขาวบริเวณ keratinised จนกระทั่งเป็นสีดำ โดยเฉพาะบริเวณ pigmented skin เช่น labia majora, penile shaft, pubis, groin, perinium และ anal area ฝั่มของ anogenital wart มักเกิดบริเวณที่ถูก

กระทบกระทั่งเวลาร่วมเพศ ในผู้ชาย uncircumcised พบบ่อยที่ preputial cavity เช่น glans penis, coronal sulcus, frenulum, inner aspect of the foreskin แต่ในผู้ชาย circumcised พบบ่อยแถว shaft ของ penis นอกจากนี้ทั้ง 2 กลุ่มยังพบได้ที่แถว scrotum, groin และ perinium ในผู้หญิงพบบ่อยแถว fourchette, labia minora, labia majora และ clitoris หูดอาจเข้าไปในบริเวณอวัยวะภายใน เช่น ช่องคลอด (vagina), ปากมดลูก (ectocervix), ท่อทางเดินปัสสาวะ และทางเปิด (urethral meatus) และ บริเวณรอบ ๆ ทวารหนัก (anal region) (รูปที่ 11-12)



© 2003 Elsevier - Bologna, Jorizzo and Rapini; Dermatology - www.dermtext.com

รูปที่ 11 แสดงรอยโรคหูดชนิด condyloma acuminata หรือ perianal warts
บริเวณรอบทวารหนัก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



© Elsevier Ltd 2005. McKee et al.: Pathology of the Skin with Clinical Correlations 3e

รูปที่ 12 แสดงรอยโรคหูดชนิด condyloma acuminata บริเวณ penis

7. Urethral meatal wart

พบได้ 20-25% ในผู้ชาย และ 4-8% ในผู้หญิง [71] หูดโรคนี้อยู่ใน urethral meatus ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ low-risk oncogenic HPV

8. Intraanal wart

เกิดขึ้นภายใน anus แต่มักอยู่ proximal ต่อ dentate line พบได้ทั้งในผู้หญิงและผู้ชายที่ร่วมเพศทางทวารหนัก เชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิด anal และ rectal squamous cell carcinoma [72]

9. Intraepithelial neoplasia [73]

ประกอบด้วยโรค Bowenoid papulosis, Bowen's disease, and Erythroplasia of Queyrat ทั้ง 3 โรคนี้อีกมีลักษณะทาง histopathology คล้ายกันคือมี dysplastic changes ใน epidermis เชื่อว่ามีความสัมพันธ์กับ high-risk oncogenic HPV โดยเฉพาะ type 16 แต่ลักษณะทางคลินิกต่างกัน คือ Bowenoid papulosis มีลักษณะเป็นตุ่ม ผิวขรุขระเล็กน้อย สีแตกต่างกันแล้วแต่บริเวณที่เป็นถ้าเป็นแถว mucous membrane สีจะออกน้ำตาลหรือแดงส้มๆ แต่ถ้าเป็นบนผิวหนังด้านนอกจะมีสีดำหรือน้ำตาลดำ bowen's disease และ erythroplasia of Queyrat เชื่อว่าเป็นโรคเดียวกัน พบในผู้ป่วยสูงอายุ มีลักษณะเป็นผื่นแดง ผิวเรียบมันหรือเป็นผื่นแดงมีสะเก็ดลอกหรือสะเก็ดขาวติดอยู่

โรค bowenoid papulosis มีลักษณะเป็นตุ่มขนาด 2-3 มิลลิเมตร มักมีหลายตุ่ม บริเวณอวัยวะเพศ ผลพยาธิวิทยามีเซลล์ผิดปกติคล้าย bowen's disease หรือ squamous cell carcinoma in situ

รอยโรคเหล่านี้มักเกิดจากการติดเชื้อ HPV-16 ดังนั้นรอยโรคเหล่านี้อาจนำไปสู่มะเร็งบริเวณองคชาติ และมะเร็งอวัยวะเพศหญิง อย่างไรก็ตามอัตราการกลายเป็นมะเร็งต่ำมากสำหรับมะเร็งบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกต่างจากมะเร็งปากมดลูก รอยโรคเล็กๆ เหล่านี้ควรรักษาเพราะอาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อ

10. Giant condyloma (Buschke-Loewenstein tumor)

เกิดจาก low-risk oncogenic HPV โดยเฉพาะ type 6 และ 11 มีลักษณะเจริญลุกลงไปใน dermis เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ควรทำ Biopsy หลายๆ ครั้งเพราะว่าอาจมี foci ของ atypical epithelial cells หรือ well differentiate squamous cell carcinoma ร่วมด้วย [75]

11. ชนิด epidermodysplasia verruciformis

มักพบในเด็กและกระจายทั่วตัว ลักษณะรอยโรค มี 2 แบบ

- 11.1. คล้ายหูดชนิดแบนราบ (flat warts) มักเกิดการติดเชื้อของ HPV สายพันธุ์เดียวกับหูดชนิดแบนราบทั่ว ๆ ไป เช่น HPV-3 , HPV-10



© Elsevier Ltd 2005. McKee et al.: Pathology of the Skin with Clinical Correlations 3e

รูปที่ 13 แสดงรอยโรคหูดชนิด epidermodysplasia verruciformis บริเวณหลังมือ

- 11.2. คล้ายเกลื้อน (tinea versicolor) หรือผื่นดอกกุหลาบ (pityriasis rosea) มักเกิดการติดเชื้อ HPV สายพันธุ์ EV เช่น HPV-5, HPV-8

ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการติดเชื้อของ HPV หลายสายพันธุ์ในคนคนเดียว การวินิจฉัยโรคนี้เกิดขึ้นเมื่อมีหูดกระจายทั่วตัวหรือรักษาหูดไม่หาย แม้ว่าได้รับการรักษาที่เหมาะสมประมาณร้อยละ 50 ของผู้ป่วยมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็น autosomal recessive pattern มีรายงานถ่ายทอดแบบ X-link [75]

2. หูดเกิดบริเวณอื่นที่ไม่ใช่ผิวหนัง ได้แก่

1. ชนิด oral warts

ลักษณะตุ่มขนาดเล็ก ก่อนข้างนูน นิ่ม สีชมพูหรือขาว อาจพบบริเวณเยื่อบุผิวข้างแก้ม, เหงือก, ลิ้น, เพดานปาก [76]

2. ชนิด oral florid papillomatosis

ลักษณะก้อนใหญ่ผิวขรุขระภายในช่องปาก อาจกลายเป็นมะเร็ง (verrucous carcinoma) ได้

3. หูดหงอนไก่(oral condylomata acuminata)

ติดตามจากการสัมผัสสอวัยะเพศ สามารถเกิดในท่อทางเดินปัสสาวะได้ อาจกระจายเข้ากระเพาะปัสสาวะ

4. ชนิด respiratory (laryngeal) papillomatosis

มีรอยโรคจำนวนมากบริเวณกล่องเสียงอาจลามขึ้นไปในช่องคอ (oropharynx) หรือหลอดลม (bronchopulmonary epithelia) ผู้ป่วยมักมาพบแพทย์ด้วยอาการเสียงแหบ และหายใจลำบาก (stridor) มักพบเด็กทารกติดจากแม่ที่เป็นหูดหงอนไก่ระหว่างการคลอด

ความสัมพันธ์ของ papillomaviruses กับการเกิดมะเร็ง

สายพันธุ์หูดส่วนใหญ่เป็นลักษณะเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง แต่หูดบางสายพันธุ์มีความสัมพันธ์กับการกลายเป็นเซลล์มะเร็ง [77, 78] แต่ละชนิดมีความสามารถในการทำให้เกิดมะเร็งต่างกัน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆคือ

1. Low Risk ได้แก่ HPV type 6, 11, 40, 42-44, 61
2. Intermediate Risk ได้แก่ HPV type 30, 33, 35, 39, 45, 51-53, 56, 58
3. High risk ได้แก่ HPV type 16, 18, 31

papillomaviruses ไม่ได้กระตุ้นกลายเป็นมะเร็งโดยตรง แต่เป็นปัจจัยหนึ่งในการเปลี่ยนเซลล์ที่มีการติดเชื้อกลายเป็นเซลล์มะเร็ง อาจต้องมีปัจจัยอื่นร่วมด้วยนอกจากสายพันธุ์หูด เช่น แสงแดด , ภูมิคุ้มกันของร่างกาย

มะเร็งชนิด squamous cell carcinoma (SCC) ใน EV เป็นเชื้อหูดสายพันธุ์ HPV-5 , HPV-8 และมักเกิดบริเวณ โคนแสงแดด หูดบริเวณทางเดินหายใจ (respiratory papillomatosis) กลายเป็นมะเร็งชนิด SCC ภายหลังได้รับการฉายแสง ผู้ป่วยที่มีความบกพร่องภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ เช่น ผ่าตัดเปลี่ยนไต , โรคมะเร็ง มักมีรอยโรคของการติดเชื้อ HPV ที่กลายเป็นเนื้อร้าย (severe dysplasia and cancer) [79, 80]

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของหูดชนิด common warts (Histopathology)

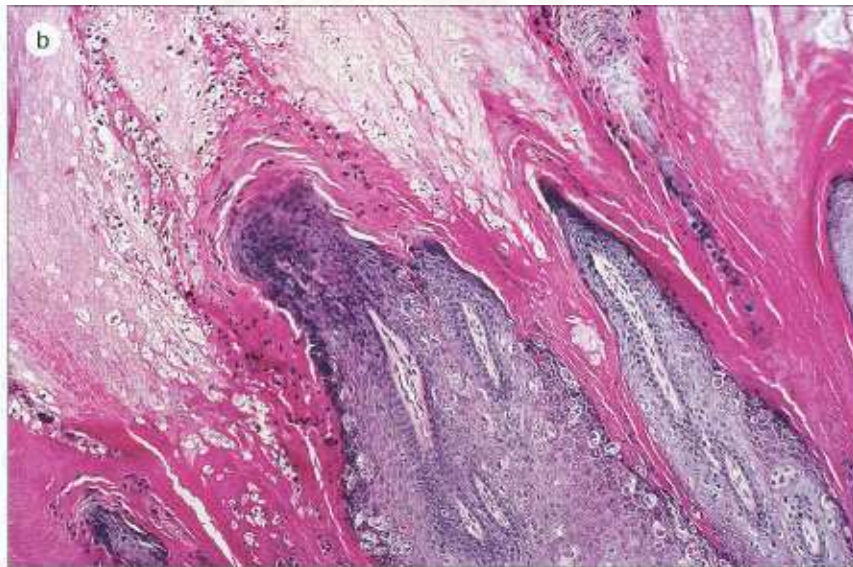
ชั้นเคราตินและหนังกำพร้าหนาตัวมากขึ้นสูงขึ้นเหนือระดับผิวหนังปกติ ในชั้นเคราตินจะมี parakeratosis ซ้อนขึ้นไปเป็นแถว (tier of parakeratosis) บนยอดของหนังกำพร้าที่มี papillomatosis โดยที่หนังกำพร้าส่วนนี้จะมีชั้น granular ลดลง ในขณะที่ส่วนที่เป็นหลืบ และหว่าของหนังกำพร้าจะมีชั้น granular หนาขึ้น ร่วมกับมีความผิดปกติของ keratohyaline granule ที่มีขนาดใหญ่หยาบ ขนาดของ granule ไม่เท่ากัน และมีเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสอยู่กลาง มีซัยโตพลาสซึมใสเหมือนมีช่องว่างล้อมรอบนิวเคลียส (vacuolated cell หรือ koilocyte) แทรกอยู่ในบริเวณนี้ ในส่วนของ papillary dermis ซึ่งยื่นสูงขึ้นไปตามลักษณะที่เป็น papillomatosis ของหนังกำพร้าจะมีหลอดเลือดที่ขยายตัวไปงออยู่ ลักษณะเช่นนี้ ทำให้เมื่อใช้ใบมีดฝานที่ผิวของหูดให้ลึกพอจะมีเลือดออกเป็นจุดๆ ต่างจากตาปลาที่ฝานแล้วไม่มีเลือดออก เนื่องจากส่วนที่หนาตัวขึ้น เป็นชั้นเคราตินอย่างเดียวไม่มีส่วนยอดของ dermal papilla ที่ยื่นสูงขึ้นไปด้วย [81] (รูปที่ 14-16)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



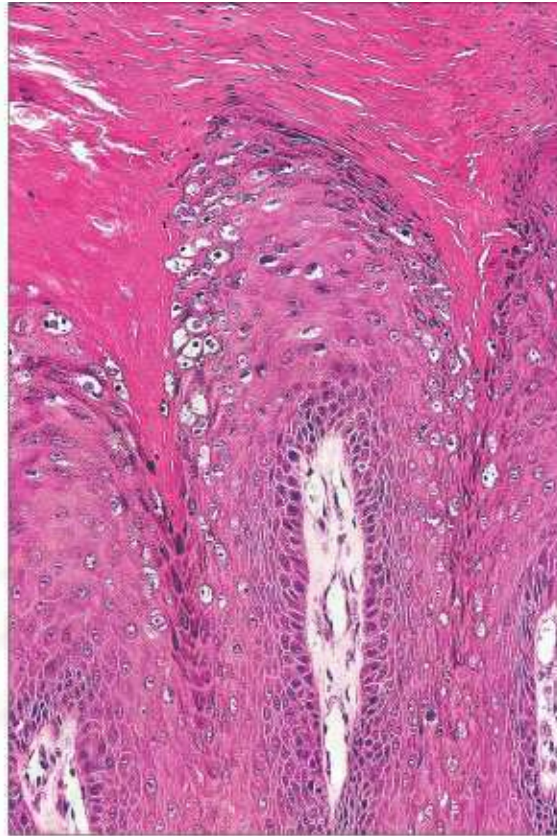
© Elsevier Ltd 2005. McKee et al.: Pathology of the Skin with Clinical Correlations 3e

รูปที่ 14 แสดงพยาธิวิทยาของรอยโรคหูด มีลักษณะของ hyperkeratosis และ papillomatosis



© Elsevier Ltd 2005. McKee et al.: Pathology of the Skin with Clinical Correlations 3e

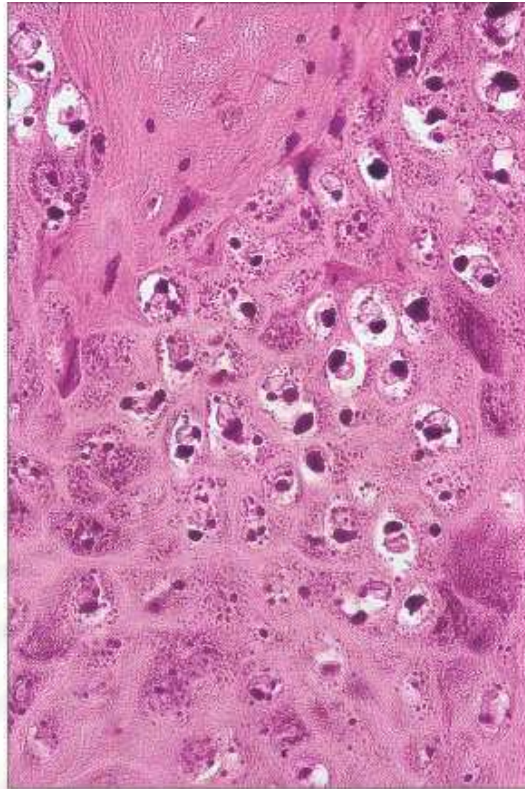
รูปที่ 15 แสดงพยาธิวิทยาของรอยโรคหูด มีลักษณะของ marked parakeratosis ที่เรียงในแนวตั้งฉาก



© Elsevier Ltd 2005. McKee et al.: Pathology of the Skin with Clinical Correlations 3e

รูปที่ 16 แสดงพยาธิวิทยาของรอยโรคหูด มี vacuolated cells ขนาดใหญ่
ที่มี enlarged, irregular keratohyalin granules

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



© Elsevier Ltd 2005. McKee et al.: Pathology of the Skin with Clinical Correlations 3e

รูปที่ 17 แสดงพยาธิวิทยาของรอยโรคหูดที่กำลังขยายมากขึ้น เห็น Koilocytes

การรักษา (treatment)

พบว่าประมาณ 10-30% ของผู้ป่วยพบว่ารอยโรคหูดอาจหายเองได้ ภายใน 1-2 ปี แต่อาจมีหูดใหม่เกิดขึ้น การรักษาหูดมีหลายวิธี ปัจจุบันยังไม่มีการรักษามาตรฐานสำหรับการรักษาหูด ไม่มีวิธีใดที่ดีที่สุด ควรพิจารณาตามผู้ป่วยแต่ละราย จะเลือกการรักษาด้วยวิธีใดนั้นขึ้นกับตำแหน่ง, ขนาด, จำนวน, ชนิดของหูด, อายุ และความร่วมมือในการรักษาของผู้ป่วย โดยคำนึงถึงความเจ็บปวด ความสะดวก ความเสี่ยงต่อการเกิดแผลเป็น และประสบการณ์ของแพทย์ผู้รักษา

วิธีการรักษาหูด ได้แก่

1. Physical destruction

1.1. การจี้ด้วยความเย็น (cryotherapy)

ที่ใช้มากที่สุดวิธีนี้คือ การใช้ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) โดยการจี้ หรือพ่นบริเวณรอยโรคหูด โดยวิธีการจี้จะใช้ไม้พันสำลีหลวมๆจุ่มใน Liquid nitrogen กดลงบนตุ่มหูดนาน 20

วินาที ที่ไว้ให้หาย freezing แล้วจึงจุ่ม liquid nitrogen และกดใหม่อีกครั้ง (freeze-thaw-freeze technique) ทำเช่นนี้ 1-3 ครั้งแล้วแต่ขนาดของตุ่มและความหนาของตุ่ม ส่วนวิธีการฉีดพ่นเป็นสเปรย์จากกระบอกฉีดนั้นควรพ่นให้เกิด freezing ที่ผิวหนังปกตกรอบตุ่มออกไปประมาณ 2-3 มิลลิเมตรทิ้งไว้ให้หายเย็นจึงพ่นซ้ำใหม่อีก 1-3 ครั้งเช่นเดียวกับการใช้ไม้พันสำลี ความเย็นทำให้เกิด necrosis ของผิวหนังชั้น epidermis และ dermis และยังทำให้เกิด thrombosis ของ dermal microvasculature วิธีนี้เป็นการรักษาที่นิยมใช้ และได้ผลดีในการรักษาหูดหลายชนิด แต่มีข้อควรระวังไม่ควรทำบริเวณกว้างๆหรือทำให้ freeze อยู่ยาวนานเกินไป เพราะจะทำให้ เกิดแผลกว้างและลึก ผลข้างเคียงคือ ปวด พองเป็นตุ่มน้ำ เป็นแผล necrosis และอวัยวะเพศวมได้ เมื่อใช้กับหูดบริเวณรอบเล็บ เช่น หูดที่ nail matrix การจี้มากเกินไปอาจทำลายอวัยวะที่อยู่ข้างล่าง เช่น nail matrix หรือ เส้นประสาทได้ ควรทำพอประมาณ และไม่ควรรใช้ในผู้ป่วยที่เป็น cryoglobulinemia ใช้ในคนที่ท้องได้ ผลการรักษาได้ผลประมาณ 60-90% ของผู้ป่วยมีอัตราการกลับเป็นซ้ำประมาณ 20-80% [82, 83]

1.2. Surgical excision และ curettage

เป็นการเอาหูดออกไปโดยตรง กรรไกรได้ผลดีในหูดที่เป็นดิ่งมีก้านเล็ก หรือมักทำในหูดโดยเฉพาะ anogenital warts ขนาดใหญ่ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีอื่น ส่วนพวกหูดชนิด flat wart รักษาได้ผลดีด้วย curettage หรือ shave excision วิธีการเหล่านี้เมื่อทำแล้วอาจมีเลือดออก ผล clearance rate ที่ 3 เดือนหลังการรักษาได้ผลประมาณ 36% มีอัตราการกลับเป็นซ้ำประมาณ 0-30% [84]

1.3. การจี้ด้วยความร้อน (electrodesiccation) หรือ การจี้ด้วยไฟฟ้า (electrocautery)

เป็นการรักษาโดยใช้วิธีจี้ไฟฟ้าทำลายเนื้อเยื่อหูดโดยตรงและยังทำให้เกิดความร้อนเกิด thermal coagulation ของ protein อีกด้วย ต้องใช้ยาชาเฉพาะที่ มักทำในหูดที่เป็นอันเดียว ถ้าทำลึกเกินไปอาจมีแผลเป็นจากการรักษาโดยเฉพาะในการทำที่ฝ่าเท้าต้องระวัง เพราะถ้าทำมากเกินไป ลึกไปจะทำให้เกิด painful scar ได้ โดยเฉพาะเวลาผู้ป่วยเดิน นิยมใช้ในหูดหงอนไก่ขนาดเล็ก และ filliform wart ผลจากการศึกษาพบว่าในมือผู้ชำนาญการรักษาด้วย electrocautery และ cryotherapy ได้ผลเท่ากัน [85]

electrocautery มีอยู่ 2 ชนิดคือ bipolar เป็นแบบที่ใช้กันทั่วไปและแบบ monopolar ที่ใช้ radio wave แบบหลังนี้จะทำลายเนื้อเยื่อน้อยกว่าจึงไม่ค่อยทำให้เกิดแผลเป็น การจี้ด้วยไฟฟ้า ต้องระวังเพราะควันทิ้งกระจายออกมามี HPV DNA อยู่ด้วย ซึ่งอาจทำให้เกิดการติดเชื้อ HPV ในทางเดินหายใจได้ ผลการรักษาได้ผลประมาณ 70-90% มีอัตราการกลับเป็นซ้ำประมาณ 24%

1.4. การใช้เลเซอร์ (laser treatment)

Laser ที่ใช้รักษาหูดมีอยู่ 2 ชนิดคือ CO₂ laser และ pulse dye laser ที่ใช้มากคือ CO₂ laser นิยมใช้ทำลายหูดที่ติดต่อการรักษา เช่นหูดรอบเล็บที่มีขนาดใหญ่ และหูดที่อวัยวะเพศ หรือใช้เพื่อ ต้องการคุมความกว้างและลึกในการทำลาย เช่น large periungual warts ใช้ได้ผลดีในบริเวณที่ไม่ต้องการให้เกิด tissue trauma เช่น intrameatal wart หรือ intraanal wart ผลข้างเคียงที่พบคือ scar formation, postoperative pain, bleeding, dyspareunia เป็นต้น clearance rate ประมาณ 40-90% recurrence rate ประมาณ 10-45% ซึ่งการยิงเลเซอร์จะ vaporize หูดให้ไหม้เป็นควันเวลาทำการรักษาต้องใส่หน้ากากปิดจมูก (surgical mask) เนื่องจากต้องระวังควันด้วย เพราะมีเชื้อไวรัสหูดที่ยังไม่ตายอาจฟุ้งในอากาศขณะทำการรักษา และยังตรวจพบ HPV DNA ในควันขณะจี้หูดด้วย [86-88]

1.5. Microscopically controlled (Mohs) surgery

ใช้รักษา verrucous carcinoma

1.6. การทายาสารลอกขุย (keratolytic agents) หรือกรด

เช่น ซาลิไซลิก แอซิด (salicylic acid), กรดแลคติก (lactic acid), Trichloroacetic acid (TCA) ใช้สารทำลายและทำให้ผิวหนังบริเวณที่ติดเชื่อหลุดออกมา

1.7. การทายากลุ่ม retinoic acid

ใช้ทาหูดชนิดราบ (flat warts) ได้

1.8. การทาสาร Cantharidin

เป็นสารสกัดจากแมลง green blister beetle ทำให้พอง ทำลายหนังกำพร้าที่หูด ยานี้เป็นสารพิษควรทาโดยแพทย์ และบางครั้งมีอาการปวดหลังทายาได้ 12-24 ชั่วโมง

2. **Cytotoxic agent**

2.1. การทายา podophyllin resin

เป็นสารที่ได้จากรากของต้น podophyllum peltatum และ podophyllum emodii นำยาอยู่ในรูป 10-25% suspension ใน tincture of benzoin ซึ่งไม่ได้ standardised ในน้ำยาที่ผลิตแต่ละครั้งจึง

มีความแตกต่างกันมากในปริมาณและคุณภาพของสารออกฤทธิ์ (active components) และสารปนเปื้อน (contaminant) โดยเฉพาะพวก mutagenic flavenoid compounds (quercetin และ kaempferol) ในน้ำยามีสารออกฤทธิ์อยู่หลายตัวรวมทั้ง podofilox ด้วย น้ำยาเก็บได้นานแค่ 1 โหล หรือมีความเสถียรแค่ 1 โหลนั้นไม่ทราบแน่ เนื่องจากมีความแตกต่างกันมากในการผลิตยาแต่ละครั้ง

วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้รักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศและทวารหนักเนื่องจากจะได้ประสิทธิภาพดีเมื่อใช้บริเวณเยื่อผิวหนัง (mucosal surface) ยาออกฤทธิ์โดยเป็น cytotoxic agent ยับยั้งการแบ่งตัวของ cell ในระยะ metaphase และยังเป็น antiproliferative ด้วยหลังจากทายาแล้วภายใน 48 ชม.เกิด epidermal pallor จากมี intracellular และ intercellular edema เกิด necrosis ของ tissue ที่ถูกยา

การทายาควรทาบางๆ คลุมหูดให้ทั่วปล่อยให้แห้งก่อนที่จะให้ผู้ป่วยลุกเดินหรือยืนขึ้น ถ้าทา มากไปหรือไม่ปล่อยให้แห้งก่อนยาอาจลามไปบริเวณอื่นหรือถูกกับผิวหนังข้างเคียงที่สัมผัสถูก ทำให้เกิดการระคายเคืองและอักเสบขึ้นมาได้ บางตำราจะแนะนำให้ทา petrolatum หรือ วาสลิน หรือ barrier อื่นๆที่ผิวหนังปกตกรอบๆหูดเพื่อป้องกันมิให้สัมผัสถูกน้ำยา แต่ถ้าทายาอย่างถูกวิธี แล้วก็ไม่จำเป็นต้องทา petrolatum บางตำราจะให้ทายาทิ้งไว้ประมาณ 1-4 ชม.แล้วล้างออก เนื่องจากกลัวว่าจะมี systemic absorption มากไป แต่ยังไม่มีความยืนยันแน่นอนว่าการล้างออกได้ ประโยชน์หรือให้โทษอย่างไรหรือไม่ ตามปกติแล้วจะทิ้งไว้ได้เลยโดยไม่ต้องล้างออก น้ำยา podophyllin เป็น water-insoluble ล้างน้ำไม่ออก ถ้าหูดยังไม่หลุดควรทาทุกสัปดาห์ หรือสัปดาห์ละ 2 ครั้งแต่ไม่เกิน 4-6 สัปดาห์

ยานี้มีข้อห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์เนื่องจากมี mutagen อยู่จึง ห้ามใช้ในบริเวณ transformation zone ของ cervix และ anorectal junction และการใช้ยาในแต่ละครั้งไม่ควรใช้ยามากกว่าครั้งละ 0.5 cc.หรือพื้นที่มากกว่า 10 ตารางเซนติเมตร [89] อาการข้างเคียงทั่วร่างกายที่สำคัญคือ hypokalemia, peripheral neuropathy, ชัก หมดสติ อาการทางไตและกดไขกระดูกได้ด้วย ผลข้างเคียงทางผิวหนังที่พบได้คือ เกิดแผล (ulceration), แดง (erythema), ระคายเคือง (irritation), ปวด (pain) และ แสบร้อน (burning) ผลการรักษาแตกต่างกันมากในแต่ละรายงาน เนื่องจากน้ำยาไม่ได้ standardized ที่มีรายงานได้ผลประมาณ 20-80% และมีอัตราการกลับเป็นซ้ำประมาณ 20-70% [90]

2.2. การฉีดสาร bleomycin

การฉีดเข้าบริเวณรอยโรคหูด ทำซ้ำได้ทุก 1 เดือน มักใช้ในรายที่รักษาหายยาก รักษาด้วยวิธีธรรมดาไม่ได้ผล ควรใช้ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากอาจเกิดเนื้อตายมากๆ ได้ (extensive tissue necrosis) หรือถ้าฉีดบริเวณเล็บวิธีนี้จะทำให้เล็บผิดปกติแบบถาวรได้ [91]

2.3. การทายา 5- fluorouracil 5%

5FU เป็น cytotoxic pyrimidine antagonist มีผลเป็น DNA antimetabolite มีขายเป็นรูป 5% cream และ 1% solution ได้ผลดีใน intrameatal และ intravaginal wart หรือใช้ร่วมกับ laser [92] เพื่อลด recurrence rate ควรทายาสัปดาห์ละ 2 ครั้งเป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ และป้องกันผิวหนังที่สัมผัสกับ cream ด้วย barrier ointment บางตำราจะให้ทาทุกวันนาน 5-7 วันก็มี อาการข้างเคียงที่สำคัญคือ dysuria, epithelial และ urinary meatal erosion, erythema, eschar, hyperpigmentation, local irritation, burning และ itching [93] นอกจากนี้ยังเป็น teratogen และ mutagen ด้วย จึงห้ามใช้ในคนท้องและหญิงที่ให้นมบุตร ยา 5-FU ให้ผล clearance rate ประมาณ 10-40% โดยมี recurrence rate ประมาณ 10% [93] ในระยะหลังๆนี้มีการพัฒนายา 5-FU เป็น 5-FU/epinephrine/bovine collagen gel implant [94] โดยผสมทั้ง 3 อย่างเข้าด้วยกัน epinephrine จะไปช่วยทำให้เกิด vasoconstriction และ bovine collagen จะเป็นตัว biodegradable stabilizing วิธีใช้คือฉีดสารนี้เข้าใต้หูดได้ ผลการรักษาประมาณ 55-65% มีอัตราการกลับเป็นซ้ำประมาณ 30-45% ภายใน 3 เดือน ผลข้างเคียงคล้ายๆกับ 5-FU เดียวๆ เช่น desquamation, epithelial erosion, erythema, eschar, hyperpigmentation, burning, swelling เป็นต้น และยา ก็ยังเป็น teratogen และ mutagen อีกด้วย

3. Immunomodifiers

3.1. การรักษาโดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้ต่อต้านหูด ด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น dinitrochlorobenzene (DNCB)

squaric acid dibutylester (SADBE)

diphenylcyclopropenone (DPC)

3.2. การใช้ interferon

อินเตอร์เฟอรอน (IFN) เป็น antiviral และ immunomodulation agent มีการทดลองใช้ interferon รักษาหูด ทั้ง interferon alpha, beta และ gamma ให้ได้ทาง systemic, intralesional injection สำหรับการรักษา anogenital wart นั้นพบว่าวิธีการที่ได้ผลดีที่สุดคือ intralesional injection ในขณะที่ systemic และยาทาไม่ได้ผล [95] แต่การใช้ในรูปแบบยาทาได้ผลในการลดจำนวนหูดใน laryngeal papillomatosis และ EV แต่มักกลับเป็นใหม่เมื่อหยุดการรักษา [96, 97]

เนื่องจากยามีราคาแพงมากและ systemic side effect มีมาก จึงไม่นิยมใช้ interferon ในการรักษา anogenital wart ขนาดยาที่ใช้ยังใช้แตกต่างกันมากในแต่ละรายงาน ส่วนใหญ่จะฉีด intralesional สัปดาห์ละ 3 ครั้ง หรือใช้ interferon หลังจากยิง laser เอาหูดออกไปแล้ว เพื่อป้องกันการเป็นซ้ำ อาการข้างเคียงเฉพาะที่บริเวณฉีดยาที่พบคือ pain, burning, itching, irritation และ bleeding นอกจากนี้ยายังดูดซึมเข้า systemic เกิด systemic side effect ได้ เช่น flu-like syndrome, nausea, vomiting fatigue, malaise และ back pain ผล clearance rate ประมาณ 42-62% และอัตราการกลับเป็นซ้ำประมาณ 20-30% [98]

3.3. ยาทา 5% อิมิควิมอดครีม (imiquimod)

ยา 5% อิมิควิมอดครีม ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับในการรักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศ [11] เป็น imidazoquinoline amine ทำหน้าที่ในสัตว์ทดลองเป็น immune response modifier พร้อมทั้งเป็น potent antiviral และ antitumor ด้วย ในคนเชื่อว่า Imiquimod ออกฤทธิ์โดยไปกระตุ้น immune cell โดยเฉพาะ macrophage, monocyte และ dendritic cell ให้สร้าง cytokine เช่น interferon alpha, tumor necrosis factor alpha, interleukins 1, 5, 6, 8, 10 และ 12 พวก colony-stimulating factor เช่น G-CSF, GM-CSF เป็นต้น [3] นอกจากนี้ยายังมีผลต่อ Langerhans' cell โดยกระตุ้นให้มีการเคลื่อนตัวของ activated Langerhans' cell ไปที่ต่อมน้ำเหลืองมากขึ้น เพื่อกระตุ้นการสร้าง specific (cytotoxic) T-cells ตัว Imiquimod เองไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อไวรัส แต่กระตุ้นให้ร่างกายฆ่าไวรัสเองจาก cytokine ที่หลั่งออกมาและจาก cytotoxic T cell

Imiquimod มีขายในรูปแบบของ 5% cream เริ่มแรกใช้ในการรักษาหูดอวัยวะเพศ โดยให้ทา สัปดาห์ละ 3 วัน ไม่ติดต่อกัน เช่น จันทร์, พุธ, ศุกร์ ทาจนกระทั่งหูดหลุดไปแต่ไม่นานกว่า 16 สัปดาห์ใช้ทาบางๆแล้วคลึงให้ยาซึมเข้าเนื้อไปและปล่อยให้แห้งทั้งคืน จากการทดลองพบว่าหูดหายไป 77% ของผู้หญิงและ 40% ในผู้ชาย [99] อัตราการหายของผื่นในผู้ชายต่ำกว่าผู้หญิง เนื่องจากผู้ชายในการศึกษานี้เป็นคนที่ทำ circumcision ใน uncircumcised male นั้น พบว่า clearance rate อยู่ที่ประมาณ 60% [100] แต่พบว่ามี local side effect มากกว่า เช่น erythema,

erosion, burning, itching, irritation และ pain เนื่องจากยาไปกระตุ้น immune ของร่างกายจึงทำให้ recurrence rate ต่ำประมาณ 10-20% เท่านั้น

4. Antiviral agents

4.1. Nucleotide analogue cidofovir

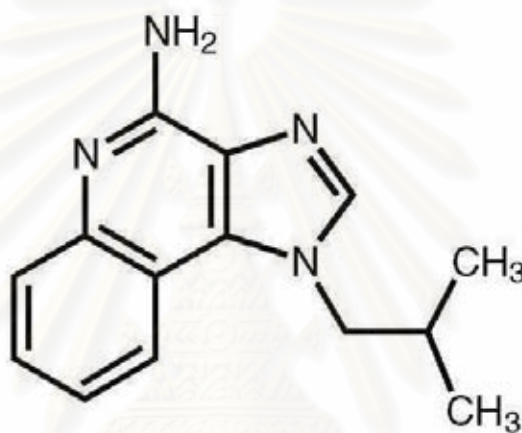
Cidofovir (HPMPC: [s]-1-[3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl] cytosine) เป็นยาประเภท acyclic nucleoside phosphate analogue มี broad-spectrum antiviral activity ต่อเชื้อไวรัสหลายตัว เช่น cytomegalovirus, herpesvirus, adenovirus, papillomavirus และ polyomavirus [101] ยาออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการสร้าง viral DNA ยาจะผ่านเข้าเซลล์ได้ช้าแต่ intracellular half life อยู่ยาวนาน 6-87 ชม. จึงทำให้ไม่ต้องทายาบ่อย ยาที่ใช้อยู่ในรูป 1.5-3% cream หรือ gel ทา สัปดาห์ละ 2-3 วัน จนผื่นหายไปหมด

มีรายงานได้ผลในการรักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศ โดยนิยมใช้ในผู้ป่วย HIV ที่มี genital wart และผู้ป่วยที่ต่อต้านการรักษาอื่นๆ [102] ได้ผล clearance rate ของผื่นประมาณ 22-33% ผลข้างเคียงคือ อาการแดง เจ็บ แดกเป็นแผล และเกิดการระคายเคืองบริเวณที่ทา [103, 104]

บทที่ 4

ยา 5% อิมิควิมอดครีม

ยา 5% อิมิควิมอดครีม (imiquimod) เป็นยากลุ่มกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน สูตรโครงสร้างเคมีของยา คือ 1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo(4,5-C) quinolin-4-amine สูตรโมเลกุล คือ $C_{14}H_{16}N_4$ น้ำหนักโมเลกุล 240.3 (รูปที่ 17)



รูปที่ 18 แสดงสูตร โครงสร้าง โมเลกุลของยาอิมิควิมอด

ยาอิมิควิมอดเป็นผลึกแข็ง ไม่มีกลิ่น สีขาว ยาอิมิควิมอดมีจุดหลอมเหลว 297 องศาเซลเซียส ถึง 299 องศาเซลเซียส ยา 5% อิมิควิมอดครีม 1 กรัม ประกอบด้วย อิมิควิมอด 50มิลลิกรัม ใน oil-in-water vanishing cream base ในครีมเบสประกอบด้วย isoteaic acid, cetyl alcohol, stearyl alcohol, white petrolatum, polysorbate 60, sorbitan monostearate, glycerin, xanthan gum, purified water, benzyl alcohol, methylparaben และ Propylparaben

การจัดกลุ่มยา

ยาอิมิควิมอดเป็นยากลุ่มใหม่สุด เป็นยากลุ่มกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immune-response modifier) มีข้อบ่งชี้ (FDA approved indication) ในการรักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศและทวารหนัก (anogenital warts) ในผู้ป่วยทั้งเพศชายและเพศหญิง ในปี ค.ศ.1997 และกลุ่มมะเร็งผิวหนัง คือ โรค actinic keratosis และ superficial basal cell carcinoma ในปี ค.ศ. 2004 และจนถึงปัจจุบันยาได้มีการนำยานี้

มาใช้ในโรคต่างๆ อีกมากมาย เช่น หูดบริเวณผิวหนัง (common warts), molluscum contagiosum, keloids, non-melanoma skin cancer เป็นต้น

การศึกษาแรก ๆ ในสัตว์ทดลอง ยาอิมมูโนโมดูเลเตอร์กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ (cytokines) กลไกหลักของไซโตไคน์ในการยับยั้งไวรัส คือ การสร้างอินเตอร์เฟอรอนชนิดแอลฟา (IFN- α) อิมมูโนโมดูเลเตอร์สามารถกระตุ้นการสร้างอินเตอร์เฟอรอนชนิดแอลฟาได้ 5 กลุ่มย่อย กระบวนการนี้เหมือนปฏิกิริยาตอบสนองของร่างกายตามธรรมชาติเมื่อมีการติดเชื้อไวรัส [105] ยาอิมมูโนโมดูเลเตอร์กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ตัวอื่น ๆ เช่น Tumor necrosis factor (TNF), Interleukins (ILs)

ตัวยาอิมมูโนโมดูเลเตอร์เองไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อไวรัสหรือไม่ได้ทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยตรง แต่กระตุ้นให้ร่างกายฆ่าไวรัสเองจากไซโตไคน์ที่หลั่งออกมา และจาก cytotoxic T cell โดยยังไม่ทราบแน่ชัดถึงความสัมพันธ์ของอาการทางคลินิก กับการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันจากยานี้ ซึ่งอาจสรุปได้ว่าการทายาอิมมูโนโมดูเลเตอร์ทางผิวหนังมีผลหลักต่อผิวหนังและระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง

การศึกษาทางเภสัชวิทยาต้านระบบภูมิคุ้มกัน

ยาอิมมูโนโมดูเลเตอร์ เป็นทำหน้าที่ในสัตว์ทดลองเป็น immune response modifier พร้อมทั้งเป็น potent antiviral และ antitumor ด้วย ในคนเชื่อว่า ยาออกฤทธิ์โดยไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งชนิด innate immunity โดยการสร้างไซโตไคน์ต่างๆ ที่สำคัญได้แก่ interferon-alpha และ TNF-alpha และกระตุ้น acquired หรือ adaptive immune system ด้วยผ่านทางสร้าง Th1 cytokines เช่น Interferon-gamma

ผลของยาต่อระบบภูมิคุ้มกันทาง Innate immunity

ผลการศึกษาดูผลทั้งในสิ่งไม่มีชีวิต (in vitro) โดยการอบยาอิมมูโนโมดูเลเตอร์กับเซลล์มีมหนู และไม่มีชีวิต (in vivo) โดยการให้ฉีด ทางปาก และทายาอิมมูโนโมดูเลเตอร์ใน mice, rats, guinea pigs, และ monkeys พบว่ายาอิมมูโนโมดูเลเตอร์กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์โดยเฉพาะ interferon-alpha ใน ยาอิมมูโนโมดูเลเตอร์ยังกระตุ้นไซโตไคน์ตัวอื่น เช่น TNF, IL-1, IL-6 และ IL-8 [106, 107] นอกจากนี้จากการให้ยาทางปากพบว่ามียาระดับเอนไซม์ (2'-5')-oligoadenylate synthetase ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการทำงานต่อต้าน cytoplasmic RNA viruses ของ interferon [107-110]

จากการทายาอิมมูโนโมดูเลเตอร์ขนาดความเข้มข้น 1% ลงบนผิวหนังหนูที่ไม่มีขนชนิด hairless mice และทายา 5% บนหนูทั้ง 2 ชนิด hairless mice และ rats พบว่าสามารถตรวจวัดระดับ IFN- α และ TNF- α สูงขึ้นตั้งแต่ 1-4 ชั่วโมง ในตำแหน่งที่ทายา เมื่อเทียบกับตำแหน่งที่ไม่ได้ทายา ซึ่งในตำแหน่ง

ที่มีระดับ IFN- α สูงขึ้น พบมีระดับ IFN- α mRNA สูงขึ้นด้วย แสดงให้เห็นว่าระดับซัยโตไคน์ที่เพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการถูกกระตุ้นให้เกิดการ transcription ของยีนเฉพาะที่ [111]

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของซัยโตไคน์ที่กระตุ้นด้วยยาอิมิควิมอด

Cytokines induced by imiquimod

Interferon- α

Interleukins 1, 5, 6, 8, 10, 12

Tumor necrosis factor α (TNF- α)

Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1RA)

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)

Granulocyte-macrophage/ colony-stimulating factor (GM-CSF)

Macrophage inflammatory protein -1 α and -1 β

Macrophage chemotactic protein (MCP-1)

ผลของยาต่อระบบภูมิคุ้มกันทาง Acquired immunity

จากการทดลองในเซลล์เม็ดเลือดที่เพาะเลี้ยงของมนุษย์ (peripheral blood mononuclear cell (PBMC)) การกระตุ้นการสร้างซัยโตไคน์หลาย ๆ ตัวของยาอิมิควิมอดแปรผันตามขนาดยา โดยเฉพาะอินเตอเฟอรอนชนิดแอลฟา ในการศึกษาสามารถพบซัยโตไคน์ 1-2 ชั่วโมง หลังจากได้รับยาอิมิควิมอด การสร้างซัยโตไคน์มากสุดภายใน 8 ชั่วโมงแรก [108, 112] โมโนไซต์ (monocytes) เป็นเซลล์หลักในการตอบสนองต่อซัยโตไคน์เหล่านี้ [112] ยาอิมิควิมอดกระตุ้นการสร้างซัยโตไคน์ในเซลล์เนื้อเยื่อหนารูปแบบของซัยโตไคน์ขึ้นกับเซลล์ต้นกำเนิด [106]

นอกจากนี้ยังพบมีการแสดงออกของยีนต่างๆ ใน Human keratinocytes และ epidermal carcinoma cell line หลังจากนำไปอบกับ imiquimod (5 μ g/mL สำหรับ human keratinocytes และ 1 μ g/mL และ 10 μ g/mL สำหรับ human carcinoma cell line) โดยพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ mRNA สำหรับ IFN- α , IL-6 และ IL-8 แต่ไม่พบสำหรับ TNF- α และ IL-1 แสดงว่ายาอิมิควิมอดกระตุ้นการแสดงออกของ IL-6 และ IL-8 ยีนโดยตรง แต่กระตุ้นการแสดงออกของ IL-1 โดยอ้อม [113]

ยาอิมมูโนโมดสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cellular arm of acquired immunity) ผ่านทางไซโตไคน์ต่าง ๆ เช่น IFN- α , IFN- γ และ IL-12 แต่มันไม่ได้มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ T cell หรือการหลั่งของไซโตไคน์จาก T cell โดยตรง เช่น IL-2, IL-4 และ IL-5

อย่างไรก็ตามในการศึกษาพบว่ายาสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง T helper type 1 (TH1) cytokine โดยอ้อมซึ่งมีผลในช่วยกระตุ้น cell mediated immune responses ใน in mouse splenic และ bone marrow cultures และ human PBMC [114] โดยพบว่ามี การกระตุ้นต่อ IL-12R α 2 subunit บน TH1 cells โดย IFN- α ส่งผลให้มีการตอบสนองของ IL-12 และหลั่ง IFN- α เพิ่มขึ้นโดยยานี้ออกฤทธิ์กระตุ้น IFN- α ซึ่งจะกระตุ้นการหลั่ง TH1 IFN- γ โดยอ้อมต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นการสร้าง IFN- γ โดยยาอิมมูโนโมด ถูกยับยั้งโดยแอนติบอดีต่อ IL-12 และ IFN- α [115]

ผลของยาต่อระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ

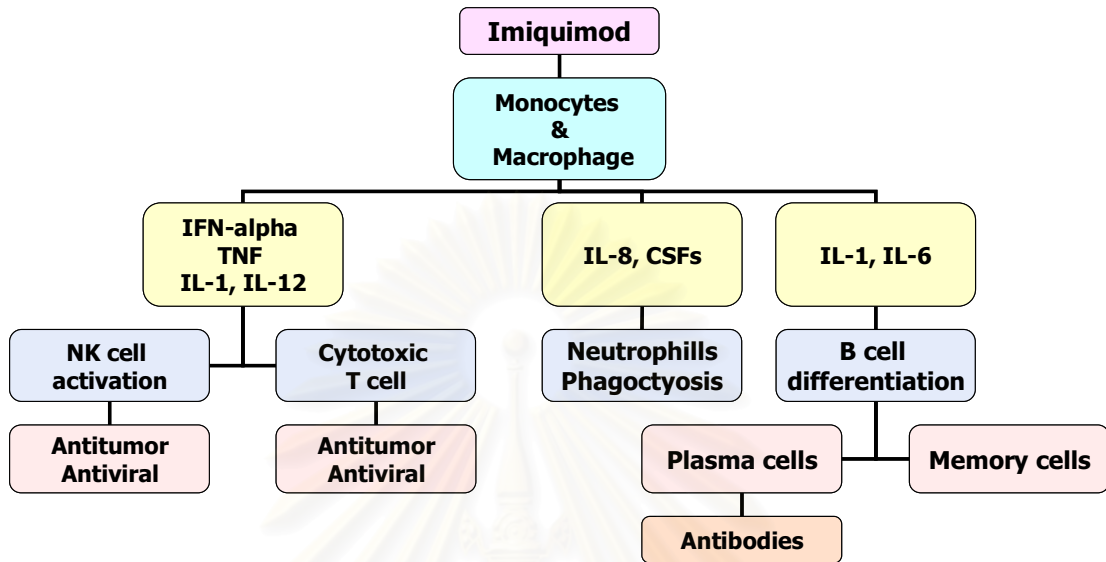
Langerhans' cells (LCs) ซึ่งเป็นชนิดหนึ่งของ dendritic cell สร้างมาจากไขกระดูก ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell หลักใน epidermis ซึ่ง LCs นี้สามารถแสดงทั้ง tumor antigens และ viral antigen ต่อ T lymphocytes ทำให้เซลล์นี้มีหน้าที่ในการต่อต้านเนื้องอก และต่อต้านไวรัส โดยพบว่า IL-1 α และ TNF- α ที่ถูกกระตุ้นด้วยยาอิมมูโนโมด ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ Langerhans' cells ไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง

จากการศึกษาทายา 5% อิมมูโนโมดที่บริเวณหลังหูของหนู แล้วนำ epidermal sheets ที่ย้อมติด immunolabeling มาตรวจดู พบว่า Langerhans' cells มีปริมาณลดลง และ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ซึ่งเชื่อว่า LCs นี้ถูกกระตุ้นด้วยยาอิมมูโนโมด [116]

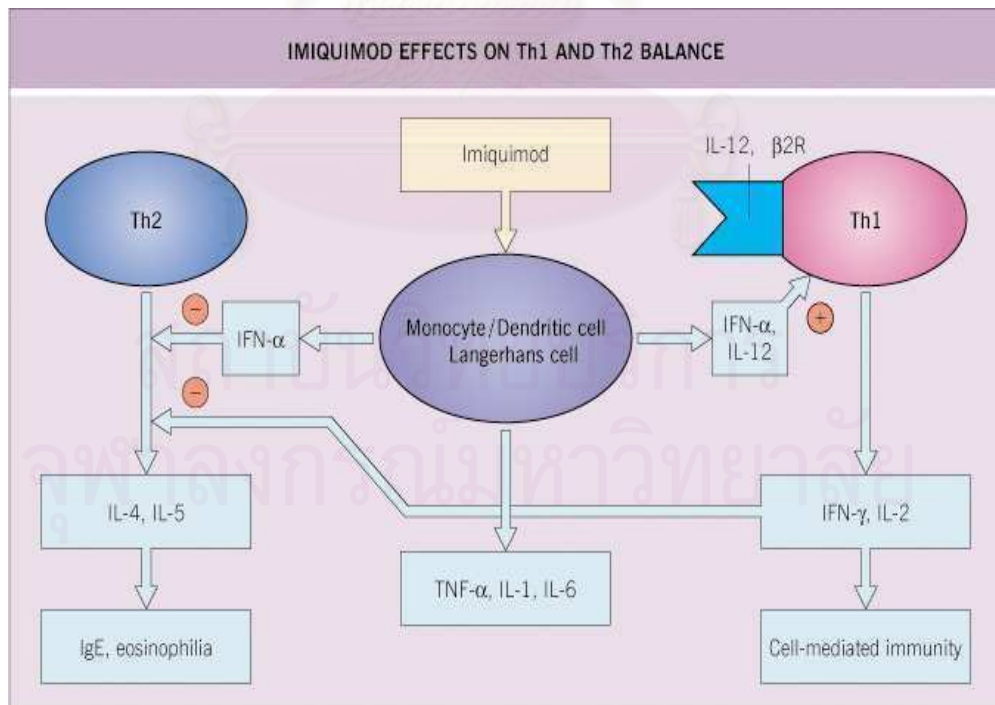
นอกจากนี้หลังจากการกระตุ้นด้วยแอนติเจน (Antigen challenge) และทายา 5% อิมมูโนโมดในหนู พบว่ามีการเคลื่อนที่ของ Langerhans' cells จากผิวหนังไปยังต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงมากขึ้น ตั้งแต่ 2 ชั่วโมงหลังทายา และมีการแสดงออกของ mRNA สำหรับไซโตไคน์ต่าง ๆ (IL-6, -10, IFN- α , IFN- γ , และ TNF- α) 24 ชั่วโมงหลังจากกระตุ้นหนูที่ทายา 5% อิมมูโนโมดด้วยแอนติเจน แสดงให้เห็นว่ายา 5% อิมมูโนโมดส่งผลให้มีการนำเสนอ viral antigen มากขึ้นเนื่องจากการเคลื่อนที่ของ LCs เพิ่มขึ้น

นอกเหนือจากการศึกษาในหนู Burns และคณะ ได้ทำการศึกษาในคน พบว่ายา 5% อิมมูโนโมด และ analog ซึ่งก็คือ R-842 กระตุ้นให้ LCs ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งต้องอาศัยการแสดงออกของ costimulatory molecule ต่างๆร่วมด้วย เช่น CD 80, CD 86 รวมไปถึง CD 40 และ HLA-DR [117]

Imiquimod's Effect on the Immune System



แผนผังที่ 1 แสดงผลของยาต่อเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันผ่านไซโตไคน์



© 2003 Elsevier - Bologna, Jorizzo and Rapini: Dermatology - www.dermtext.com

รูปที่ 19 แสดงผลของยา imiquimod ในการกระตุ้นออกไปทาง Th1

ตารางที่ 4 แสดงผลของยาอิมมูโนมอดต่อเซลล์ต่างๆในผิวหนัง

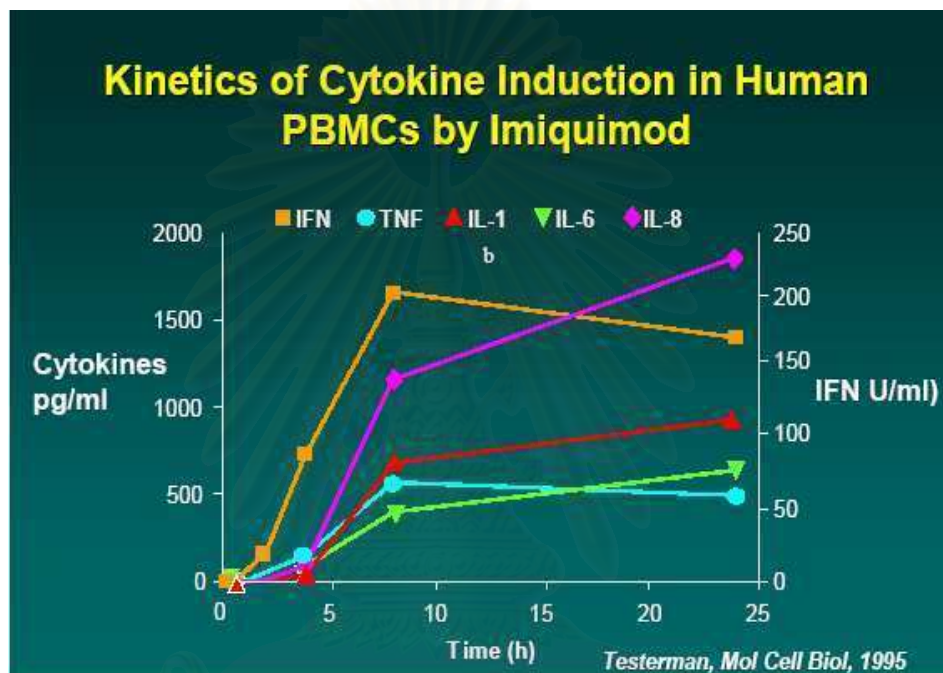
ชนิดของเซลล์	ผลของยาต่อเซลล์
NK cell	กระตุ้นการทำงานของ NK cells ให้ฆ่าเซลล์เป้าหมายได้ดีขึ้น
B lymphocyte	กระตุ้นการ proliferation และ differentiation
T lymphocyte	ไม่มีผลกระตุ้นการ proliferation และการสร้างไซโตไคน์ เช่น IL-2, IL-4 และ IL-5 โดยตรง แต่ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ IL-2 ทางอ้อมเมื่อถูกกระตุ้นด้วย mitogens หรือ antigens และยังมีผลทำให้เกิดการตอบสนองไปทาง Th1 มากขึ้น เช่นการเกิด DTH response
Monocyte /macrophage	กระตุ้นเซลล์เหล่านี้ให้มีการหลั่งไซโตไคน์ต่างๆ เช่น IFN- α , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 และ IL-10 แต่มีผลเพียงเล็กน้อยต่อ respiratory burst, การกำจัด sheep erythrocytes หรือ tumor cell กระตุ้นการหลั่ง nitric oxide จากมาโครฟาจ
Neutrophils	ไม่มีผลกระตุ้นโดยตรงต่อ Neutrophils แต่มีผลทางอ้อมโดยทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ IL-8, การแสดงออกของ Mac-1 และลดการแสดงออกของ L-selectin
Human keratinocyte	กระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังสร้าง IFN- , IL-6 และ IL-8 มากขึ้น

เภสัชพลศาสตร์ (Pharmacodynamic)

ฤทธิ์การต่อต้านไวรัส (antiviral activity)

ยาอิมมูโนมอดสามารถกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ผิวหนัง (immune cell, monocyte, macrophage, keratinocyte cell) เหล่านี้จนทำให้เกิดสารไซโตไคน์ (IL-1,IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) และอินเตอร์เฟอรอน (IFN- α) รวมไปถึง TNF- α , MIP-1, MCP-1 ในผิวหนัง เฉพาะบริเวณที่ทายา โดยการทำงานของยา หลักคือออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้งชนิด innate และ adaptive immune response ผ่านระบบไซโตไคน์

จากการศึกษาทดลองหนึ่งของ Testerman และคณะ [118] ได้ทำการศึกษาทดลองในเซลล์เม็ดเลือดที่เพาะเลี้ยงของมนุษย์ โดยดูการสร้างซัยโตไคน์ออกมาที่ระดับยาอิมิกวิมอดเท่ากับ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบว่าสามารถกระตุ้นซัยโตไคน์ออกมาได้ภายใน 2 ชั่วโมงหลังได้ยา และขึ้นไปสูงสุดประมาณ 8 ชั่วโมงหลังได้ยา อินเทอเฟอรอนเป็นซัยโตไคน์ตัวแรกที่พบ ระดับความเข้มข้นของอินเทอเฟอรอนอยู่ได้นาน 24 ชั่วโมง ระดับของ IL-8 ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นช่วง 8-24 ชั่วโมง (รูปที่ 19)



รูปที่ 20 แสดงระดับซัยโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดที่เพาะเลี้ยงของมนุษย์ (PBMCs) เมื่อได้ยา 5% อิมิกวิมอดโดยการนำเซลล์เม็ดเลือดของคน (2×10^6 cells/mL) มาเพาะเลี้ยงใน RPMI supplemented medium แล้วนำมาอบเป็นเวลานาน 1, 2, 4, 8 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเอา supernatants แล้วนำมาวัดหาระดับ interferon (IFN), tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 และ IL-8 ผลแสดงเป็นหน่วย U/mL สำหรับ IFN และ pg/mL สำหรับซัยโตไคน์อื่นๆ

ฤทธิ์การต่อต้านเนื้องอก (antitumor activity)

สำหรับการรักษา Actinic keratosis

ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์แน่ชัด มีการศึกษาเพื่อดูการแสดงออกของยีนต่างๆ ในเนื้อเยื่อ ก่อน ระหว่างการรักษา (2-3 สัปดาห์) และหลังการรักษาด้วยยาอิมิกวิมอดครีม 6 สัปดาห์ พบว่า IL-6, hsp70, TLR-7 และ TLR-8 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับรอย

โรคที่ไม่ได้รับการรักษา ระหว่างการรักษาพบมีระดับ IFN- α , IL-6, IL-10 receptor 1 และ TLR-7 เพิ่มขึ้นด้วย แต่ antiapoptotic genes คือ hurpin และ HAX-1 กลับลดลง และไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนสำหรับ p53, TNF- α , α - และ β -catenins นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ proinflammatory cytokines มีความสัมพันธ์กับ local inflammation เช่นความแดงที่รอยโรคหลังทายาอิมิกวิมอด [119]

สำหรับการรักษา Superficial BCC

ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์แน่ชัด แต่เชื่อว่ายาอิมิกวิมอดทำให้เกิดการหายของรอยโรคได้จาก 4 สาเหตุ คือ

1. จากการที่มีการแสดงออกของ Bcl-2 ลดลงหลังการรักษาด้วยยา ทำให้เซลล์มะเร็งง่ายต่อการเกิด apoptosis
2. เป็นผลจากซัยโตไคน์ (IL-1, IFN- α , IFN- γ และ TNF- α) ที่หลั่งออกมาเพิ่มขึ้น และกระตุ้นให้เกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งผ่าน death receptor
3. มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cellular immunity) มีเซลล์อักเสบมาอยู่ล้อมรอบเนื้องอก เช่น monocytes ที่สำคัญคือ macrophage อยู่ล้อมรอย และในรอยโรคมะเร็ง ทำให้เกิดการนำเสนอแอนติเจนได้ดีขึ้น การกระตุ้นเซลล์อักเสบเข้ามาเกิดเร็วตั้งแต่วันที่ 3-5 หลังทายา และสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ ICAM-1 โดยเซลล์ที่เข้ามาในระยะแรกคือ macrophage และ lymphocytes
4. มีการเพิ่มขึ้นของปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้เกิดการทำลายเนื้องอก ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของ endothelial cell adhesion molecules (ICAM-1) ทำให้เซลล์ต่างๆ เคลื่อนที่มายังตำแหน่งของเนื้องอกได้มากขึ้น, panel of markers (Bcl-2, Fas, Fas ligand, ICAM-1, IL-10, TAP-1 และ CD68) [120]

เภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic)

การดูดซึมยาเข้ากระแสโลหิตผ่านทางผิวหนังเกิดได้น้อยมาก systemic metabolites หลักของยาอิมิกวิมอด คือ S-26704 (hydroxylation product of imiquimod) ค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของยาล้างจากการฉีดเข้าทางเส้นเลือด (intravenous administration) คือ 14 ชั่วโมง และหลังจากให้ทายาที่ผิวหนังเพียงครั้งเดียว ตรวจพบมียาน้อยกว่า 1% ขับออกมากับปัสสาวะ

ในการศึกษาทดลองหนึ่งทำในคนปกติจำนวน 6 คน โดยทาอิมิควิมอดครีมที่มีสารกัมมันตรังสี (14C labeled) บริเวณแขนเพียงครั้งเดียว พบว่าไม่สามารถตรวจพบกัมมันตรังสีในซีรัม (ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 1 ng/ml) และพบว่ายาถูกขับออกทางปัสสาวะและอุจจาระในปริมาณน้อยกว่า 0.9% ของขนาดยาที่ใช้ [121]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ยารักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศ ในผู้ป่วย 12 ราย ในขนาดยาเฉลี่ย 4.6 mg. พบว่ามี systemic absorption ของยาผ่านผิวหนังน้อยมาก Mean peak drug concentration เท่ากับ 0.4 ng/ml Mean urinary recoveries of imiquimod และ metabolites เท่ากับ 0.11% และ 0.24% of estimated applied dose ในผู้ชาย และผู้หญิงตามลำดับ [121]

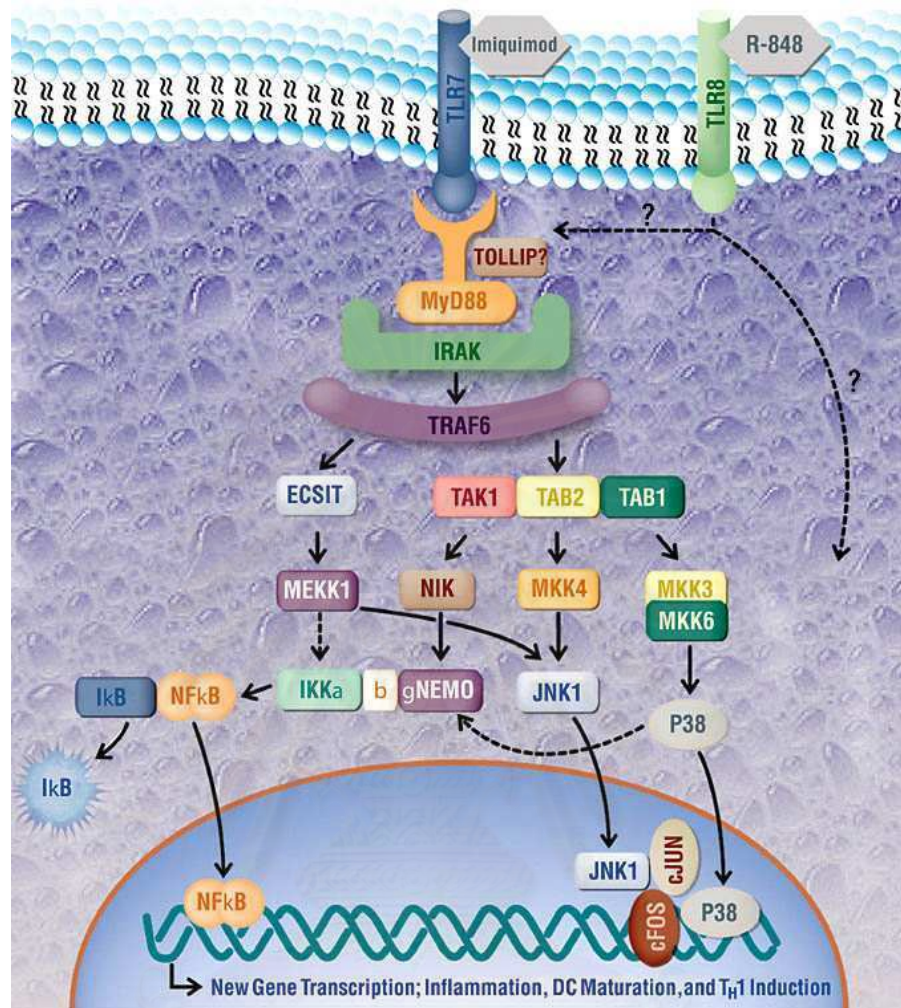
ในการรักษา actinic keratoses พบว่า mean peak serum drug concentration ที่สิ้นสุดการศึกษา ทายา 3 วันต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 16 สัปดาห์ เท่ากับ 0.1, 0.2 และ 3.5 ng/ml เมื่อใช้กับรอยโรคาที่บริเวณหน้า (12.5 mg of imiquimod, 1 single-use pocket), หนังกีรษะ (25 mg, 2 pockets) และบริเวณมือและแขน (75 mg, 6 pockets) ตามลำดับ [121]

กลไกการออกฤทธิ์ของยา (Mechanism of Action)

กลไกการออกฤทธิ์ของยาในการรักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากหลักฐานในปัจจุบันมีสมมติฐานที่น่าจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน

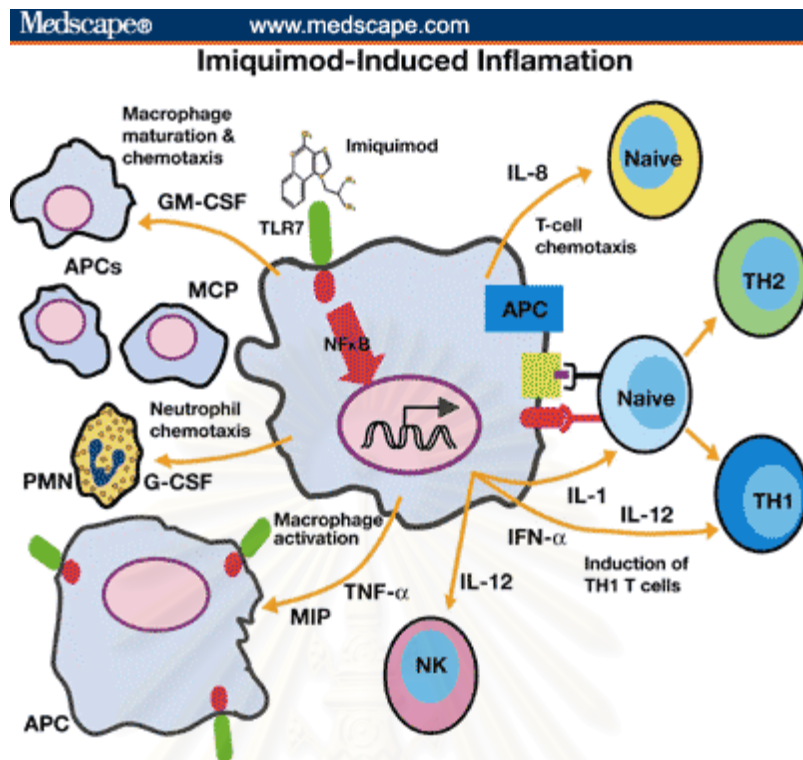
จากการศึกษาของ Miller และคณะ [107] ได้นำเสนอกลไกการออกฤทธิ์ของยาอิมิควิมอด คือ ยาอิมิควิมอดจับกับตัวรับ (receptors) คือ TLR-7 บริเวณผิวเซลล์ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โมโนไซต์ และมาโครฟาจ (macrophages) (รูปที่ 20) เมื่อเข้าไปในเซลล์มีการกระตุ้นผ่าน MyD88-IRAK-TRAF6 pathway เกิดการกระตุ้นสารพวก transcriptional factors ต่างๆ เช่น phosphorylation ของ NF- κ B (the kappa-gene enhancer binding protein), Jun N-terminal kinase (JNK), activating protein-1 (AP-1) และ p38 โดยผ่านทาง tyrosine kinase หรือ protein kinase C การกระตุ้นให้เกิด phosphorylated molecules โมเลกุลเหล่านี้ทำให้เกิดการสังเคราะห์ mRNA ของไซโตไคน์หลายตัว เกิดการสร้างไซโตไคน์ เช่น อินเตอเฟอรอน, TNF, IL-1, IL-6 และ IL-8 ขึ้นมา (รูปที่ 21)

นอกจากนี้ยา cycloheximide ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการสร้างโปรตีน ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง mRNAs ของอินเตอเฟอรอน, TNF, อินเตอลิวคิน ที่เกิดจากยาอิมิควิมอดได้ ยาอิมิควิมอดกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ และการสร้าง mRNAs ของไซโตไคน์จากการกระตุ้นของยาอิมิควิมอดเกิดโดยตรง และเป็นอิสระ [107]



รูปที่ 21 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาผ่านทางตัวรับ Toll like receptor 7 ผ่าน MyD88-IRAK-TRAF6 pathway และกระตุ้นต่อ transcriptional pathways อื่นๆ ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่มีผลหลังซัยโตไคน์ และกระตุ้นเซลล์ต่างๆในระบบภูมิคุ้มกัน

การเป็นพิษของยา (Toxicology)

การเป็นพิษต่อผิวหนัง (Dermal Toxicity)

การศึกษาทดลองในหนู โดยการทายาอิมิควิมอดบริเวณผิวหนังหนูซ้ำ ๆ พบว่า ยาไม่มีผลเข้าสู่ร่างกาย (systemic) แต่มีผลเฉพาะที่ คือมีการระคายเคืองเฉพาะบริเวณที่ทายาเท่านั้นและในการทดลองทายาอิมิควิมอดในกระต่าย โดยใช้ยาปริมาณสูงครั้งเดียว คือ 2,000 mg /kg และ 5,000 mg/kg เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่พบว่ามีอาการตายหรืออาการเป็นพิษเกิดขึ้น แสดงว่าค่า dermal LD₅₀ (median lethal dose) มากกว่า 5,000 mg/kg [121]

การเป็นพิษต่อร่างกาย (Systemic Toxicity)

จากการศึกษาทดลองในสัตว์ 3 สายพันธุ์ คือ หนู (mouse), หนู (rats) และลิง โดยการ

ให้ยา 4 ทาง คือ กิน (oral) , ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) , ฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนัง (subcutaneous) และฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous) ผลข้างเคียงที่พบมากที่สุด คือ สัตว์เซื่องซึม และ ชีวมลง การชักพบบ่อยขึ้นเมื่อถึงระดับยาที่สัตว์ใกล้ตาย [121]

การให้ยาขนาดสูง คือ 10-30 mg /kg /day เมื่อให้ในหนู (rats) และถึงทางการกินพบว่า ยาอิมิควิมอดทำให้ lymphoid organs มีขนาดใหญ่ขึ้น

เมื่อให้ยาขนาดสูงพบมีซีด (anemia) และเกร็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia) IFN มีผลทำให้มีการลดลงของเม็ดเลือดแดงและเกร็ดเลือด ยิ่งกว่านั้นอินเทอเฟอรอนและซัยโตไคน์ตัวอื่น ๆ มีผลกดเซลล์ต้นกำเนิดสร้างเม็ดเลือดในไขกระดูก

พบว่ายาอิมิควิมอดกระตุ้นให้สร้างเซลล์พลาสมา (plasma cell) มากขึ้นในต่อมน้ำเหลือง ม้าม และไขกระดูก การสร้างเซลล์พลาสมาเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับโกลบูลิน (globulin) และ IgG ในซีรัม มีการลดระดับของอัลบูมิน (albumin) ในซีรัมเมื่อได้ยาขนาดสูง พบว่าน้ำหนักตัวของหนู (rats) และถึงลดลง และมีการตายเกิดขึ้นในสัตว์บางตัวเมื่อได้ยาขนาด 10-30 mg/kg/day [121]

ข้อบ่งชี้ในการใช้ยา (Indication and Usage)

ยานี้มีข้อบ่งชี้ในการใช้เป็นยารักษาภายนอก ได้รับการอนุมัติจาก FDA ในการรักษา

1. หูดบริเวณอวัยวะเพศและทวารหนัก (anogenital warts)
2. โรค Actinic keratosis
3. โรค Basal cell carcinoma (superficial และ nodular)

และจนถึงปัจจุบันมีรายงานถึงประสิทธิภาพที่ดีของยา 5% อิมิควิมอด (non-controlled case reports) ในการรักษาผู้ป่วยโรคผิวหนังต่างๆ เช่น หูดบริเวณผิวหนัง (common warts), molluscum contagiosum, keloids, non-melanoma skin cancer, basal cell nevus syndrome, vulvar intraepithelial neoplasia, squamous cell carcinoma (of the penis), cutaneous T-cell lymphoma, cutaneous extramammary paget's disease, lentigo maligna และ cutaneous melanoma metastases เป็นต้น

หูดบริเวณอวัยวะเพศและทวารหนัก (External Genital and Perianal Warts)

มีรายงานการศึกษาที่มีกลุ่มควบคุม แบบสุ่มใช้ทา 5% Imiquimod cream ที่หูดอวัยวะเพศ สัปดาห์ละ 3 วัน ไม่ติดต่อกัน เช่น จันทร์, พุธ, ศุกร์ ทางจนกระทั่งหูดหลุดไปแต่ไม่นานกว่า 16 สัปดาห์ ใช้ทาบางๆ แล้วล้างให้ยาซึมเข้าเนื้อ ไปและปล่อยให้แห้งทั้งคืน จากการทดลองพบว่า หูดหายไปใน 72% ของผู้หญิง และ 33% ในผู้ชาย (intention-to-treat analysis) อัตราการหายของผื่นในผู้ชาย

ต่ำกว่าผู้หญิงเนื่องจากผู้ชายในการศึกษานี้เป็นคนที่ทำ circumcision และรอยโรคหูดที่บริเวณ vulva ของผู้หญิงนั้นมี keratinization น้อยกว่าบริเวณ shaft of penis ในผู้ชาย ส่วนรายงานใน uncircumcised male นั้น พบว่า clearance rate อยู่ที่ประมาณ 62% [122] เนื่องจากว่ามี semioclusive effect ของ foreskin แต่พบมี local side effect มากกว่า เช่น erythema, erosion, burning, itching, irritation และ pain

ในการศึกษา open-label Phase III ที่ศึกษาประสิทธิภาพของยาในการรักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศ โดยวิธีทายาแบบเดียวกันในผู้ป่วยทั้งหมด 943 ราย พบว่าผู้ป่วย 451 ราย (47.8%) หูดหายไปหลังทายา 16 สัปดาห์ ส่วนผู้ป่วยที่หูดยังไม่หายให้ทายาต่ออีก 16 สัปดาห์ พบว่า overall clearance rate เท่ากับ 53.3% ระยะเวลาเฉลี่ยของการรักษา (median time to total clearance) เท่ากับ 8.8 สัปดาห์ โดยเพศหญิงมีอัตราการหายสูงกว่าเพศชาย คือ 65.4% และ 44.1% ตามลำดับ [123]

เนื่องจากยาไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายจึงทำให้อัตราการกลับเป็นซ้ำ (recurrence rate) ต่ำ และต่ำกว่าการรักษาด้วยวิธี ablative หรือ destructive อื่นๆ คือประมาณ 10-20% เท่านั้น หลังจากติดตามผู้ป่วยไปประมาณ 3 เดือน

หูดบริเวณผิวหนัง Common Warts

ใน open-label trial ทายา 5% อิมิดควิมอดคริม วันละครั้ง สัปดาห์ละ 5 วัน นาน 16 สัปดาห์ พบว่ามีผู้ป่วย 28 ใน 50 ราย (56%) ที่ขนาดหูดลดลงมากกว่า 50% หรือหูดหายหมด โดยพบว่าอัตราการตอบสนองของหูดคือกับหูดบริเวณ ลำตัว หน้า และมือ มากกว่าเท้า และไม่พบมีผู้ใดกลับเป็นหูดซ้ำ หลังติดตามผู้ป่วยไปเป็นเวลา 32 สัปดาห์ [13]

มีหลายงานวิจัยที่แสดงถึงประสิทธิภาพดีของยาในการรักษาหูด common warts ในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเกิดการติดเชื้อ HPV มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลดีของยา 5% อิมิดควิมอดคริมในการรักษาหูดราบ (flat warts) บริเวณใบหน้าที่ต้องได้รับการรักษา

เมื่อเปรียบเทียบการรักษาด้วยยา 5% อิมิดควิมอดคริม กับ ablative treatment แบบเก่า เช่น cryotherapy หรือ laser therapy ที่มักจะทำให้เจ็บ ดังนั้นการรักษาด้วยวิธีการทายานี้จึงเหมาะกับผู้ป่วยเด็กที่เป็นหูด

หูดข้าวสุก Molluscum Contagiosum

ใน open-label trial ทายา 5% อิมิดควิมอดคริม ในการรักษาหูดข้าวสุก พบว่ามีผู้ป่วย 12 ใน 15 ราย (80%) ที่ขนาดหูดข้าวสุกลดลงมากกว่า 50% หรือหูดหายหมด [13] และอีกการศึกษาหนึ่งให้ทายา 5% อิมิดควิมอดคริม วันละครั้ง 3 วันต่อสัปดาห์ พบว่าผู้ป่วยเด็ก 6 ใน 13 ราย ผู้ป่วยที่มีภาวะ

ภูมิคุ้มกันบกพร่อง 14 ใน 19 ราย และผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีทุกราย หูดข้าวสุกหายหมดหลังได้รับการรักษาไม่เกิน 16 สัปดาห์ และพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี ไม่มีผู้ป่วยรายใดที่กลับเป็นซ้ำหลังจากติดตามผลเป็นเวลา 3 เดือน [124]

แม้ว่าจะไม่พบผลข้างเคียงที่รุนแรงในการใช้ยา 5% อิมิกวิมอดครีมในการรักษาหูดที่อวัยวะเพศในผู้ใหญ่ แต่ในเด็กซึ่งมีชั้นผิวหนังชั้นขี้ไคล (stratum corneum) บางกว่า มีพื้นที่ผิวหนังมากกว่า ทำให้ต้องคำนึงถึงปริมาณการใช้ยา และผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้ทั้งเฉพาะที่ และทั่วร่างกายในเด็ก โดยพบว่ามีการศึกษานำร่อง (Pilot study) การศึกษาหนึ่งที่ทำให้เด็กอายุ 4-10 ปี ทายา 5% อิมิกวิมอดครีมในการรักษาหูดข้าวสุก ทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทำการประเมินผลข้างเคียงเฉพาะที่ และผลข้างเคียงทั่วร่างกายที่เกิดจาก IFN โดยพบว่าไม่มีผู้ป่วยเด็ก 5 ใน 12 รายที่ไม่มีผลข้างเคียงเฉพาะที่ และไม่พบผลข้างเคียงที่รุนแรง [125]

ข้อห้ามใช้ (Contraindications)

ยังไม่ทราบแน่ชัด ไม่แนะนำให้ใช้ยาอิมิกวิมอดครีมรักษาภาวะติดเชื้อไวรัสบริเวณทางเดินปัสสาวะ ภายในช่องคลอด ปากมดลูก ลำไส้ใหญ่ ภายในทวารหนัก เนื่องจากยังไม่มีผลการประเมินผลการรักษาในโรคดังกล่าว [126]

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (Side effects)

รายงานผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่พบบ่อยจากการศึกษาทดลอง คือ อาการเฉพาะที่ทางผิวหนังและบริเวณที่ทายา อาการอื่นไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นมักไม่ค่อยรุนแรงถึงรุนแรงปานกลาง

ผลข้างเคียงของผิวหนังที่ทายา ประกอบด้วย

- แดง (redness)
- บวม (swelling)
- ผิวหนังเป็นแผลหรือตุ่มน้ำ (sore, blister, ulcer)
- ผิวหนังแข็งหรือหนาขึ้น (skin that becomes hard or thickened)
- ผิวหนังลอก (skin peeling)
- ผิวหนังมีสะเก็ด (scabbing and crusting)
- ปวด (pain)

- เจ็บ (tenderness)
- คัน (itching)
- แสบร้อน (burning)

ผลข้างเคียงที่พบน้อย ประกอบด้วย

- ผิวหนังเปลี่ยนสี (changes in skin color)
- ปวดศีรษะ (headach)
- ปวดหลัง (back pain)
- ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ (muscle aches)
- อ่อนเพลีย (tiredness)
- คล้ายเป็นหวัด (flu-like symptoms)
- ต่อม้ำเหลืองโต (swollen lymph node)
- ท้องเสีย (diarrhea)

ปฏิกิริยากับยาอื่น (Drug interactions)

ยังไม่มีข้อมูล

ขนาดบรรจุยา

ยา 5% อิมิดควิมอดครีมบรรจุในซอง หนึ่งซองมีเนื้อครีม 250 มิลลิกรัม เท่ากับมีปริมาณยา 12.5 mg ของอิมิดควิมอด สามารถทาบริเวณ ผิวหนังพื้นที่ประมาณ 20 ตารางเซนติเมตร

การเก็บรักษา

ควรเก็บยาในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส และหลีกเลี่ยงการแช่แข็ง

บทที่ 5

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ (Real Time PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เป็นขบวนการทางอณูชีววิทยาทางห้องปฏิบัติการ และกล่าวได้ว่าเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญที่สุดวิธีหนึ่งในการศึกษาทางพันธุวิศวกรรมในการเพิ่มขยายปริมาณกรดนิวคลีอิกจากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ หรืออาจเรียกว่า "molecular photocopying" ที่มีความไวสูง และวิธีทำสะดวก ไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว เทคนิค PCR ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ.1983 โดยศาสตราจารย์ Kary Mullis ซึ่งได้ความคิดขณะขับรถในเทือกเขาแถบรัฐแคลิฟอร์เนีย และ ทำให้เขาได้รับรางวัลโนเบลในสาขาเคมีในปี ค.ศ.1994 [127, 128]

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ เช่น โรคติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย [129, 130] โรคทางพันธุกรรมต่าง ๆ [131] โรคมะเร็ง [132] รวมถึงการประยุกต์ใช้ในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ [133] โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกรณีโรคติดเชื้อบางชนิด PCR สามารถให้การวินิจฉัยในระยะเริ่มแรก (early diagnosis) ซึ่งช่วยให้การรักษาโรคมมีประสิทธิภาพดีขึ้น เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซี [134] herpes simplex virus (HSV) encephalitis [135] การติดเชื้อ HIV ในเด็กทารกที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อ HIV [136] เป็นต้น

ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย โมเลกุลต้นแบบ (template molecule) ซึ่งอาจเป็น DNA หรือ RNA ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ สายนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ที่มีลำดับเบสจำเพาะคู่สมกับ template (primer molecules) เพื่อเป็นตัวเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณ template DNA

องค์ประกอบของวิธี PCR [137-141]

PCR เป็นวิธีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนในหลอดทดลองที่มี deoxy nucleotide triphosphate (dNTP) ในส่วนประกอบสารละลายที่เหมาะสม โดยแต่ละลำดับของปฏิกิริยา PCR จะถูกควบคุมโดยเครื่อง Thermal cycler ปฏิกิริยา PCR จะทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ บริเวณที่อยู่ระหว่าง oligonucleotide primer 2 สาย (รูปที่ 23) ซึ่งเรียกว่า forward primer และ reverse primer

องค์ประกอบในการทำ PCR

ประกอบด้วย

1. **ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)** คือ ดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยส่วนของยีนหรือดีเอ็นเอที่ต้องการสังเคราะห์โดยอาจสกัดได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ หรือได้จากวิธีการทางอนุชีววิทยาอื่นๆ

2. **Oligonucleotide primer** เป็น nucleotide สายสั้นๆ ซึ่งเริ่มต้นจับกับยีนหรือดีเอ็นเอต้นแบบสายตรงข้ามซึ่งเป็นคู่สมกัน (complementary) โดยทั่วไป primer นี้ ได้จากการออกแบบโดยลำดับเบสที่เหมาะสมซึ่งอาจใช้ซอฟต์แวร์ได้ และ primer นี้จะถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วยเครื่อง Oligonucleotide synthesizer ซึ่งปัจจุบันมีบริษัทและองค์กรซึ่งรับสั่งผลิตในประเทศไทย

อย่างไรก็ตามในการปฏิบัตินั้นพบว่า บางครั้ง primers ที่ถูกออกแบบมาตรงตามหลักเกณฑ์ อาจไม่ได้ผลดีเมื่อใช้ทำ PCR ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบ primers ในปฏิกิริยาก่อนจึงจะทราบว่า คู่ primers ที่ได้ทำงานได้เหมาะสมหรือไม่ ความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสม คือ 0.1 – 1 μM พบว่าความเข้มข้นของ primer ที่ใช้ถ้ามากเกินไป อาจก่อให้เกิดการจับผิด (mispriming) หรือทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ (PCR product) ที่ไม่จำเพาะได้

3. **Deoxy nucleotide triphosphate (dNTP)** คือเบสที่จะถูกนำเข้าไปต่อจากสาย primer ระหว่างการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ dNTP ที่ใช้จะประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP โดยทั่วไปใช้ความเข้มข้น 20-200 ไมโครลิตร

4. **Buffer** เป็นสารละลายที่ทำให้ปฏิกิริยา PCR เป็นไปได้อย่างเหมาะสมซึ่งประกอบด้วย Tris HCl, KCl, และ MgCl_2 โดยที่ความเข้มข้นของ Mg^{2+} มีผลต่อปฏิกิริยาอย่างมาก กล่าวคือความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เปลี่ยนไปจะทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่มีปริมาณแตกต่างกัน โดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR จะใช้ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 1.5-2.0 mM การเพิ่มหรือลดปริมาณ Mg^{2+} บางครั้งจะช่วยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นได้ แต่หากความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกินไปจะทำให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการขึ้นได้ ในทางปฏิบัติควรมีการทดลองใช้ MgCl_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นของ MgCl_2 ที่เหมาะสมที่สุด

5. **เอนไซม์ DNA polymerase** โดยทั่วไปที่ใช้ได้ผลดี คือ เอนไซม์ Tag polymerase ซึ่งเป็นกุญแจสำคัญของ PCR โดยที่ Taq คือชื่อย่อของ *Thermus aquaticus* แบคทีเรียที่อาศัยและเพิ่มจำนวนในบ่อน้ำพุร้อน PCR จึงเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง ทนความร้อนทำให้สามารถใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้หลายๆ รอบ ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 1-2.5 unit ต่อปฏิกิริยา ปัจจุบันมีการค้นพบ Scoffel fragment ของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษสามารถทำงานได้ดีในช่วงกว้างของความเข้มข้น Mg^{2+} ตั้งแต่ 2-10 mM และทนความร้อนได้

ดีกว่า ซึ่งมีประโยชน์ในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบที่มี G-C มาก หรือมีโครงสร้างทุติยภูมิ สามารถเพิ่มอุณหภูมิได้สูงขึ้นในขั้นตอนแยกดีเอ็นเอให้กลายเป็นเส้นเดี่ยว (denaturation)

ปัจจุบันเอนไซม์ Taq polymerase ถูกนำมาใช้ในวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ด้านต่างๆ ได้แก่ การตรวจหาจุลชีพที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อต่างๆ โดยเฉพาะจุลชีพที่มีการเพาะเลี้ยงยาก หรือมีปริมาณน้อยในสิ่งส่งตรวจ การตรวจหาการกลายพันธุ์ในยีนของสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยเฉพาะยีนมนุษย์

นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์ DNA polymerase ชนิดที่ทนความร้อนสูงมากยิ่งขึ้นมาใช้ในเทคนิค PCR ได้แก่ vent DNA polymerase ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 98°C เอนไซม์ชนิดนี้สามารถสร้างดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ได้ถึง 8-13 kb สำหรับ deep vent DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย Pyrococcus species ซึ่งอยู่ในบริเวณรอยแยกใต้ทะเลลึก สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 104°C เอนไซม์นี้มีประโยชน์ในปฏิกิริยา PCR ที่มีดีเอ็นเอต้นแบบที่มีโครงสร้างทุติยภูมิเป็น stable hair-pin loop

6. เครื่อง thermal cycler เป็นอุปกรณ์หลักที่สำคัญในการทำ PCR (รูปที่ 35-36) ซึ่งเป็นเครื่องที่สามารถตั้งโปรแกรมให้เพิ่มลดอุณหภูมิเป็นรอบๆ ตลอดจนสามารถตั้งจำนวนรอบตามที่ผู้ปฏิบัติงานต้องการได้ นอกจากนี้ยังต้องการอุปกรณ์สำหรับทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ PCR products ที่ได้ ส่วนวัสดุที่ใช้ใช้นั้น ได้แก่ microtubes, micropipettes tips และ autopipette

หลักการออกแบบ Primers [142]

การออกแบบ primer นับว่าเป็นขั้นตอนสำคัญในการทำ PCR การมี primer ที่ดีเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้ได้ผลผลิต PCR ที่ต้องการ แต่หาก primer ไม่ดีอาจทำให้ไม่ได้ผลผลิต PCR หรือได้ผลผลิตที่เราไม่ต้องการเกิดขึ้นได้ ข้อควรพิจารณาในการออกแบบ primer คือ

1. เลือกตำแหน่งที่อยู่ขนานข้างดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการทำการสังเคราะห์โดยตำแหน่งของ primer ทั้งสองเส้นควรมีระยะห่างกัน 100-2000 คู่เบส และลำดับเบสที่ตำแหน่งนี้ควรมีการกระจายแบบสุ่ม ไม่ควรเลือกบริเวณที่มีการเรียงตัวซ้ำๆ กันของลำดับเบส เพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้ primer สามารถไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบแบบไม่จำเพาะ
2. เลือก primer ที่มีการกระจายตัวของเบสต่างๆ เหมือนกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยควรมีจำนวนของ GC content มากกว่า 50%
3. Primer ควรมีความยาวประมาณ 17-30 nucleotides
4. ไม่ควรเป็น polypurines หรือ polypyrimidines

5. หลีกเลี่ยงการใช้ primer ที่อาจเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เช่นมีลักษณะ hairpin หรือ primer dimer โดยตรวจ primer ทั้งสองเส้นต้องไม่มีปลายด้าน 3' ที่ complementary กัน

ขั้นตอนของ PCR และวงรอบปฏิกิริยา (PCR Cycle)

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. Heat denaturation step

คือ การแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-96 °C เพื่อทำลายพันธะ hydrogen bond ระหว่างสายดีเอ็นเอทำให้ได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยว 2 สาย

2. Primer annealing หรือ hybridization step

เป็นขั้นตอนที่ทำให้ primers ทั้ง 2 เส้น ไปจับกับสายเดี่ยวดีเอ็นเอ ที่คู่สมกัน (complementary) ที่แยกจากกันในการ denature โดยลดอุณหภูมิจากขั้นตอนแรกลงมา ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 50-60 °C ในบางครั้งการเพิ่มอุณหภูมิ annealing จะช่วยลดความผิดพลาดของ mispriming ได้

3. DNA synthesis หรือ Extension step

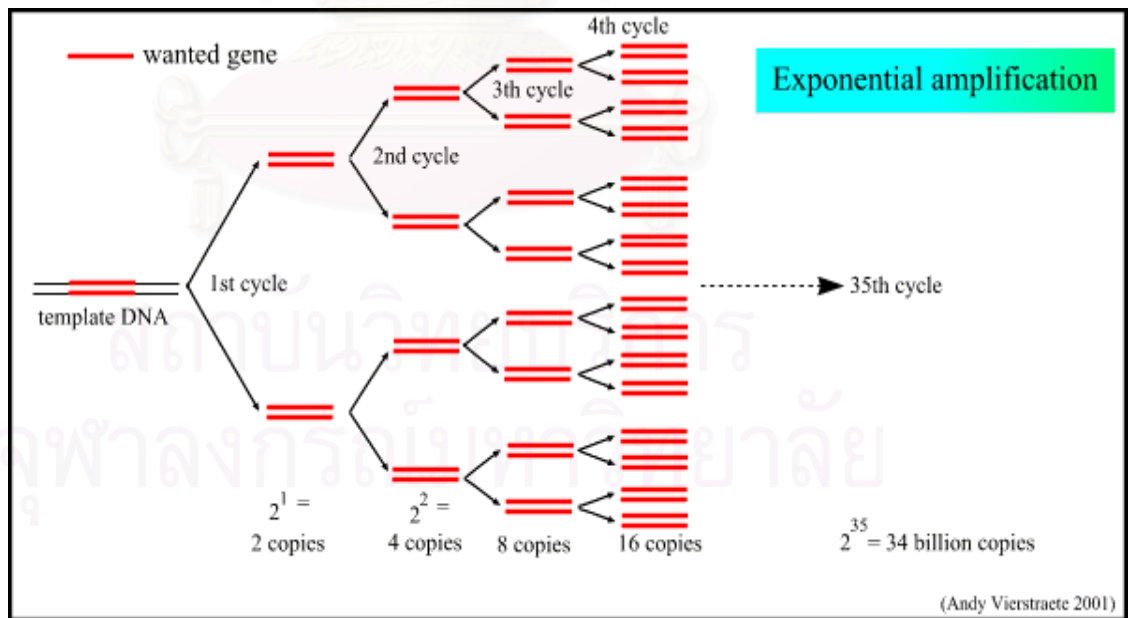
คือขั้นตอนที่เอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อน ซึ่งก็คือ Taq polymerase สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจาก primer โดยการนำ nucleotide (dNTP) ที่เหมาะสมเข้าไปต่อที่ละตัวในทิศทาง 5' → 3' ที่สายใหม่ ที่อุณหภูมิประมาณ 72 °C ทำให้ได้สายใหม่ของดีเอ็นเอ จับคู่กับ template DNA เป็นสองคู่

ขั้นตอนที่ 1- 3 รวมเรียกว่า 1 รอบ (cycle) เมื่อจบ 1 รอบจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มจาก 1 คู่เป็น 2 คู่ ซึ่งสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในรอบต่อไป โดยดีเอ็นเอจำนวน 2 คู่ จะแยกได้เป็นสายเดี่ยว 4 สาย เมื่อได้รับความร้อน (denaturing step) และเมื่อลดอุณหภูมิลง primers ก็เข้ามาจับ (primer annealing) เกิด extension step ต่อไป เมื่อจบรอบ 2 จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 4 คู่ และเมื่อจบรอบ 3 จะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 8 คู่

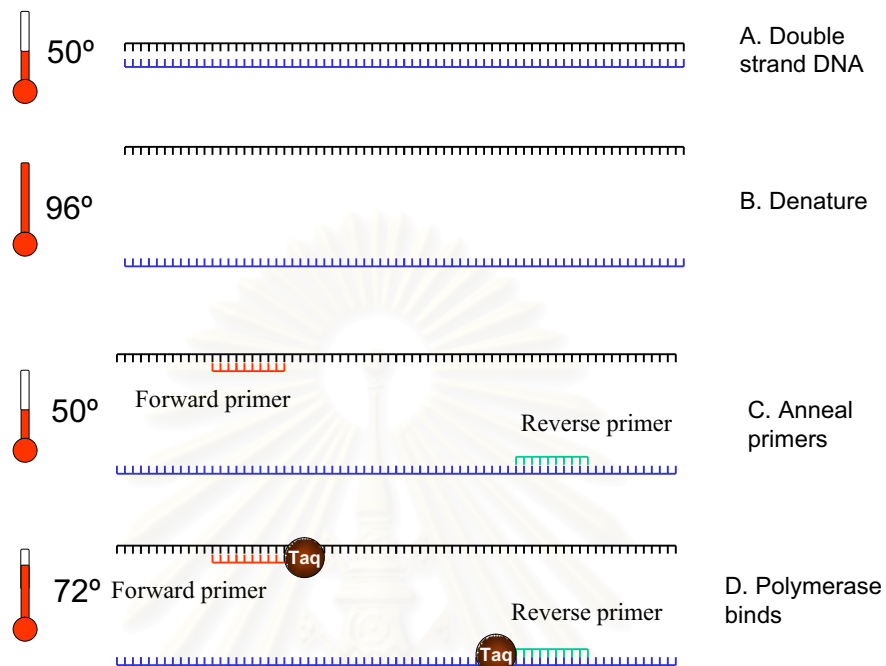
ในแต่ละรอบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะได้ปริมาณ DNA ที่ขยายเพิ่มจำนวนมากขึ้นเป็นทวีคูณ คือ หรือเรียกว่าเป็นแบบ exponential คือเป็นสองเท่าในแต่ละครั้งของ cycle (รูปที่ 22) แต่ละ cycle ใช้เวลา 1-3 นาที ดังนั้นในเวลาเพียง 45 นาที ปริมาณ DNA จะเพิ่มเป็นล้านเท่า ปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้เมื่อสิ้นสุดรอบสุดท้ายของปฏิกิริยาสามารถคำนวณได้จากสูตร 2^n

เมื่อ n คือ จำนวนรอบของปฏิกิริยา (2, 3, 4) ดังนั้นถ้าเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยทำปฏิกิริยา 20 รอบ จาก DNA 1 คู่ ก็จะได้ดีเอ็นเอทั้งหมด $= 2^{20}$ หรือจำนวนมากกว่าล้านคู่ (1,048,576 คู่) แต่ถ้ามีดีเอ็นเอตั้งต้นหลายคู่ จะทำให้ปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนนั้นมีมากถึง $N_0 \times 2^n$ เมื่อ N_0 คือ ปริมาณดีเอ็นเอที่ตั้งต้น

แต่อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติพบว่า การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในรอบท้ายๆ จะไม่เป็นแบบทวีคูณดังที่คำนวณตามทฤษฎี ผลของการเพิ่มจำนวนจะเกิดเป็น amplification plateau ซึ่งอาจเกิดจากการที่เมื่อปฏิกิริยา PCR ดำเนินไประยะหนึ่ง ปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีจำนวนมากขึ้นจนกระทั่งมากกว่าจำนวน primers ที่มีเหลือในปฏิกิริยา ดังนั้นสายดีเอ็นเอต้นแบบที่มีมากขึ้นจะจับคู่กันเองมากกว่าจับกับ primers ในขณะเดียวกันปริมาณของ dNTP และ primers อาจจะถูกใช้หมดในปฏิกิริยา (ในแต่ละรอบของ PCR นั้น primer จะถูกใช้ไปในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ) และเอ็นไซม์ Tag DNA polymerase จะเสื่อมไปตามเวลา ซึ่ง Tag DNA polymerase มีครึ่งชีวิตประมาณ 40 นาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และอาจเกิดจาก End product inhibition ซึ่งผลที่ตามมาของ plateau effect คือ product ที่ไม่จำเพาะจาก mispriming จะมาแข่งขันในปฏิกิริยาและเพิ่มจำนวนขึ้น วิธีป้องกันที่ดีที่สุดคือ การปรับตั้งจำนวนรอบในการทำ PCR ให้เหมาะสม

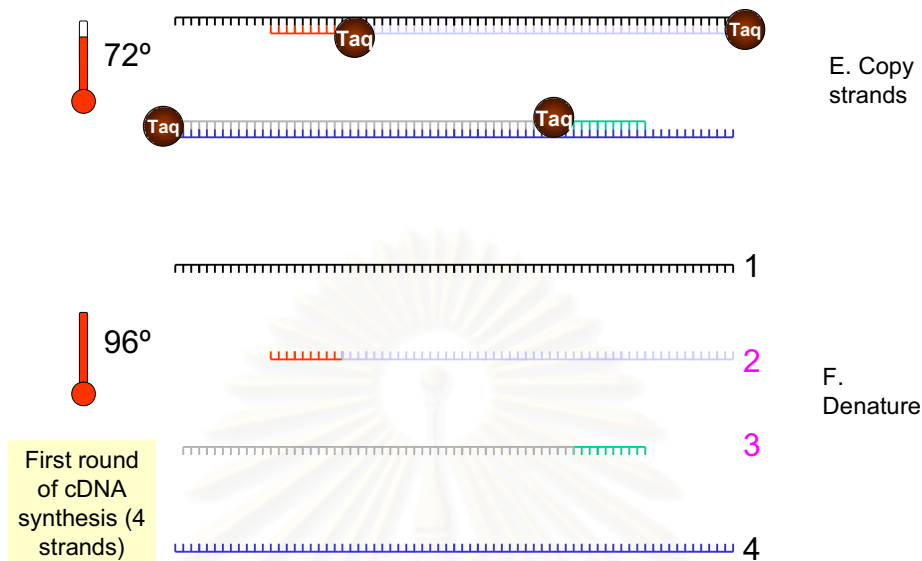


รูปที่ 23 แสดงการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ในแต่ละรอบเป็นทวีคูณ (exponential amplification)



รูปที่ 24 แสดงการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

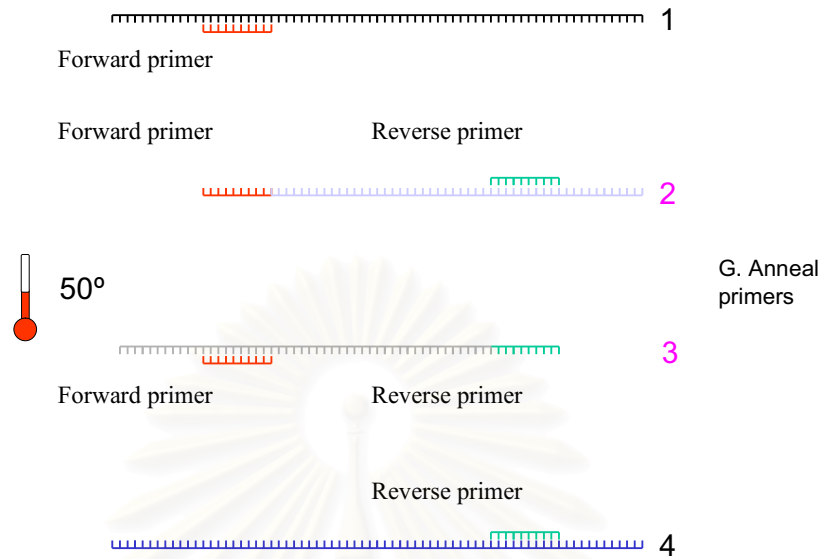
- เริ่มต้นจากดีเอ็นเอต้นแบบสายคู่
- การแยกคู่สายดีเอ็นเอต้นแบบจากกัน (denaturing) ที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
- การจับคู่สมระหว่าง primer กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส
- การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA synthesis หรือ extension) โดยการนำเบส A, G, T และ C มาต่อส่วน primer ในทิศทาง 5' ไป 3' ที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส



รูปที่ 25 แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ในการสังเคราะห์ cDNA

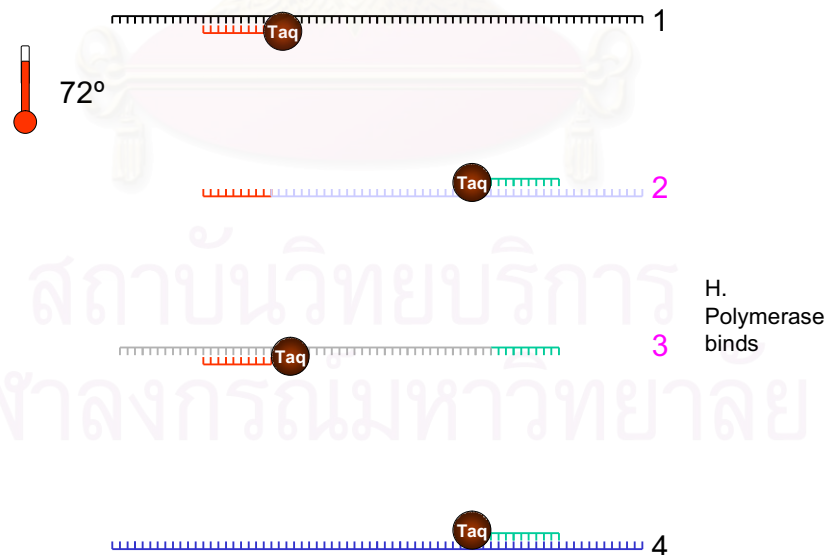
- E. เมื่อจบ 1 รอบจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มจาก 1 คู่ เป็น 2 คู่ ซึ่งสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในรอบต่อไป
- F. โดยดีเอ็นเอจำนวน 2 คู่จะแยกเป็นดีเอ็นเอ สายเดี่ยวทั้งหมด 4 สายเมื่อได้รับความร้อน (denaturation step)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



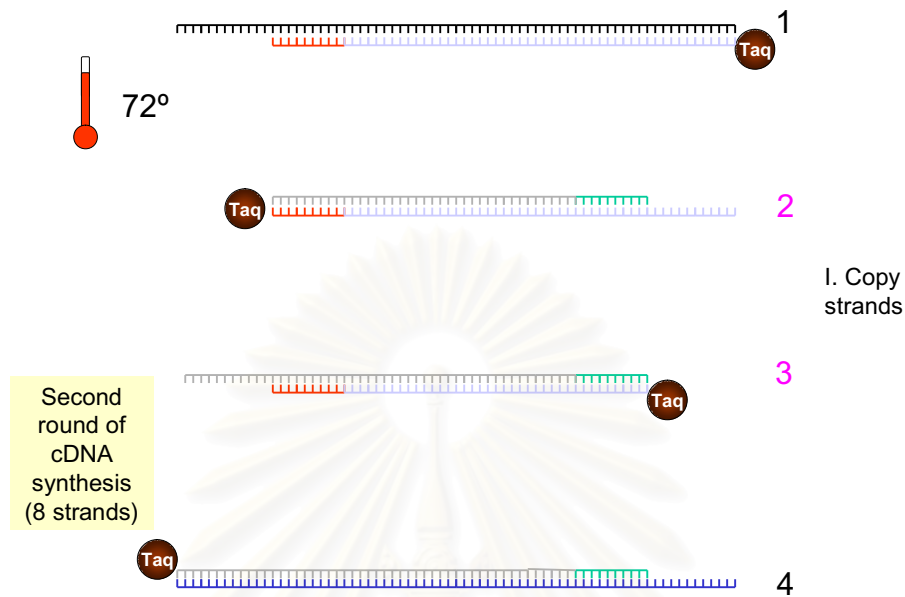
รูปที่ 26 แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

- G. เมื่อแยกดีเอ็นเอออกเป็นสายเดี่ยวแล้ว การทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ forward primer และ reverse primer ไปเข้าคู่กับดีเอ็นเอ (annealing)



รูปที่ 27 แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

- H. การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (DNA synthesis หรือ extension) โดยการนำเบส A, G, T และ C มาต่อส่วน primer ในทิศทาง 5' ไป 3' ที่อุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส



รูปที่ 28 แสดงขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

I. เมื่อสังเคราะห์จบ 2 รอบจะได้ดีเอ็นเอ เพิ่มเป็น 4 คู่ หรือ 8 copy strands

การทำ PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูง แต่ครั้งหนึ่งจะใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณไม่มาก หรือไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์มาก และทำในปริมาณที่น้อยเพียง 50-100 ml ใน PCR tube ขนาด 500 ml ที่ทำด้วยพลาสติกบาง นำความร้อนได้ดี ซึ่งจะถูกนำไปวางในเครื่อง DNA thermal cycler ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมงต่อครั้ง อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาการทำ PCR ใน capillary tube ปริมาตรเพียง 1-2 ml ซึ่งทำให้ประหยัดค่าเอนไซม์ และทำได้ในเวลารวดเร็วประมาณ 30 นาที

การป้องกันการปนเปื้อนใน PCR

การทำ PCR นั้นจำเป็นจะต้องมีความระมัดระวังเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ซึ่งอาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ดังนี้ [143]

1. สถานที่ : ในการทำ PCR ควรแยกบริเวณที่ทำ PCR เป็นสัดส่วน และควมใช้เครื่องมือแยกชุดต่างหาก สำหรับทำ PCR โดยเฉพาะ (รูปที่ 28)

2. การ autoclave : สำหรับ microtube และ pipett tips ควรมีการทำลาย DNA โดย autoclave ก่อนใช้ หรืออาจใช้ filter pipette tip
3. น้ำ : แหล่งปนเปื้อนที่สำคัญที่มักจะถูกละเลยคือ แหล่งน้ำที่ใช้ในการทำ PCR ซึ่งทำให้การทำ PCR ไม่ได้ผลตามที่ต้องการ ดังนั้นผู้ทำงานในห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องดูแล และคอยเปลี่ยนวัสดุกรองน้ำตามความจำเป็น
4. PCR reagent: สารที่ใช้สำหรับการทำ PCR (PCR reagent) ควรแบ่งไว้เป็นหลอดเล็กๆ (aliquot) โดยแบ่งให้พอที่จะใช้แล้วทิ้งหลอดเลยหลังใช้
5. ตัวควบคุม : ควรใช้ตัวควบคุมทั้ง positive control และ negative control เสมอ ทุกครั้งที่ทำ PCR เพื่อให้แน่ใจว่า ผลที่ได้ที่น่าเชื่อถือ และมีการป้องกันไม่ให้ผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ไว้ก่อนกลับมาปนเปื้อนในปฏิกิริยาใหม่



รูปที่ 29 แสดงอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการสกัด mRNA และการทำ PCR ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

การจัดแบ่งห้องสำหรับทำ PCR

การจัดวางสถานที่ในห้องปฏิบัติการเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากผลผลิต PCR ที่จะก่อให้เกิดผลบวกปลอมนั้น มีหลักการอยู่ 2 แบบ [144-146] คือ

1. ป้องกันไม่ให้มี DNA ที่ไม่ต้องการ เช่น ผลผลิต PCR หรือ จากตัวอย่างตรวจอื่น ปนเข้าไป ในตัวอย่างตรวจ ขณะเตรียม DNA lysate และ PCR reagent ทำได้ด้วยการแบ่งห้องออกเป็น 3 ห้องที่ชัดเจน ได้แก่ ห้อง pre-PCR เป็นห้องที่ใช้เตรียม PCR reagent และ DNA lysate ห้องนี้จะเป็นห้องแรก ห้องที่สอง ได้แก่ ห้อง PCR เป็นที่ตั้งของ DNA thermal cycler โดย PCR tube ที่มาจากห้อง 1 จะถูกนำมาใส่เครื่องนี้ ห้ามเปิดฝา PCR tubes ที่ทำเสร็จแล้ว และห้องที่สาม คือ ห้อง post-PCR เป็นห้องที่ใช้ตรวจหาผลผลิต PCR โดย PCR tubes จากห้องที่สองถูกนำมายังห้องที่สามนี้ และถูกทิ้งไว้ในห้องนี้ จะไม่มีการนำ PCR tubes หรือสิ่งที่อยู่ในห้อง post-PCR ย้อนกลับผ่านเข้าไปในห้อง pre-PCR และ post-PCR
2. เป็นการควบคุมไม่ให้ผลผลิต PCR ปนเปื้อนไปยังช่วงที่ทำ pre-PCR ทำได้ด้วยการรวมห้อง PCR และ post-PCR อยู่ด้วยกัน แยกออกมาจากห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ใช้เตรียม PCR reagent และ DNA lysate การผ่านเข้าออกห้องนี้ จะต้องมีการสวมเสื้อกาวน์ที่ใช้เฉพาะในห้องนั้น ใส่พลาสติกคลุมรองเท้า หรือเปลี่ยนรองเท้า ห้ามนำสิ่งของแม้แต่กระดาษออกจากห้องนี้ เพื่อ กันไม่ให้มีการแพร่กระจายของผลผลิต PCR ออกไป ดังนั้นส่วนอื่นๆของห้องปฏิบัติการจะเป็นพื้นที่สะอาดปราศจากการปนเปื้อนของผลผลิต PCR ของใช้ต่างๆสำหรับทำ PCR จะต้องแยกใช้ตามห้องที่แยกไว้ ไปเปิดควรจะใช้แบบที่ผ่าน autoclave ได้ และควรฉายแสง UV เสมอ ขั้นตอนการแยก DNA หรือ RNA จากตัวอย่างตรวจ ควรเลือกแบบที่สั้นทำเสร็จเร็ว เพื่อลดโอกาสของการปนเปื้อน ห้องต่างๆที่ใช้ทำ PCR ควรจะเปิด UV light ทุกครั้งเมื่อไม่มีการใช้

การแยกอาร์เอ็นเอ (RNA isolation)

หลักการการเก็บ และการแยกอาร์เอ็นเอ มีดังนี้

1. การเก็บอาร์เอ็นเอควรเก็บไว้ในสภาพที่ปลอดเอนไซม์ Ribonuclease (Ribonuclease-free conditions)

เนื่องจากเอนไซม์ RNases จะทำให้เกิดการทำลายอาร์เอ็นเอได้ การทำให้อยู่ในสภาพปลอดเอนไซม์ ได้แก่

 - a. การอบด้วยความร้อน (autoclave) จะสามารถทำลายเอนไซม์ ribonucleases ซึ่งพบใน laboratory solutions หลายชนิดได้ แต่อย่างไรก็ตามการอบก็ไม่สามารถทำลายเอนไซม์บางชนิดได้ เช่น RNase A

- b. การเติมสาร diethyl pyrocarbonate (DEPC) ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง (inactivators) เอนไซม์ ribonucleases ที่แรงแต่ก็ไม่สามารถทำลายได้ทั้งหมด DEPC สามารถเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ RNA โดยการ carboxymethylation ซึ่ง DEPC จะถูกทำให้หมดฤทธิ์ที่อุณหภูมิสูง และเปลี่ยนแปลงไปเป็น ethanol และ CO₂
- c. อุปกรณ์ทั้งหลายที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น conical tubes และ pipettes ควรใช้ชนิดที่ปลอดเอนไซม์ ribonucleases

2. การวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ (Quantitation of RNA)

การวัดปริมาณอาร์เอ็นเอทำได้โดยการวัดการดูดแสง (absorbance) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer วัดออกมาเป็นค่า optical density (OD) ของ RNA ที่ absorbance wavelength ที่ 260 nm หน่วยของ OD unit ที่วัดได้คือ $\mu\text{g/ml}$

การปนเปื้อนของ RNA preparation ด้วยโปรตีนแสดงให้เห็นโดยวัดค่า OD ได้ที่ความยาวคลื่น (absorbance wavelength) ที่ 280 nm ซึ่งถ้ามีการปนเปื้อนของโปรตีนจะพบมีค่าของ 260/280 absorbance ratio ต่ำลง ซึ่งถ้าต่ำกว่า 1.6 แสดงให้เห็นว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอย่างมาก แต่ถ้ามีการปนเปื้อนของ DNA จะไม่สามารถแยกได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer เนื่องจากทั้งดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอดูดแสงมาที่จุดที่ความยาวคลื่น 260 nm

3. การตกตะกอน และจัดเก็บอาร์เอ็นเอ (Precipitation and storage of RNA)

การตกตะกอนอาร์เอ็นเอ เหมือนในดีเอ็นเอ คืออาร์เอ็นเอสามารถตกตะกอนได้ด้วย alcohol และเกลือ โดยการใช้ 1 ใน 10 ของ 3 M sodium acetate (pH5.2) ร่วมกับ 2.0-2.5 volume of ethanol ตามด้วยการปั่น (centrifuge) และทำให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจาก RNA ตกตะกอนได้เป็น RNA pellet แล้วทำให้แห้งโดยใช้ air drying หรือ speed-vacuum drying

หลังจากได้ RNA แล้วถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ในส่วนผสมของ ethanol และ salt จะสามารถเก็บไว้ได้นานเป็นปี แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจะเก็บไว้ได้สั้นกว่าไม่เกิน 1 เดือน

4. การแยกอาร์เอ็นเอด้วย TRIzol™ Reagent

สาร TRIzol™ เป็น mono-phasic solution ของ phenol guanidine isothiocyanate ใช้สำหรับแยก RNA จากเซลล์ และ เนื้อเยื่อ นอกจากนั้นยังทำให้ RNA มีความคงทน ขณะที่ทำการแยกและละลายเซลล์ออกจากกัน

5. การกำจัด Ribonuclease ที่ปนเปื้อนโดยใช้ RNase AWAY

RNase AWAY เป็นสารที่พร้อมใช้สำหรับกำจัด Ribonuclease และ DNA ที่ปนเปื้อนทั้งในพลาสติก และอุปกรณ์ที่เป็นแก้ว

ขั้นตอนการเก็บ และแยกอาร์เอ็นเอ ประกอบด้วย

1. การบด (Homogenization)

- Tissues: บดตัวอย่างเนื้อเยื่อใน TRIzol reagent 1 ml ต่อชิ้นเนื้อ 50-100 mg
- Cells grown in monolayers: ทำให้เซลล์แตกใน culture dish โดยตรง
- Cells grown in suspension: ทำให้เซลล์แตกโดยการ pipetting ซ้ำๆ

2. การแยกชั้น (Phase separation)

อบตัวอย่างที่บดแล้วในตู้อบ หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาทีเพื่อให้เกิดการแยกของ nucleoprotein complexes ได้สมบูรณ์ เติมสาร chloroform 0.2 ml ต่อ สาร TRIzol 1 ml เขย่าแรงให้เข้ากัน 15 วินาที แล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นที่ความเร็ว 12,000 * g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากการปั่นสารตัวอย่างจะแบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ

- ชั้นล่าง : lower red, phenol-chloroform phase
- ชั้นกลาง : interphase
- ชั้นบน : colorless upper aqueous phase

พบว่า RNA จะมีอยู่เฉพาะใน aqueous phase ซึ่งคิดเป็น 60% ของปริมาณ TRIzol reagent ที่ใช้ในการบด (homogenization)

3. การตกตะกอนอาร์เอ็นเอ (RNA precipitation)

ทำการเก็บแยกสารตัวอย่างในชั้น aqueous phase ใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ ทำการตกตะกอน RNA ใน aqueous phase โดยผสมกับ isopropyl alcohol 0.5 ml ต่อ สาร TRIzol 1 ml แล้วนำไปอบ และปั่นต่อไปจนได้ RNA ที่ตกตะกอนลงมาเป็น gel-like pellet กันหลอดทดลอง

4. RNA wash

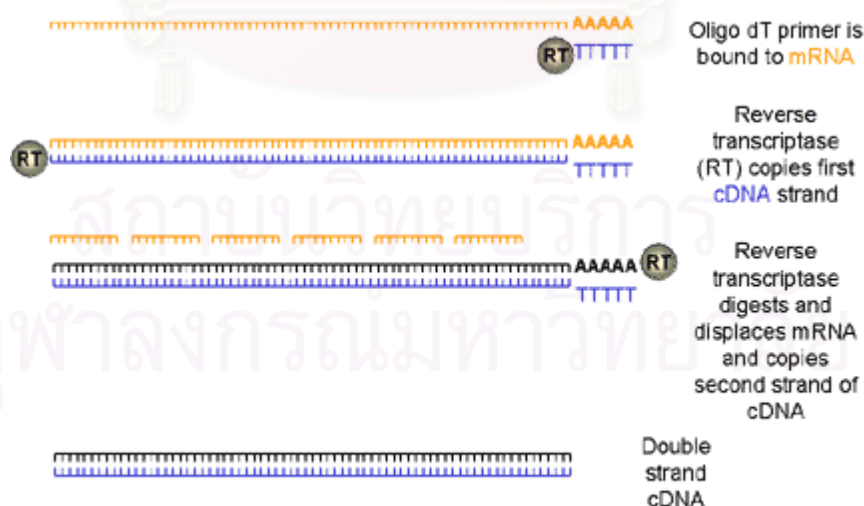
ทำการล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ (RNA pellet) ด้วย 75% ethanol โดยเติม ethanol อย่างน้อย 1 ml ต่อ สาร TRIzol 1 ml แล้วปั่นด้วยความเร็ว $7,500 \times g$ เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. Redissolving of RNA

ทำ RNA pellet ให้แห้งด้วย air-dry หรือ vacuum-dry เป็นเวลานาน 5-10 นาที

การสร้าง complementary DNA (cDNA synthesis)

การสร้าง cDNA คือ สร้างจาก cDNA เกือบคู่จาก mRNA ที่ต้องการศึกษา โดยการทำ reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (รูปที่ 16) คือ การเปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA ก่อนด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase และใช้ oligo dT เป็น Primer หลังจากนั้นใช้สารละลายต่าง หรือเอนไซม์ RNase H ย่อย mRNA ทิ้งไป ตามด้วยการทำ PCR ตามปกติ ทำให้ได้ cDNA เกือบคู่ ซึ่งสามารถนำไปตรวจสอบยีนจำเพาะได้



Conversion of mRNA to cDNA by Reverse Transcription

รูปที่ 30 แสดงการสร้าง cDNA เกือบคู่จาก mRNA ด้วยวิธี

Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

เอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นดีเอ็นเอ (Reverse transcriptase; RT)

คือ เอนไซม์ที่เปลี่ยน mRNA ให้เป็น cDNA หรือการสร้าง DNA จาก RNA ต้นแบบนั่นเอง ในปัจจุบันมี 2 ชนิด

1. Avian reverse transcriptase ซึ่งเตรียมจาก avian myeloblastosis virus (AMV)
2. Murine reverse transcriptase ซึ่งเตรียมจาก *E.coli* ที่ express rt gene ของ moloney murine leukemia virus

โดย RT ทั้ง 2 ชนิดนี้จะไม่มีความสมบัติของ 3' → 5' exonuclease

ปฏิกิริยาลูซิโพลีเมอร์เรสแบบบอกปริมาณ (Real Time PCR)

เป็นวิธีที่พัฒนามาจากเทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายคู่ในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องเป็นทวีคูณ วิธี real time PCR ต่างจากวิธี PCR ทั่วไป โดยสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอเป้าหมายได้ ในทุกช่วงของปฏิกิริยา ขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ ปริมาณดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอเป้าหมายที่วัดขึ้นอยู่กับปริมาณของสาร ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent reporter) โดยสัญญาณนี้จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วน โดยตรงกับปริมาณของผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบ ในขณะที่วิธี PCR ทั่วไปจะวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนสุดท้ายของปฏิกิริยาลูซิโพลีเมอร์เรส โดยการตรวจสอบด้วยการใช้กระแสไฟฟ้าผ่านเจล (agarose gel electrophoresis) ซึ่งจะใช้เวลาในการหาปริมาณดีเอ็นเอและผลที่ได้ขึ้นอยู่กับการแยกขนาดโดยเจล ซึ่งอาจมีความแม่นยำไม่เพียงพอ และมีความไวต่ำกว่า

ประวัติความเป็นมาของ Real time PCR

ในปี ค.ศ. 1992 กลุ่มของ Russell Higushi ที่ Roche Molecular Systems ได้พัฒนาวิธีการวัดปริมาณ (quantitative) ผลผลิต PCR แบบ kinetic คือ ปฏิกิริยา PCR และการตรวจหาผลผลิต PCR จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ด้วยการใช้ ethidium bromide (EtBr) ที่จับกับดีเอ็นเอ ซึ่งจะให้ Fluoresces ออกมาวัดได้ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง ultraviolet โดยเป็นการวัดขณะที่ผลผลิต PCR ยังอยู่ใน PCR tube

ต่อมาในปี ค.ศ. 1995-1996 มีการผลิตเครื่องมือสำหรับทำ real-time PCR ชนิดแรก ได้แก่

Perkin-Elmer ABI Prism 7700 Sequence Detection System และตามมาด้วย LightCycler ของบริษัท Idaho Technology (ปัจจุบันผลิตและจำหน่ายโดย Roche Molecular Biochemicals) เครื่องมือทั้งสองชนิดใช้ Fluorogenic chemistry ในการวัดปริมาณผลผลิต PCR ดังนั้นเครื่องมือทั้งสองชนิดจึงเป็นทั้ง thermal cyclers และ optical detection systems ในเครื่องเดียวกัน

เครื่องมือที่ใช้ทำ real-time PCR

ปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ในปัจจุบัน ได้ก้าวหน้ามากขึ้น ทำให้สามารถตรวจนับปริมาณผลผลิตของ PCR ที่ได้ในแต่ละ cycle ไปพร้อมกับการทำการขยายเพิ่มจำนวน ในเวลาสั้น และทำได้ในปริมาณมาก (high throughput) ใช้น้ำยาในปริมาณลดลง เรียกว่า "kinetic" หรือ "real-time" PCR เครื่องมือที่ใช้เป็นระบบ Fluorescence-detecting thermocyclers โดยการใช้ Fluorescence dye ในขั้นตอน primer หรือ probe เพื่อให้ผลผลิตของ PCR ที่เป็น double strand DNA ถูกปิดฉลากด้วย Fluorescence

เครื่องมือที่ใช้ทำ Real-time, quantitative PCR มีหลายชนิดเช่น

1. Fiber-optic (Prism 7700)
2. Photo-diode/capillary (LightCycler)
3. CCD-camera (Geneamp 5700)

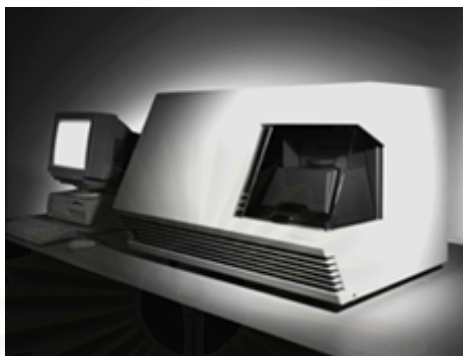
ส่วนน้ำยา Fluorescence chemistry ได้แก่

1. Probe (Taqman)
2. Dye-alone (SYBR Green I)

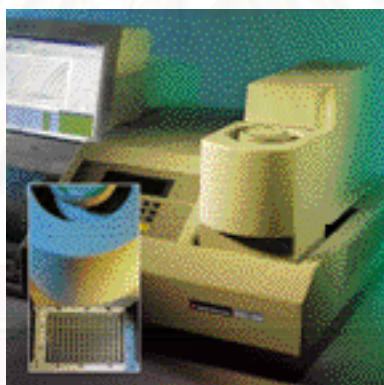
เครื่องมือ Fluorescence-detecting thermocycler ที่มีจำหน่ายเป็นเครื่องแรก คือ Prism 7700 (Perkin-Elmer/ABI) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้แสงเลเซอร์จับ Fluorescence ที่อยู่ในผลผลิต PCR ใน 96-well thermocycler block โดยที่สามารถทำ multiplex PCR ที่มีมากกว่าหนึ่ง target DNA ได้ด้วยการใช้ Fluorescence probe ที่ต่างกัน GeneAmp 5700 (Perkin-Elmer/ABI) เป็นเครื่องมือทำ PCR แบบ kinetic ที่ราคาถูกกว่ารุ่น 7700 เนื่องจากสามารถอ่านสัญญาณ Fluorescence ได้แค่คลื่นเดียว และใช้ CCD-camera สำหรับการจับและวัด Fluorescence

LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) (รูปที่ 36) นั้นเป็นเครื่องมือที่สามารถทำ PCR ได้ในปริมาณน้อยมากใน glass capillary tubes ที่ถูกเสียบเข้าตามช่องใน carousel จำนวน 32 ช่อง ที่มี air stream ร้อนและเย็นผ่าน ทำให้เวลาที่ใช้ต่อหนึ่ง cycle ลดลงเหลือแค่เพียง 10 วินาที แต่ละรอบของ PCR สัญญาณ Fluorescence จะถูกอ่านจาก carousel ผ่าน light-emitting diode และมี photo

(detection) diode จำนวน 3 ตัว ทำให้สามารถอ่าน Fluorescent probe ที่ให้สัญญาณคลื่นที่ต่างกันได้ในเวลาที่ใช้ในการทำ PCR จะน้อยกว่า ABI7700 3-5 เท่า



รูปที่ 31 แสดงเครื่อง PCR รุ่น 7700 Applied Biosystems



รูปที่ 32 แสดงเครื่อง PCR รุ่น 5700 Applied Biosystems



รูปที่ 33 แสดงเครื่อง PCR รุ่น FluorTracker Stratagene



รูปที่ 34 แสดงเครื่อง PCR รุ่น FluorImager Molecular Dynamics



รูปที่ 35 แสดงเครื่อง PCR รุ่น iCycler BioRad



รูปที่ 36 แสดงเครื่อง PCR รุ่น LightCycler (Roche)



รูปที่ 37 แสดงเครื่อง Real Time PCR รุ่น LightCycler (Roche Molecular Biochemicals)
ต่อกับเครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับประมวลผลที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้



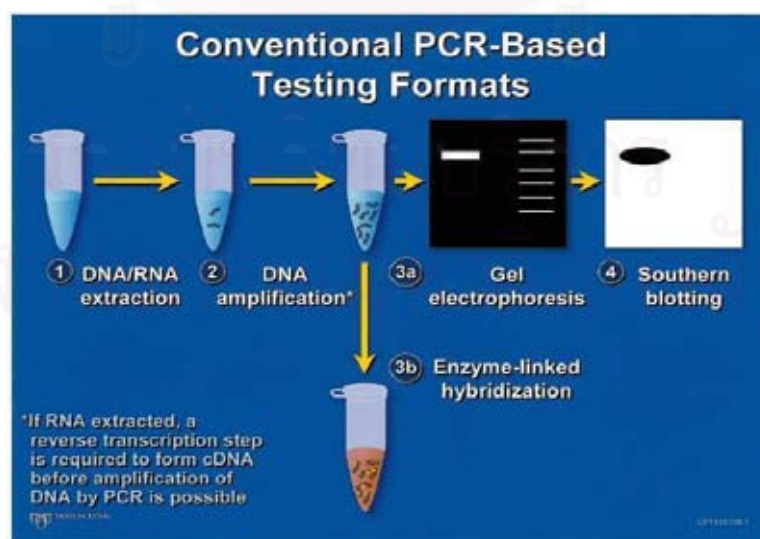
รูปที่ 38 แสดงเครื่อง LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) ที่ใช้ในการวิจัยนี้

ข้อจำกัดของ PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR)

PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) มีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้อยู่หลายประการ เช่น

1. Conventional PCR ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ได้ แม้ว่าจะมีการพัฒนา quantitative PCR รูปแบบต่าง ๆ [147] แต่ส่วนใหญ่วิธีการจะค่อนข้างยุ่งยาก ในทางปฏิบัติไม่เหมาะสำหรับการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ๆ โอกาสเกิดความผิดพลาดในการทำ และ/หรือ ความถูกต้องแม่นยำมีมาก และ reproducibility ต่ำ ประกอบกับในปัจจุบันความต้องการการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในงานต่าง ๆ มีมากขึ้น เช่น การติดตามการรักษา [148-150] การตรวจวินิจฉัยโรคบางโรค เช่น การ reactivation ของเชื้อ cytomegalovirus [151] การตรวจวิเคราะห์การควบคุมระดับการแสดงออกของยีนต่าง ๆ [152]

2. การตรวจวิเคราะห์ผลของ conventional PCR ส่วนใหญ่จะใช้การทำ agarose gel electrophoresis ซึ่งใช้เวลานาน (1-2 ชั่วโมง) ไม่เหมาะสมหรือไม่ทันการในทางปฏิบัติสำหรับประยุกต์ใช้ในงานการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่ต้องการผลแบบเร่งด่วน (rapid diagnosis) เช่น การตรวจหาสาเหตุเชื้อสาเหตุของอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ นอกจากนี้ลักษณะการตรวจวิเคราะห์ผลดังกล่าวยังก่อให้เกิดการฟุ้งกระจายของ PCR products ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดการปนเปื้อนแบบ carry over contamination นำไปสู่การเกิดผลบวกเท็จ (false positive) [153]



รูปที่ 39 แสดงขั้นตอนการทำ PCR แบบดั้งเดิม

หลักการของ Real Time PCR

จากข้อจำกัดของ conventional PCR ดังกล่าวข้างต้น ทำให้มีการพัฒนาเทคนิค Real time PCR หรือ Kinetic PCR [154] ขึ้น ความสำเร็จของเทคนิค real time PCR เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหา PCR products ในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่าง ๆ และการพัฒนาเครื่อง thermocycler ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่อง real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR products และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้น การทำ real time PCR จึงเป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอเป้าหมาย ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ ในทุกช่วงของปฏิกิริยาขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ โดยวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์ของ PCR จากความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อยออกมาจากสารเรืองแสง ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับผลิตภัณฑ์ของ PCR ซึ่งต่างจาก conventional PCR ซึ่งการตรวจ PCR products จะกระทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุดแล้ว

การที่เราสามารถตรวจวัด PCR products ได้ เกิดจากการทำให้ PCR products สามารถเกิดสัญญาณการเรืองแสงได้ ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. การใช้สารไปจับกับ double-stranded-DNA (SybrGreen I)
2. การใช้ fluorescent probes (FAM, TAMRA, JOE, ROX,...)

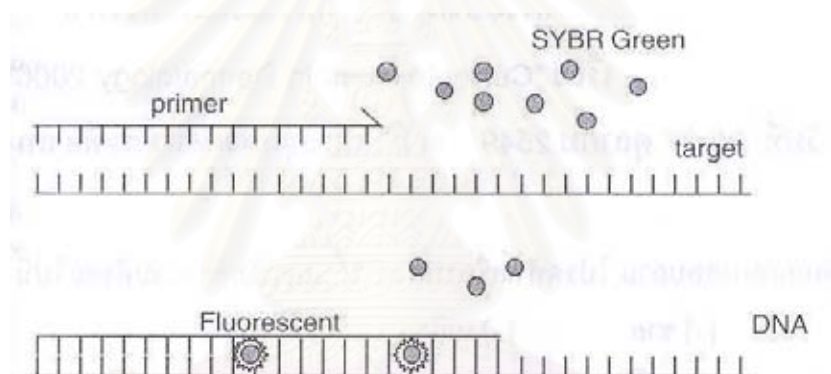
ซึ่งอาจแบ่งย่อยเป็นชนิดต่างๆ ด้วยกัน 4 วิธีหลัก คือ

1. Probe hydrolysis
2. Hybridisation of 2 probes
3. Molecular beacons
4. Scorpion primer

1. SYBR Green [155, 156]

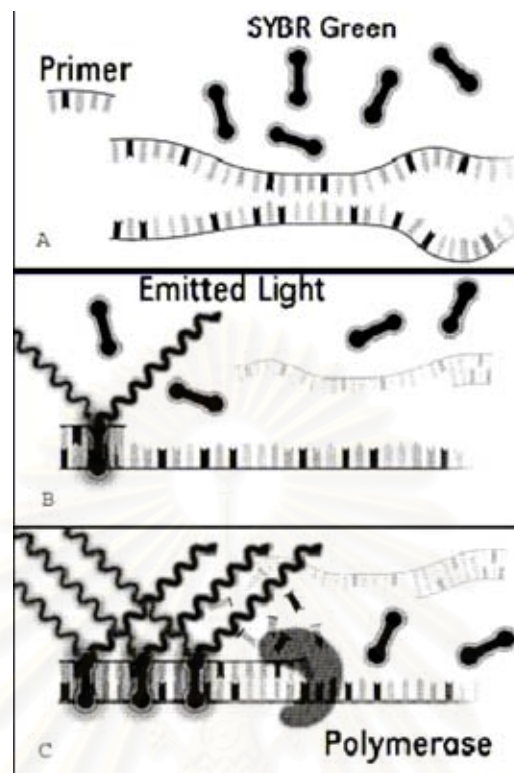
เป็นสารเรืองแสง (Fluorochrome) ที่สามารถจับกับช่องระหว่างคู่สายดีเอ็นเอ ที่เรียกว่า minor groove เมื่อ SYBR Green I เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่น (λ) ยาวขึ้น สามารถวัดความเข้มของสารเรืองแสงที่ปล่อยออกมาจะเพิ่มขึ้น ตามปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มขึ้นซึ่งพลังงานแสงเหล่านี้ตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง Real time Thermocycler

แม้ว่าการจับของ SYBR Green I กับดีเอ็นเอสายคู่ เป็นแบบไม่จำเพาะ เราสามารถแยกสัญญาณการเรืองแสง (fluorescence signal) ที่เกิดจาก primer-dimer และ/หรือ non-specific products อื่น ๆ ออกจาก specific amplified product ได้ด้วยการเปรียบเทียบค่า T_m โดยค่า T_m เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย แปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่ การหาค่า T_m จากเครื่อง real time thermocycler สามารถวิเคราะห์ได้จาก Melting curve [31] (ดูรูปที่ 3) โดยสัญญาณการเรืองแสงที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง พวก non-specific products หรือ primer-dimer จะมีค่า T_m แตกต่างจาก specific amplified product เช่น T_m ของพวก primer-dimer จะมีค่าต่ำ เนื่องจากมีขนาดสั้น (15-30 bp) ต่างจาก amplified DNA ซึ่งจะมีความยาวกว่า (>100 bp) และมีค่า T_m ที่สูงกว่า



รูปที่ 40 แสดงหลักการของ SYBR Green คือ เมื่อมีการสร้างสายคู่ของดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR สารเรืองแสง SYBR Green สามารถแทรกระหว่างคู่สายดีเอ็นเอ และปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์ออกมา ทำให้สามารถวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ได้ทุกช่วงเวลา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 41 แสดงการตรวจวัด PCR product ด้วย SYBR Green I

(A) ในช่วงเริ่มต้นของการ amplification ดีเอ็นเอสายคู่ถูก denature เพื่อสลายให้เป็นสายเดี่ยว SYBR Green I ยังไม่สามารถเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ ซึ่ง unbound dye molecules เหล่านี้ปล่อยสัญญาณการเรืองแสงเพียงเล็กน้อย

(B) เมื่อ PCR primer เข้าจับ (annealing) และสร้างดีเอ็นเอ สายใหม่ SYBR Green I จะเริ่มสอดแทรกเข้าสู่สายคู่ของดีเอ็นเอ และจะมีการเรืองแสง (emission) เมื่อถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสง

(C) ในช่วง DNA elongation จะมี SYBR Green I เข้าแทรกในสายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่เป็นจำนวนมาก เราสามารถตรวจจับการเรืองแสงอย่างต่อเนื่องแบบ real-time ได้ และเมื่อ PCR cycle เวียนกลับมาสู่ช่วงของการ denature SYBR Green I จะหลุดออกจากสายดีเอ็นเอ การเรืองแสงจะลดลง

ข้อดีของการใช้ SYBR Green

1. ราคาประหยัด ใช้งานง่าย
2. ไม่ยับยั้งปฏิกิริยาการ amplification
3. ไม่ต้องการ fluorescent probe ดังนั้นจึงไม่ต้องการการออกแบบ probes เฉพาะ
4. แม้จะมีการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอต้นแบบ ก็ไม่กระทบ

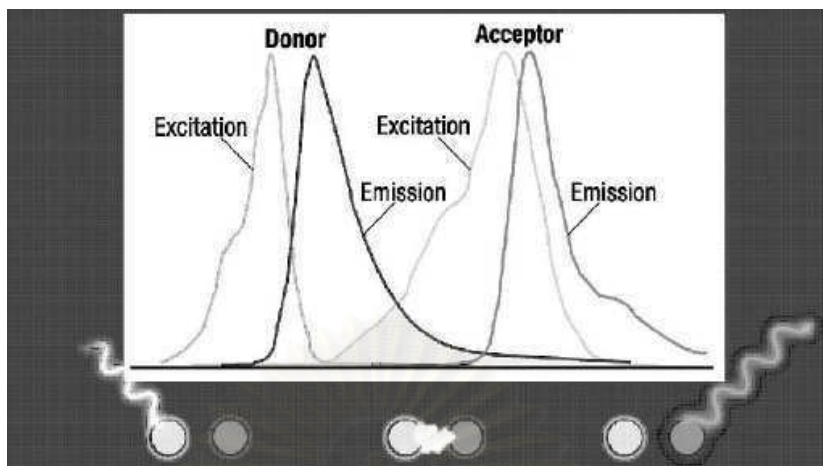
ข้อจำกัดของการใช้ SYBR Green

1. ไม่สามารถที่จะเจาะจง amplicons ได้
2. การจับคู่ไม่ดีทำให้เกิด positive forgeries หรือทำให้ค่าที่วัดได้มากเกินไปจริง
3. การปล่อยสัญญาณการเรืองแสงอาจถูกบดบังด้วยโมเลกุลของ DNA ที่ถูก amplified โดย amplicon ซึ่ง a longer amplicon จะสามารถจับกับ fluorescent molecules ได้ดีกว่า shorter amplicon ในปฏิกิริยาเดียวกัน
4. การจับของ SYBR Green I กับดีเอ็นเอสายคู่ เป็นแบบไม่จำเพาะ (unspecified mutagen capacity)

2. การใช้ probes ติดฉลากสาร fluorochrome โดยอาศัยเทคโนโลยีของ Fluorescence

Resonance Energy Transfer (FRET)

ในกรณีที่ต้องการความจำเพาะสูงสุด เช่น การบ่งชี้ single nucleotide mutations ในดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งไม่สามารถกระทำได้โดยการใช้ SYBR Green I Dye Probe ที่มีความจำเพาะกับ ดีเอ็นเอ Real-time PCR เป้าหมายและติดฉลากสาร Fluorochrome จะถูกนำมาใช้ในการตรวจหา โดยนำ Fluorochrome 2 ประเภทติดฉลากเข้ากับสายของ specific Probe เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง Fluorochrome ตัวแรกที่เราจะเรียกว่า Quencher (TAMRA) ซึ่งจะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้ Fluorochrome ตัวที่สองที่เรียกว่า Reporter dye (6-FAM, VIC, TET, HEX, JOE) โดยไม่สูญเสียพลังงานออกสู่ระบบภายนอก เมื่อ reporter molecule (Reforece dye, ROX) ได้รับพลังงานจาก Quencher จะปลดปล่อยพลังงานออกสู่ระบบภายนอกในรูปแบบของแสง ซึ่งเราสามารถตรวจวัดได้ ปฏิกิริยาดังกล่าวเรียกว่า Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) [32] (รูปที่ 40)



รูปที่ 42 แสดง Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) Fluorochrome ตัวแรกที่เราจะเรียกว่า Quencher fluorochrome (donor) จะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้ Reporter fluorochrome (acceptor) โดยไม่สูญเสียพลังงานออกมาสู่ระบบภายนอก เมื่อ reporter molecule ได้รับพลังงานจาก Quencher จะปลดปล่อยพลังงานออกมาสู่ระบบภายนอกในรูปแบบของแสง ซึ่งเราสามารถตรวจวัดได้

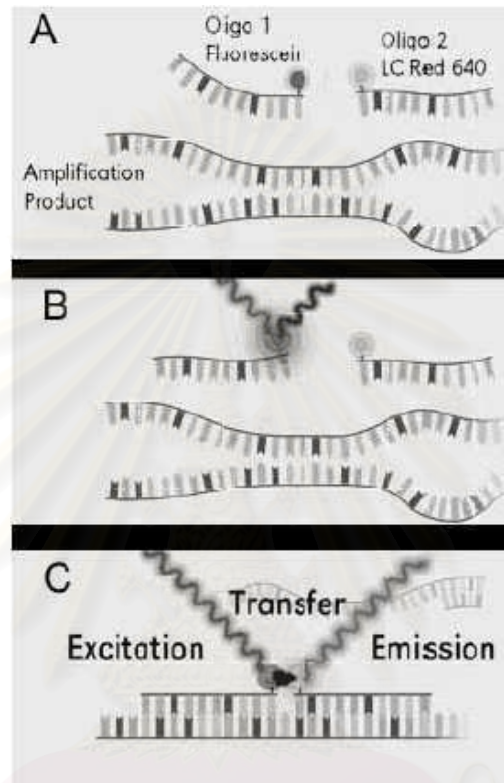
การติดฉลาก Fluorochrome เข้ากับตัว Probe เพื่อให้เครื่อง real time PCR สามารถตรวจจับสัญญาณเรืองแสง อันเกิดจากปฏิกิริยา FRET สามารถกระทำได้ในหลายลักษณะ เช่น

2.1 Hybridization probe [159]

โดยการใช้ Oligonucleotide Probe สายสั้นสองสาย โดยสายแรกติดฉลากที่ปลายข้าง 3' ด้วย Fluorescein ทำหน้าที่เป็น Quencher และสายที่สองติดฉลากด้วย สาร Red 640 หรือ Red 705 เข้าที่ปลาย 5' โดยที่ปลาย 3' ของ Oligonucleotide Probe สายที่สองจะถูกปิดด้วย Phosphate Group เพื่อให้ไม่สามารถทำหน้าที่เป็น PCR primer ได้ ทั้งนี้ Probe ทั้งสองเส้นจะมีลำดับเบสต่อเนื่องกันโดยเว้นช่วงระหว่าง ปลาย 3' ของ Oligonucleotide Probe เส้นแรก กับ ปลาย 5' ของ Probe อีกเส้นหนึ่งประมาณ 1-5 bp เมื่อ Probe ทั้งสองทำการ Hybridization กับดีเอ็นเอเป้าหมาย (PCR products) จะเกิด FRET ทำให้สามารถวัดสัญญาณการเรืองแสงได้ในทุกช่วงของขั้นตอนการ Annealing ในกระบวนการ PCR (รูปที่ 41)

Hybridization probe สามารถนำมาตรวจสอบ amplified products เพื่อบ่งชี้ single point mutation หรือ single nucleotide polymorphism (SNP) ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ SYBR Green I Dye ไม่สามารถทำได้ โดยเมื่อเพิ่มความร้อนขึ้นอย่างต่อเนื่อง probe ที่จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งมีเบสบาง

ตำแหน่งไม่คู่สม (mismatch) จะหลุดตัวออกมาก่อนในช่วงอุณหภูมิที่ต่ำกว่า ในขณะที่ probe หากจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีเบสคู่สมกันทั้งหมด (perfect match) probe ดังกล่าวจะหลุดตัวออกจากดีเอ็นเอเป้าหมายในช่วงอุณหภูมิที่สูงกว่า

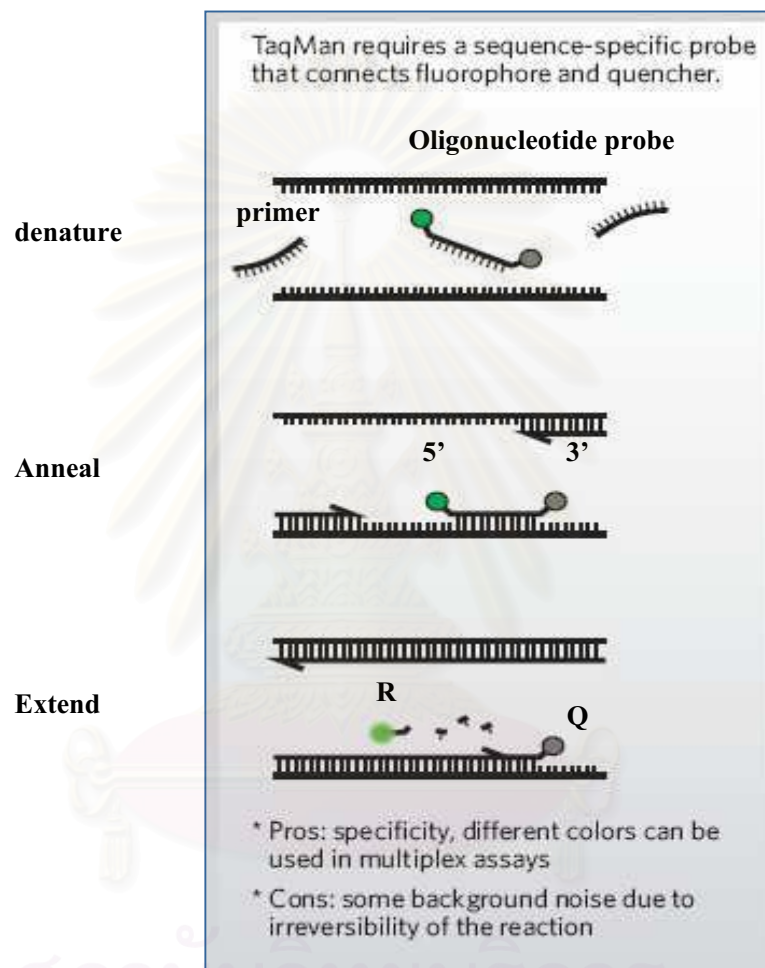


รูปที่ 43 แสดงการใช้ Hybridization probe เพื่อตรวจวัด PCR product ในช่วง denaturation จะไม่เกิด FRET ขึ้น (A และ B) เมื่อปฏิกิริยาดำเนินถึงช่วง annealing จะเกิด FRET ขึ้น สามารถตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงได้

2.2 Hydrolysis หรือ Taqman probe [160]

เป็นการใช้ oligonucleotide probe ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งปลายด้าน 5' ของ Probe ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่มีพลังงานสูง เรียกว่า Reporter dye และทางด้านปลาย 3' ห่างจาก Reporter dye ไม่เกิน 5 bp จะติดฉลากด้วยโมเลกุลที่มีพลังงานต่ำ เรียกว่า Quencher dye ถ้า probe นี้สมบูรณ์ หลังจากการ hybridization เมื่อ Reporter dye ถูกกระตุ้นด้วยแสงจะถ่ายเทพลังงานผ่านไปให้ Quencher dye ตัว Quencher dye ดูดซับพลังงานนั้นไว้แล้วคายพลังงานออกมาในรูปแบบของแสงที่มีช่วงความยาวคลื่นเพิ่มขึ้น เมื่อกระบวนการ PCR เข้าสู่ช่วงการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ (elongation) 5' exonuclease activity ของเอนไซม์ Taq (*Thermus aquaticus*) DNA Real-time PCR

polymerase จะทำการย่อย Taqman Probe ทำให้ Reporter dye หลุดเป็นอิสระ และห่างจาก Quencher ทำให้สามารถคายพลังงานในรูปของแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง (รูปที่ 42) ในการวิจัยนี้ใช้วิธี Tagman probe ในการหา 18S ซึ่งใช้เป็น Housekeeping gene



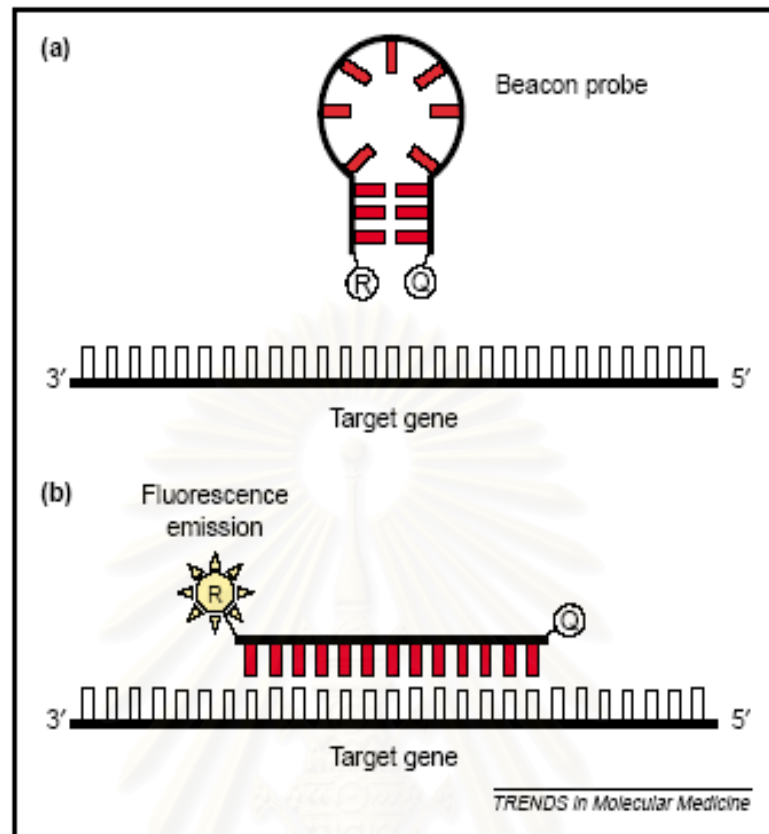
รูปที่ 44 แสดงหลักการของ Hydrolysis หรือ Taqman probe ซึ่งเป็น probe ที่มี ลำดับเบสจำเพาะกับดีเอ็นเอแม่แบบ ปลายด้าน 5' ติดฉลากด้วย Reporter dye (สีเขียว) และทางด้านปลาย 3' ติดฉลากด้วย Quencher Dye (สีเทา) หลังจากขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) primer และ probe จะจับอย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในขั้นตอนการจับกันระหว่างสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคู่สมกัน (annealing) จะไม่มีการปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารเรืองแสงบน probe ออกมา เนื่องจาก dyes สองชนิดอยู่ใกล้กัน เมื่อมีการสร้างสายดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ในขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอ (extension) probe จะถูกย่อยโดย 5' nuclease Activity ของ Taq polymerase ทำให้ reporter กับ quencher แยกออกจากกัน reporter จึงสามารถปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้

2.3 Molecular Beacons [161]

Molecular beacons เป็น oligonucleotide probe ที่มีลักษณะโค้งงอเป็น loop คล้ายกับหนีบผม (hair pin loop) โดยมีส่วนที่ยึดติดกันด้วยพันธะ hydrogen bond ประมาณ 5-7 nucleotides เป็นส่วนที่มีลำดับเบสเป็น G-C rich ทำให้ปลาย 5' และ 3' ที่ติดฉลากด้วย reporter และ quencher dye เข้ามาอยู่ใกล้กันจน quencher dye สามารถดูดซับพลังงานจาก reporter dye ได้ (ดูรูปที่ 8) บริเวณ loop ประมาณ 5-30 nucleotides จะถูกสร้างให้มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราต้องการตรวจหา เมื่อ Molecular Beacon เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย hairpin structure จะถูกสลายไป ทำให้ reporter dye ที่ 5' อยู่ห่างจาก quencher dye ที่ 3' end สามารถเปล่งสัญญาณแสงออกมาได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง (รูปที่ 43, 44)



รูปที่ 45 แสดง Molecular Beacon มีลักษณะเป็น hair-pin loop ทางปลาย 5' และ 3' ติดฉลากด้วย reporter และ quencher dye



รูปที่ 46 แสดงหลักการของ Molecular Beacon เมื่อยังไม่เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ปลาย 5' และ 3' ที่ติดฉลาก ด้วย reporter และ quencher dye จะอยู่ชิดกันจน quencher dye สามารถดูดพลังงาน จาก reporter dye แต่เมื่อเกิดการ hybridization ขึ้น reporter และ quencher dye จะอยู่ห่างกัน ทำให้ reporter dye สามารถเรืองแสงได้

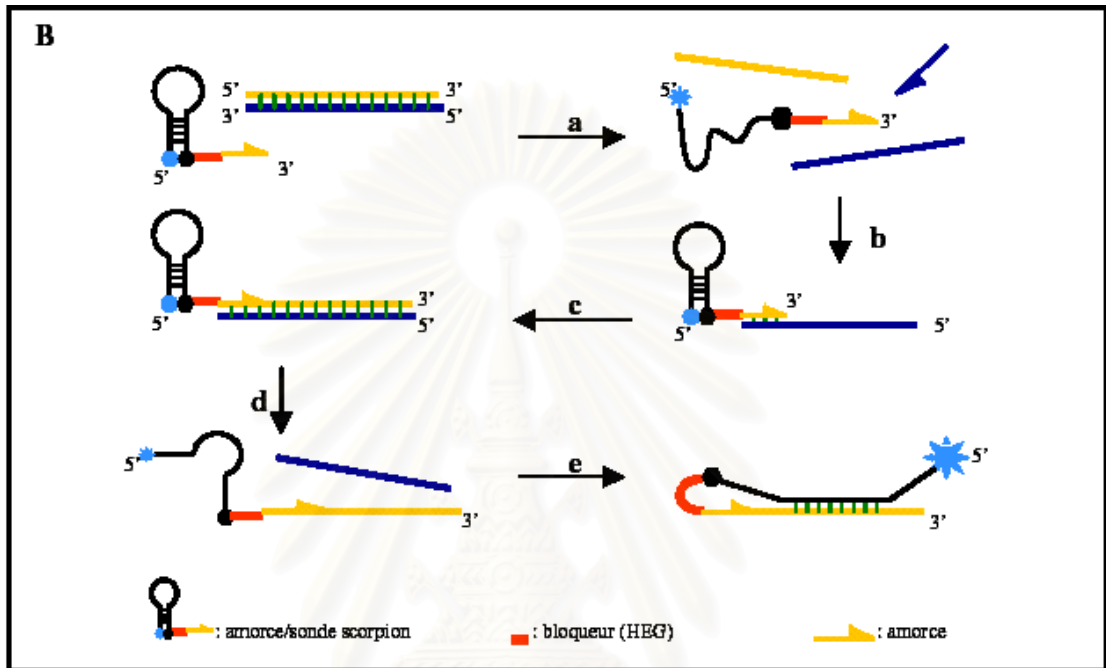
ข้อดีของ Molecular Beacon

1. มีความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำ (precision) สูง

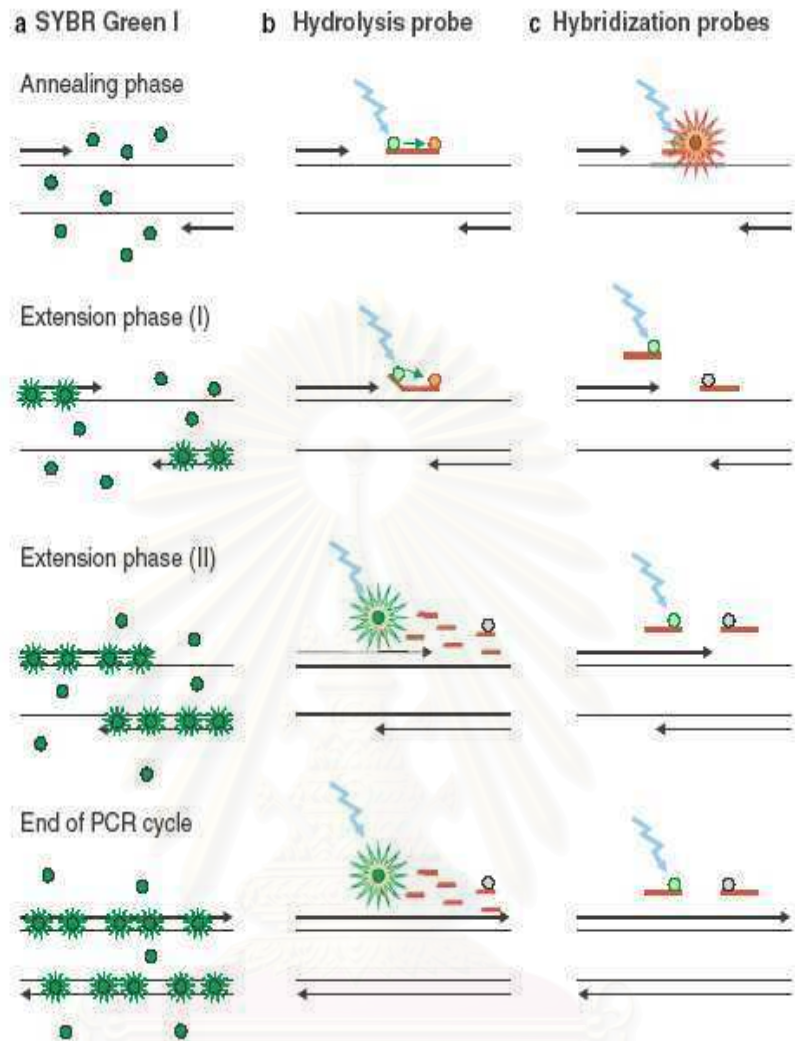
2.4 Scorpions [161]

เป็นวิธี Real time PCR ที่วิธีหนึ่ง ประกอบด้วย probe ที่มีรูปร่างเป็นตัวยู (hairpin loop) เกิดจากลำดับเบสบริเวณปลายทั้งสองข้างที่เป็นคู่สมกันอย่างจำเพาะ probe มีสารเรืองแสงซึ่งเป็นตัวให้สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ติดอยู่ที่ปลายด้าน 5' และมี quencher ทางด้านปลาย 3' การปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารเรืองแสงจะถูกกกดโดย quencher เมื่อ probe อยู่ในรูปตัวยู probe นี้จะถูกเชื่อมต่อกับที่ปลายด้าน 5' ของ primer ในขบวนการเพิ่มจำนวน PCR product จะมีการต่อเบสที่ปลายของ primer เพื่อให้ได้ PCR product ที่สมบูรณ์ โดย probe ที่ติดอยู่ที่ปลายด้าน 5' ของ primer จะมีลำดับเบส

จำเพาะที่สามารถจับกับลำดับเบสที่เป็นคู่สมภายในดีเอ็นเอสายเดียวกัน การจับนี้เป็นสาเหตุให้ hairpin loop ถูกเปิดออก ทำให้สารเรืองแสงสามารถให้สัญญาณได้ (รูปที่ 45)



รูปที่ 47 แสดงหลักการของ Scorpions คือ probe มี reporter (วงกลมสีฟ้า) อยู่ทางปลาย 5' ส่วนปลายด้าน 3' มี internal quencher probe (วงกลมสีดำ) อยู่ในรูปตัวยู เนื่องจากลำดับเบสบริเวณปลายทั้งสองข้างที่เป็นคู่สมกันจับกันจำเพาะ ทำให้ dye ทั้งสองอยู่ใกล้กัน เป็นสาเหตุให้การปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารเรืองแสงถูกกดโดย quencher การปล่อยแสงฟลูออเรสเซนซ์จะเกิดขึ้นต่อเมื่อ hairpin loop ถูกเปิดออก ซึ่งเกิดจากสายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่มีลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสในบริเวณบ่วงของ probe ทำให้ reporter แยกออกจาก quencher ให้สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมาได้

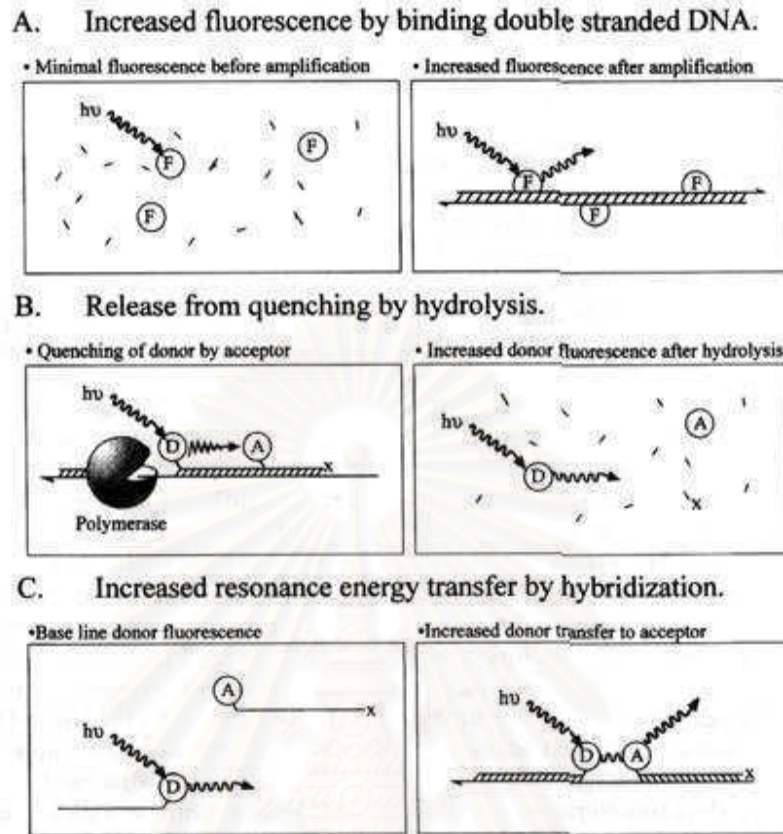


รูปที่ 48 แสดงการเปรียบเทียบหลักการของ Real-Time Quantitative PCR

- a) **SYBR Green I technique:** SYBR Green I จะมี ในระหว่าง extension phase สาร SYBR Green I จะจับกับ PCR product ทำให้เกิดการเรืองแสงเพิ่มขึ้นอย่างมาก และเมื่อเกิดปฏิกิริยาดำเนินไปเรื่อยๆในแต่ละรอบ จะสามารถตรวจจับสัญญาณ fluorescence ได้มากขึ้น
- b) **Hydrolysis probe technique:** hydrolysis probe หรือ Taqman probe ประกอบด้วย quencher fluorochrome ซึ่งจะดูดซับ fluorescence มาจาก reporter fluorochrome ในขณะที่ตัวมันอยู่ติดกัน จนกระทั่งถึงขั้นตอนการ amplification ตัว probe ถูกย่อย หรือ hydrolyzed ด้วยเอนไซม์ Taq polymerase ทำให้เกิดการแยก reporter และ quencher fluorochrome ออกจากกัน จึงสามารถตรวจจับสัญญาณการเรืองแสง fluorescence ของ reporter fluorochrome ได้ และระหว่างแต่ละรอบของ PCR cycle ที่เกิดขึ้นจะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของสัญญาณการเรืองแสง

fluorescence มากขึ้นเรื่อยๆจนเกิดการสะสมของ free reporter fluorochromes เป็นแบบ exponential

- c) **Hybridization probes technique:** เป็นการใช้ probe สั้นที่ติดฉลากปลายข้าง 3' ด้วยสาร donor fluorochrome และปลายข้าง 5' ที่อยู่ถัดไป ด้วย acceptor fluorochrome ทั้งสอง fluorochromes อยู่ใกล้กัน ห่างกันไม่เกิน 1–5 nucleotides การปล่อยแสงของ donor fluorochrome จะไปกระตุ้น acceptor fluorochrome ที่เรียกว่าการเกิดการส่งผ่านพลังงานที่เรียกว่า FRET เกิดขึ้น เป็นผลให้สามารถตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงได้ในขั้นตอนการ annealing และเริ่มเข้า extension phase ของปฏิกิริยา PCR และเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปเรื่อยๆ ในแต่ละรอบของ PCR cycle จะมี hybridization probe ที่เกิดการ anneal เพิ่มขึ้น ยิ่งทำให้มีการส่งสัญญาณการเรืองแสง fluorescence มากขึ้นเรื่อยๆ



รูปที่ 47 แสดงการเปรียบเทียบ 3 fluorescence monitoring system สำหรับ DNA amplification

System A: การใช้ dsDNA-specific dyes (F) เช่น SYBR[®] Green I ซึ่งสามารถเรืองแสง fluorescence ได้เมื่อจับกับ amplification product

System B: การใช้ dual-labelled probes ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 5'-exonuclease ในการแยก donor (D) และ acceptor (A) ด้วยวิธีการ hydrolysis ซึ่ง Donor จะมีการเรืองแสง fluorescence เพิ่มขึ้นเมื่อถูกแยกออกจาก acceptor quenching

System C: อาศัยการเกิด hybridization ของ donor (D) ข้างเคียง และ acceptor (A) probes ซึ่งการมาบรรจบชิดกันหลังเกิดขบวนการ hybridization ทำให้มี resonance energy transfer จาก donor ไปยัง acceptor เพิ่มขึ้น

"hv" หมายถึง excitation light และ "x" หมายถึง 3'-phosphate

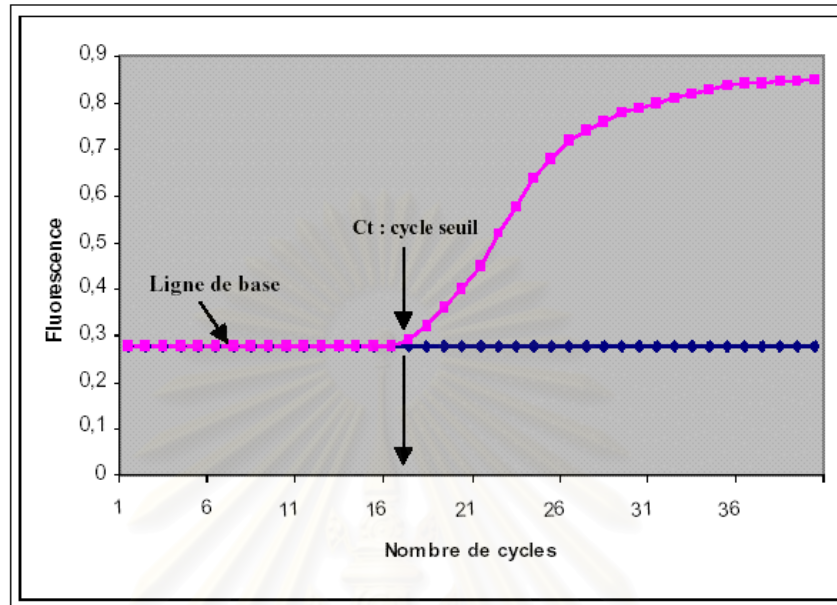
การแปลผล (Interpretation)

หลังจากการทำ real time PCR เสร็จสิ้น ข้อมูลจะถูกนำไปประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ของเครื่อง และแสดงผลออกมา โดยทั่วไปจะมีกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละรอบ (cycle) รวมถึงกราฟแสดงระดับความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลงใน PCR แต่ละรอบแบบ real-time การคำนวณหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์สามารถทำได้โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณ มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมควบคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการทราบปริมาณจากตัวอย่าง ข้อมูลที่ได้จากกลุ่มของดีเอ็นเอมาตรฐานจะถูกนำไปสร้างเป็น calibration graph เพื่อให้กลุ่มตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ ใช้เทียบเพื่อคำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้น

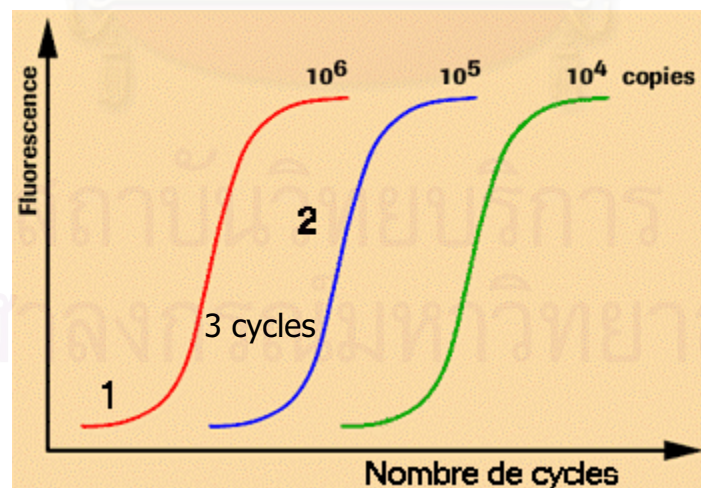
ในการศึกษาวิจัยนี้ ได้ใช้วิธี SYBR Green ในการทำ real time PCR เพื่อศึกษาระดับของ mRNA ของ Interferon alpha และใช้วิธี Tagman probe สำหรับ House keeping genes คือ 18S โดยเปลี่ยน mRNA ให้อยู่ในรูปของ cDNA ก่อน หลังจากนั้นก็นำไปเข้าเครื่อง real time PCR ก็จะได้ค่าออกมาในคอมพิวเตอร์ ซึ่งจะมีกราฟที่สำคัญดังนี้

1. Amplification curves
2. Standard curves
3. Melting curves (SYBR Green)

1. Amplification curves



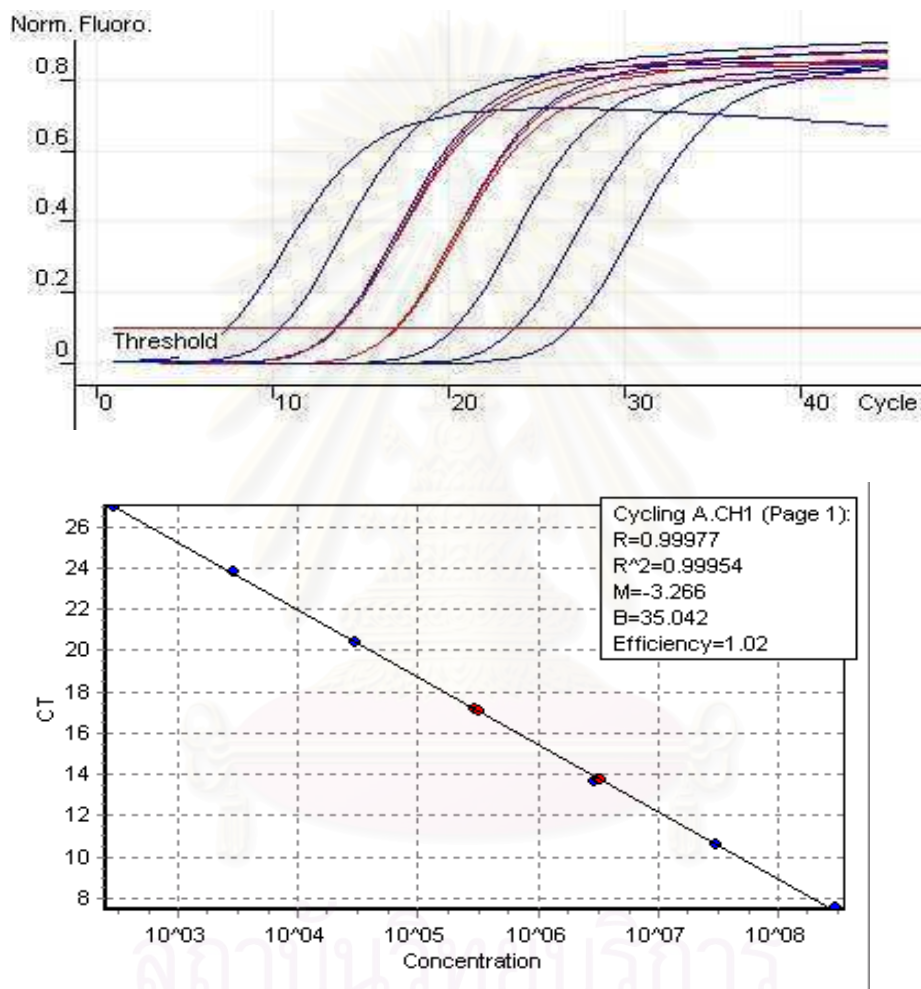
แผนภูมิที่ 1 กราฟ Amplification ประกอบด้วย 3 phase คือ exponential, linear และ plateau phase เส้นสีน้ำเงินแสดง Threshold line คือ level of detection หรือ point which reaction reaches fluorescent intensity above background จุดที่ตัดกันคือ Ct: cycles at which samples crosses threshold



แผนภูมิที่ 2 กราฟแสดงระดับความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลงใน PCR แต่ละรอบแบบ real-time (Amplification curves) แสดงปริมาณ ของ Interferon alpha ซึ่งถูกทำให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า โดยเส้นแต่ละสีที่แสดง คือแต่ละความเข้มข้นของ interferon alpha

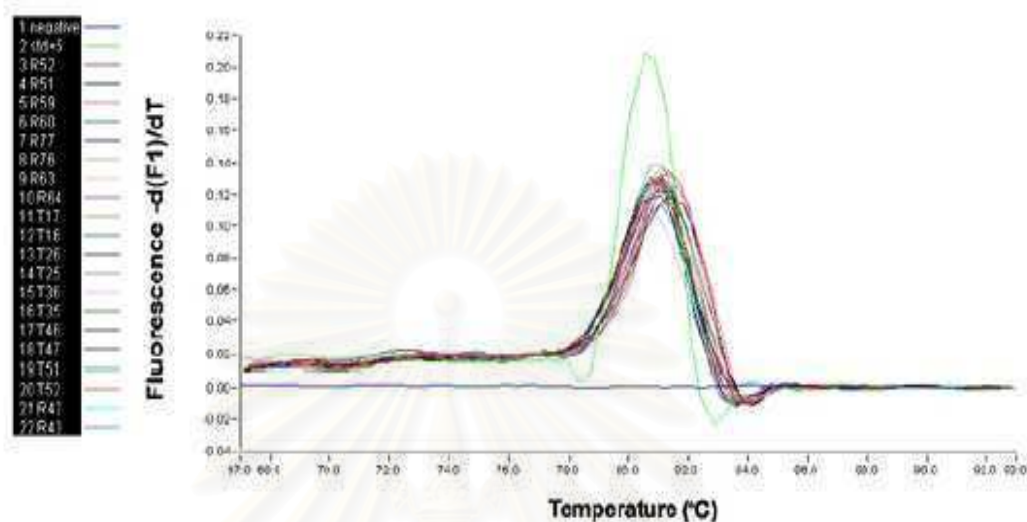
2. Standard curves

จากกราฟ amplification curve ที่แสดงนี้เราจะต้องนำค่าที่ได้อย่างน้อย 5 ความเข้มข้นมาสร้างเป็นกราฟเส้นตรง standard curve เพื่อที่จะใช้เปรียบเทียบหาจำนวน copy ของสารตัวอย่าง ดังรูป



แผนภูมิที่ 3 Standard curve เป็นการนำความเข้มข้นที่ทราบปริมาณอยู่แล้วของ target gene คือ Interferon alpha (logarithmic form, X axis) มา plot กับ cycle threshold (Ct, Y axis) แสดงออกเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear correlation) ระหว่างค่าทั้งสอง ซึ่งสมการที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์นี้ $Y = aX + b$ จะนำไปใช้ในคำนวณหาจำนวน gene copy ในตัวอย่างต่อไป

3. Melting curves (SYBR Green)



แผนภูมิที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Fluorescence signal ($-d(F2/F1)/dT$) กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) ซึ่งยอดของกราฟนี้แสดง melting temperature หรือค่า T_m ของ fluorescent complexes จากสารตัวอย่าง ซึ่งอุณหภูมินี้ (T_m) เป็นคุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับจำนวนเบสของสาย DNA ใช้ melting peaks นี้เป็นตัวแยก specific ออกจาก non-specific primer และ primer-dimer ถ้าเป็นสารตัวอย่างชนิดเดียวกันก็ควรมีอุณหภูมิเดียวกัน จากรูปนี้แสดงให้เห็นว่าสารตัวอย่างที่เรานำมาหาระดับ Interferon alpha มีอุณหภูมิประมาณ 80-82 องศาเซลเซียส ซึ่งทุกสารตัวอย่างที่นำมาศึกษาอยู่ในช่วงอุณหภูมินี้

Dynamic range และความไว (sensitivity) ของ real-time PCR จะสูงกว่าเทคโนโลยีอื่นในปัจจุบันที่ใช้ตรวจหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายในสิ่งส่งตรวจ dynamic range ของ real-time PCR จะกว้างมาก โดยสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณไม่กี่โมเลกุลไปจนถึงระดับล้านโมเลกุลได้โดยไม่ต้องเพิ่มความเข้มข้น (concentration) หรือเจือจางดีเอ็นเอตั้งต้น ทำให้มีความสะดวกและประหยัดเวลาในการทำการวิเคราะห์

การประยุกต์ใช้ real time PCR

1. การตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็ว (rapid diagnosis)

เนื่องจาก การทำ real time PCR มีการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอไปพร้อม ๆ กับการตรวจวัด ทำให้ไม่ต้องเสียเวลาในการตรวจวัดเหมือน conventional PCR จึงใช้เวลาในการตรวจที่สั้นกว่า จึงเหมาะสำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เครื่อง real time PCR บางชนิดใช้หลอดแก้ว (glass capillary tube) เป็นหลอดทำปฏิกิริยา ซึ่งสามารถดูดถ่ายความร้อนได้อย่าง รวดเร็ว สามารถทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอได้เสร็จในเวลา 30-40 นาทีเท่านั้น จะมีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็ว

2. การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ

ดังที่ได้กล่าวข้างต้นว่า ในปัจจุบันความต้องการในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณมีมากขึ้น จึงทำให้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค real time PCR มาทำการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณในงานต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานการตรวจวินิจฉัยโรคทางการแพทย์ เช่น การประยุกต์ใช้ในการตรวจหาปริมาณไวรัสในเลือดเพื่อใช้ในการทำนายโรคและติดตามการรักษา การตรวจหา minimal residual disease ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว การตรวจระดับการแสดงออกของยีนต่าง ๆ เป็นต้น

3. การวิเคราะห์ PCR products โดย Melting curve

จากที่กล่าวข้างต้น ดีเอ็นเอสายคู่แต่ละคู่จะมีค่า T_m ที่ต่างกัน โดยความแตกต่างจะแปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของดีเอ็นเอสายคู่ นั้น ๆ ดังนั้น เราสามารถนำค่า T_m ของดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ มากมาย เช่น ใช้จำแนก Specific และ Non-specific PCR product ออกจากกัน ตลอดจนสามารถใช้แยก PCR products ต่างชนิดในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันออกจากกัน ดังที่แสดงในรูปที่ 3

4. การตรวจหาการกลายพันธุ์ของจีโนมที่สนใจ หรือการตรวจหา single nucleotide

polymorphism (SNP)

โดยการออกแบบ Hybridization probe ให้ครอบคลุมในส่วนที่เกิดการกลายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบค่า T_m ระหว่าง Hybridization probe กับ ดีเอ็นเอเป้าหมาย จะพบว่าในตัวอย่างที่เกิดการกลายพันธุ์ จะมีบางเบสที่ Probe ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (Mismatch) ทำให้มีค่า T_m ต่ำกว่าตัวอย่างที่มีความปกติ ซึ่ง Probe จะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างสมบูรณ์ (perfect match)

บทที่ 6

วิธีการดำเนินการวิจัย

ประชากรศึกษา และตัวอย่าง (Population and sample)

ประชากรเป้าหมาย (Population)

ผู้ป่วยไทยอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 15 ปี แต่ไม่เกิน 65 ปี เป็นหูดผิวหนังชนิด common warts

ประชากรตัวอย่าง (Sample population)

ผู้ป่วยไทยอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 15 ปี แต่ไม่เกิน 65 ปี ที่เป็นหูดชนิด common warts ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

เนื่องจากไม่มีการศึกษาทดลองใด ก่อนหน้านี้ที่ศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในหูดผิวหนังชนิด common warts ที่ได้รับยา 5% อิมิควิมอดครีม เทียบกับยาหลอกในผู้ป่วยคนเดียวกัน จากข้อมูลการศึกษาของ Istvan Arany และคณะ [33] ในปี 1999 ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของผู้วิจัยมากที่สุด ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นโรคหูดที่อวัยวะเพศจำนวน 19 คน ผู้ป่วย 16 คนทายา 5% อิมิควิมอดครีม และ 3 คนทายาหลอก 3 ครั้งต่อสัปดาห์ ติดต่อกันเป็นเวลา 16 สัปดาห์ ทำการตัดชิ้นเนื้อก่อนการทดลอง, ที่ 6 สัปดาห์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำมาทำ PCR เพื่อหา HPV DNA และทำ semiquantitative reverse transcriptase (RT)-PCR สำหรับ mRNA for cytokines (IFN- α) cellular markers, viral genes products และ cell cycle markers ผลการทดลองพบว่าการศึกษานี้เปรียบเทียบค่า mRNA เป็นการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baselines) ณ จุดเวลาต่างๆ โดยใช้สถิติแบบ Wilcoxon rank sum test, independent samples ซึ่งผลพบว่าระดับ mRNA สำหรับ IFN- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 6 สัปดาห์เมื่อเทียบกับยาหลอก ($P < 0.02$) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่สิ้นสุดการทดลอง เนื่องจากการทดลองนี้ใช้วิธี semiquantitative reverse transcriptase (RT)-PCR โดยแสดงผลเป็นการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baselines) และไม่แสดงค่าเฉลี่ยของความแตกต่างที่แท้จริง (mean of differences) จึงไม่สามารถใช้ข้อมูลของการวิจัยนี้ มาคิดคำนวณขนาดตัวอย่างได้ ตามสูตรการพิจารณาขนาดตัวอย่างในการวิจัยเชิงทดลองสองกลุ่มที่

ทราบค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในประชากรชุดเดียวกัน ดูความแตกต่างก่อนและหลังการทดลอง (paired test or dependent sample)

$$\text{สูตร } n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2 / \mu_d^2$$

σ^2 = Variance of difference

μ_d = ค่าเฉลี่ยของความแตกต่าง (mean of difference)

$\alpha = 0.05$

$Z_{\alpha/2} = 1.96$

$\beta = 0.1$

$Z_{\beta} = 1.28$

แต่อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยนี้ใช้จำนวน Sample 19 ราย เป็น Pilot Project ตามความเห็นของ expert opinion ถือว่าเพียงพอในการทำวิจัยนี้

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้หญิงหรือผู้ชายที่มีสุขภาพแข็งแรง
2. อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 15 ปี แต่ไม่เกิน 65 ปี
3. มีรอยโรคหูดชนิด common warts ที่เป็นใหม่ หรือเก่าก็ได้ มีรอยโรคอย่างน้อย 2 แห่งที่อยู่ห่างกัน มีลักษณะและ ขนาดใกล้เคียงกัน อยู่บริเวณใดในร่างกายก็ได้ ยกเว้นบริเวณอวัยวะเพศและทวาร

กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่เป็นโรค AIDS หรือ ภูมิคุ้มกันบกพร่องอื่นๆ เช่น โรคเบาหวาน (diabetic meletus), โรคไตทุกชนิด, โรคที่มีภาวะพร่องที่ T cell ทั้งกลุ่ม
2. ผู้ป่วยที่เป็นโรคตับอักเสบเฉียบพลันทุกชนิด (acute hepatitis), วัณโรคที่ยังรักษาไม่หาย (active tuberculosis), มีภาวะติดเชื้อไวรัส (viral infection) อื่นๆ ในช่วงระยะเวลา 3 เดือน โดยการซักประวัติและการตรวจร่างกาย
3. ผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งทุกชนิด

4. ผู้ป่วย autoimmune disease อื่นๆ
5. ผู้หญิงซึ่งตั้งครรภ์หรือระหว่างให้นมบุตร
6. ผู้ที่ใช้ยากดภูมิคุ้มกัน เช่น ยา Oral corticosteroid (>30 mg/day ต่อเนื่องกันมากกว่า 3 สัปดาห์ ในระยะเวลาภายใน 1ปี), inhale corticosteroid (> 1,000 µg/day ภายใน 2 สัปดาห์ก่อนเข้ารับการรักษา), ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) เช่น ได้รับความ endoxan ภายใน 3 เดือน และรังสีบำบัด (radiotherapy)
7. ผู้ที่ได้รับสาร immunomodulators , สารอินเตอร์เฟอรอน (Interferon) หรือสารเหนี่ยวนำอินเตอร์เฟอรอนอื่นๆ (interferon inducer) เช่น ได้รับการฉีด IFN-alpha ภายใน 6 เดือน
8. ยาต้านไวรัสทั้งชนิดกิน และทาใกล้บริเวณรอยโรคหูดที่จะทำการวิจัย (oral or topical antiviral drugs) และ cytotoxic drugs
9. ผู้ที่ใช้ยาทาเฉพาะที่อื่นๆ ในบริเวณที่จะทำการศึกษา เช่น ทา topical corticosteroids ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์
10. ผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีใดๆ กับหูดที่จะทำการวิจัยภายใน 4 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการศึกษา และ ผิวหนังไม่กลับสู่สภาพปกติหลังจากที่ผู้ป่วยเคยรักษาหูดด้วยวิธีใด ๆ มาก่อน
11. ผู้ที่มีโรคผิวหนังอื่นในบริเวณหูดที่จะทำการศึกษา
12. ผู้ที่แพ้ยา 5% imiquimod cream หรือ 20% salicylic acid
13. ผู้ที่มีข้อห้ามในการทำตัดชิ้นเนื้อ (shave biopsy) ได้แก่ ภาวะความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด และ แพ้ยาทาเฉพาะที่ที่ใช้ในการตัดชิ้นเนื้อ

เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง (Sampling technique)

1. คัดผู้ป่วยทุกคนที่ตรงกับ Inclusion criteria และยินยอมเข้าร่วมการศึกษาทดลอง
2. การศึกษาทดลองนี้ไม่มีการ random sample แต่จะทำการสุ่มในผู้ป่วยรายเดียวกัน โดยแบ่งหูดเป็น 2 กลุ่ม (ตำแหน่งที่ 1 หรือ 2) หูดด้านหนึ่งได้ยา 5% อิมิกวิมอดครีม อีกด้านหนึ่งได้รับยาหลอก โดยใช้วิธี randomized permuted block และเก็บตารางนี้ให้กับพยาบาลที่ช่วยแจกยาให้ผู้ป่วย ผู้วิจัยจะไม่ทราบว่าจะข้างใดผู้ป่วยใช้ยาใด
3. เมื่อตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วยแล้ว จะเขียนตัวเลขเพื่อให้ทราบว่าเป็นชิ้นเนื้อชนิดใด (ตำแหน่งที่ 1 หรือ 2) โดยไม่ระบุว่าชิ้นเนื้อใดอยู่ตำแหน่งใด หรือได้รับยาชนิดใด นำชิ้นเนื้อที่ได้ไปสกัด mRNA ของ Interferon alpha หลังจากได้ค่าของสารตัวอย่างทั้งหมดแล้ว จึงนำผลที่ได้มาคำนวณของชิ้นเนื้อที่ได้รับยาชนิดใด

รูปแบบการวิจัย (Research design)

Experimental study แบบ randomized, double-blind, placebo-controlled study

วิธีดำเนินการวิจัย

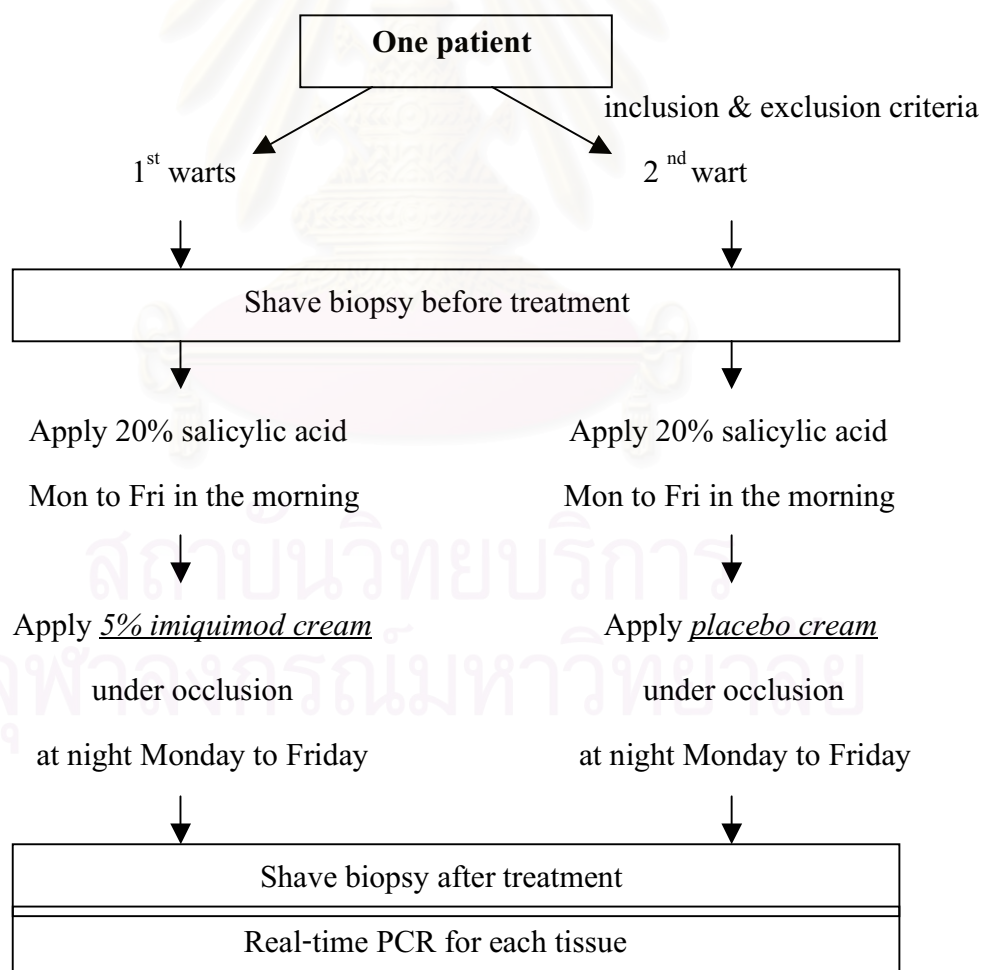
1. ผู้แจ่งวัตถุประสงค์ วิธีการและประโยชน์ที่จะได้จากการวิจัยแก่ผู้ป่วยที่มีความประสงค์จะเข้าร่วมในการศึกษาทดลอง
2. ผู้ป่วยลงนามยินยอมเข้าร่วมการวิจัยและอธิบายผู้ป่วย มีสิทธิถอนตัวออกจากการทดลองเมื่อใดก็ได้ โดยการถอนตัวนั้นจะไม่ก่อให้เกิดอคติในการได้รับการดูแลรักษาพยาบาลต่อไป
3. ข้อมูลทั้งหลายจะถูกเก็บเป็นความลับ
4. การซักประวัติ
 1. บันทึกชื่อ นามสกุล ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์ Hospital Number (HN) วันเดือนปีที่เริ่มทำการวิจัย อายุ เพศ อาชีพ ลักษณะของงาน
 2. ระยะเวลาเริ่มสังเกตเห็นรอยโรคหูด อาการ การเปลี่ยนแปลงรอยโรค
 3. เคยเป็นหูดมาก่อนครั้งนี้หรือไม่ ถ้าเคยเป็นรวมแล้วทั้งหมดกี่ครั้ง หูดครั้งเก่าเคยรักษามาก่อนหรือไม่ กี่ครั้ง เคยรักษาด้วยวิธีใดบ้าง
 4. หูดครั้งนี้เคยทำการรักษาหูดมาก่อนหรือไม่ กี่ครั้ง เคยรักษาด้วยวิธีใดบ้าง รักษาครั้งสุดท้ายระยะเวลานานเท่าใด เกิน 4 สัปดาห์หรือไม่
 5. โรคประจำตัว และโรคเจ็บป่วยอื่นๆ
 6. ประวัติการใช้ยาต่างๆ ก่อนการวิจัย หรือขณะวิจัย ประวัติการแพ้ยา
 7. ขณะทำการศึกษาทดลองอยู่ในช่วงตั้งครรภ์หรือให้นมบุตรหรือไม่
5. การตรวจร่างกาย
 1. ตรวจร่างกายทั่วไป เพื่อดูว่าผู้ป่วยมีสุขภาพแข็งแรงหรือไม่ ไม่มีโรคประจำตัวเช่นโรคไตหนังตาบวม บวมตามตัว, โรคเอดส์ โดยดูเชื้อราในปาก, OHL หรือผื่นผิวหนังตามตัว (PPE)
 2. ตรวจรอยโรคหูดชนิด common warts อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง ขนาดใกล้เคียงกัน และตำแหน่งคล้ายกัน โดยอยู่คนละด้านซ้ายขวาของร่างกาย หรืออยู่ห่างกันพอสมควร รอยโรคไม่มีการอักเสบ ติดเชื้อ และไม่มีโรคผิวหนังบริเวณรอยโรคหูด

3. บันทึกตำแหน่งของรอยโรคหูดที่ถูกคัดเลือกทำการศึกษาทดลองโดยแบ่งรอยโรคหูดเป็น 2 ตำแหน่ง (ตำแหน่งที่ 1 และ 2)
4. ถ่ายภาพรอยโรคหูดทั้งสองตำแหน่ง
5. วัดความหนาของรอยโรคหูดที่จะทำการศึกษาทดลองทั้งสองตำแหน่ง โดยใช้ไม้บรรทัดที่มีความละเอียดในหน่วยมิลลิเมตร โดยวัดความหนาในจุดที่สูงที่สุดของหูด
6. ให้ผู้ป่วยพบพยาบาลที่ทำการจ่ายยาให้แก่ผู้ป่วยโครงการวิจัยนี้ พยาบาลทำการเปิดตาราง randomized permuted block ที่ทำให้ ว่ารอยโรคด้านใดใช้ยาใดรักษา โดย A คือ ยา 5% อิมิกวิมอดครีม
B คือ ยาหลอก

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมวิจัย	รอยโรคตำแหน่งที่หนึ่ง	รอยโรคตำแหน่งที่สอง
1	A	B
2	B	A
3	A	B
4	B	A
5	A	B
6	A	B
7	B	A
8	B	A
9	A	B
10	B	A
11	B	A
12	A	B
13	B	A
14	B	A
15	A	B
16	A	B
17	B	A
18	A	B
19	A	B

7. แนะนำผู้ป่วยถึงวิธีการทายา

1. ก่อนทายาให้ผู้ป่วยล้างและเช็ดบริเวณหูดให้แห้ง
2. ให้ผู้ป่วยทายาในวันจันทร์ถึงวันศุกร์ ตอนเช้า ทา 20% salicylic acid กับหูดที่ทำการศึกษาทั้ง 2 ตำแหน่ง
3. ตอนกลางคืน ทา 5% imiquimod cream ในตำแหน่งหูดที่ทำการสุ่มไว้ตอนแรกให้ใช้ยานี้ และอีกตำแหน่งให้ทายาหลอกตามตาราง randomized permuted block เน้นกับผู้ป่วยห้ามสลับซองยากัน ซองเดิมใช้กับตำแหน่งเดิมตลอด
4. วิธีทายาใช้ยาปริมาณตามขนาดหูดและฉุนยาซึมลงไปไม่เห็นตัวยาและใช้แผ่นพลาสติกกันน้ำ ยี่ห้อ Tegaderm ปิดบริเวณที่ทายาทิ้งไว้ทั้งคืนไม่ต่ำกว่า 6-10 ชั่วโมง พยายามหลีกเลี่ยงโดนน้ำ ตอนเช้าล้างออกด้วยน้ำเปล่าและสบู่ตามปกติ
5. ไม่อนุญาตทายาใด ๆ บริเวณรอยโรคหูดที่ทำการศึกษาทดลอง



แผนภูมิที่ 5 แสดงขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

8. จ่ายยา 20% ซาลิไซลิก แอซิด, 5% อิมิกวิมอดครีม, ยาหลอก และแผ่นพลาสติก
กั้นน้ำให้ผู้ป่วยกลับไปใช้ที่บ้าน
9. การตัดชิ้นเนื้อ (shave biopsy) รอยโรคหูดทั้ง 2 ตำแหน่ง ทั้งที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม
และยาหลอก โดยตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดอย่างน้อย 3 * 3 mm ก่อนการทดลอง และ 2-4 สัปดาห์
หลังจากทายา (ตัดก่อนที่รอยโรคหูดจะหายสนิทจนไม่สามารถทำการตัดชิ้นเนื้อได้) เก็บชิ้น
เนื้อไว้ในน้ำยา RNA later (รูปที่ 51) หลังตัดทันที และเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปตรวจ Real-
time PCR หาปริมาณ mRNA สัมพัทธ์สำหรับ Interferon alpha



รูปที่ 50 แสดงอุปกรณ์การตัดชิ้นเนื้อ (shave biopsy)



รูปที่ 51 แสดงน้ำยา RNA later ใน tube

10. วิธีการสกัด RNA (Extract RNA)
นำชิ้นเนื้อหูดมาแยก mRNA โดยวิธี conventional method

Protocol ขั้นตอนการสกัด RNA และ การทำ Real time PCR

1. Tissue ใน RNA later เก็บไว้ในตู้ความเย็น -80°C ไม่เกิน 2 สัปดาห์



รูปที่ 52 แสดงตู้ความเย็น เก็บชิ้นเนื้อ ที่อุณหภูมิต่ำ -80°C

2. นำชิ้นเนื้อมาชั่งน้ำหนัก ขนาด 50-100 mg
3. หั่นชิ้นเนื้อดังกล่าวที่ต้องการสกัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยมีด steriled ใช้ forceps คีบใส่ใน hand Homogenizer (รูปที่ 53)



รูปที่ 53 แสดง hand homogenizer

4. บดชิ้นเนื้อเติม liquid NO_2 (-196°C) เพื่อให้ได้เซลล์ผิวหนัง ถ้าชิ้นเนื้อหุดเริ่มอ่อนตัวให้เติม liquid NO_2 ใหม่ แล้วบดต่อจนได้เป็นเนื้อเดียวกัน
5. เติม Trizol 1 ml และนำชิ้นเนื้อไปปั่นในเครื่องปั่น (Centrifuge) (รูปที่ 54) นาน 10 นาที ด้วยความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ $2-8^\circ\text{C}$ เพื่อให้สาร Trizol ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell wall) ให้เซลล์ และ nucleus แตก



รูปที่ 54 แสดงเครื่องปั่น centrifuge ที่ใช้ในการสกัด RNA

6. แล้วนำไปบดต่อใน incubator นาน 5 นาทีที่ อุณหภูมิ $15-30^\circ\text{C}$ หรืออุณหภูมิห้อง โดย incubate ใน Homeginizer เพื่อให้สาร Trizol ทำลายเซลล์ให้สมบูรณ์
7. เติม chloroform 0.2 ml (200 microlit) (เติมสาร chloroform 0.2 ml ต่อ 1 ml of Trizol) เขย่าให้เข้ากัน 15 วินาที และนำไปปั่นอีกครั้ง ที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 15 นาที ที่ อุณหภูมิ $2-8^\circ\text{C}$
8. เมื่อปั่นชิ้นเนื้อที่ใส่สาร chloroform แล้ว จะได้สารในหลอดทดลองแบ่งเป็น 3 ชั้น
 - ชั้นบน (upper phase) เป็น RNA
 - ชั้นกลาง (middle phase) เป็นชั้นสีขาวของ โปรตีน และ DNA
 - ชั้นล่าง (lower phase) เป็น DNA ผสม Trizol
9. ดูดเก็บของเหลว supernatant ชั้นบนที่มี RNA ใส่ใน 1.5 ml centrifuge tube ใหม่
10. เติม isopropyl alcohol 0.5 ml (ต่อ 1 ml of Trizol) เพื่อให้ RNA ตกตะกอน

11. นำไปอบใน incubator อีกครั้ง นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 15-30°C หรืออุณหภูมิห้อง
12. นำไปปั่น ที่ 12,000 rpm 10 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8°C เมื่อปั่นแล้วจะได้ RNA ตกตะกอนลงมาเป็นสีขาว เรียกว่า pellet
13. เก็บ pellet ที่ตกตะกอน แล้วเติม 70 หรือ 75 เปอร์เซ็นต์ Ethyl alcohol (ETOH) (ต่อ 1 ml of Trizol)
14. นำไปปั่น ด้วยความเร็ว 7,500 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 2-8°C ดูด 75 หรือ 70 เปอร์เซ็นต์ เอ็นดี ETOH ออก
15. นำ pellet ที่ได้ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (เปิดฝา)
16. เติมสาร dimethyl pyrocarbonate (DEPC-H₂O) 15 microlit ซึ่งเป็นสารที่ใช้ยับยั้งไม่ให้ RNA หรือ DNA ถูกทำลายด้วย polymerase enzyme
17. นำสารที่ได้ไปวัดระดับ mRNA ด้วยเครื่องวัดค่า Optical density (OD.) ด้วยเครื่องวัด spectrophotometer (BIO-RAD) ที่ UV absorption 260 nm (รูปที่ 55) เพื่อคำนวณหา ปริมาตรของสารที่จะนำมาใช้ในการสร้าง cDNA ต่อไป ยกตัวอย่างเช่น

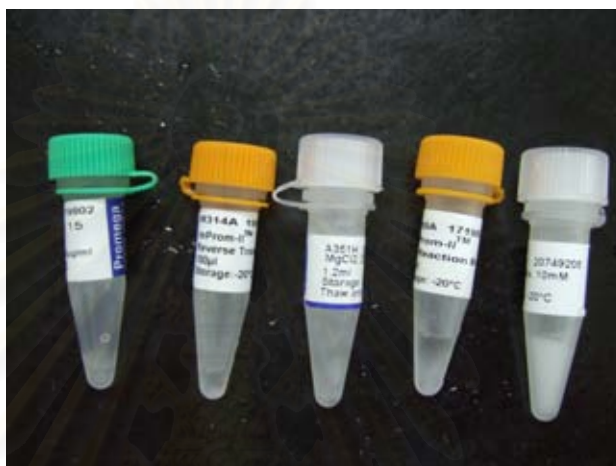
นำสารละลายที่มี RNA มา 2 μL + H₂O 98 μL (dilute 50) \rightarrow ไปวัดค่า OD. สมมติ จากการวัด พบว่าสารมีความเข้มข้น 288.4575 $\mu\text{g}/\text{ml}$ นำค่าที่ได้ไปเทียบว่า ต้องการ ปริมาณ RNA 288.4757 μg ต้องใช้สารสกัด 1000 μL และถ้าต้องการ RNA 1 μg เท่ากันหมดในชั้นเนื้อต่างๆ ชั้น ต้องใช้สารสกัดปริมาณเท่าไร (μL) = (1000 μL *1) / 288.4757



รูปที่ 55 แสดงเครื่อง spectrophotometer (BIO-RAD) วัดค่า Optical Density

18. สารที่สกัดได้ จะถูกเปลี่ยนจาก mRNA ไปเป็น cDNA โดยใช้รีเอเจนต์และสารที่ใช้ในการสร้าง cDNA จากชุด kit (ImProm-II™ Reverse Transcription System)

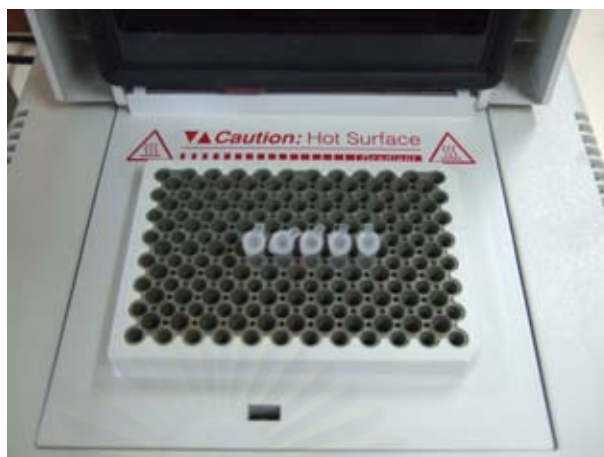
ในการทำ cDNA ในงานวิจัยนี้ใช้รีเอเจนต์และสารตั้งต้น ซึ่งประกอบด้วย RNA ที่สกัดได้, oligo(dT)₁₅ primer, reverse transcriptase(RT), dNTP Mix, MgCl₂ และ reaction buffer (รูปที่ 56) และใช้อุปกรณ์เครื่อง Thermal Cycle (รูปที่ 57-58)



รูปที่ 56 แสดงชุด cDNA kit (ImProm-II™ Reverse Transcription System) ที่ใช้ในการสร้าง cDNA เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C



รูปที่ 57 แสดงอุปกรณ์เครื่อง Thermal Cycle ที่ใช้ในงานวิจัยนี้



รูปที่ 58 แสดงช่องใส่สารตัวอย่างที่ใช้ในการทำ PCR ด้วยเครื่อง Thermal Cycle

19. หลังจากที่ได้ cDNA แล้ว ก็นำมาหาปริมาณ Interferon alpha และ House keeping genes (18S) ด้วยวิธี Real time PCR โดยใช้เครื่องมือ LightCycler (Roche Molecular Biochemicals) (รูปที่ 59-60) และประเมินผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ LightCycler Software 4.05.403 ดังที่กล่าวไปแล้ว



รูปที่ 59 แสดงเครื่อง Real time PCR รุ่น The LightCycler (Roche Molecular Biochemicals)



รูปที่ 60 แสดงช่องใส่สารตัวอย่างที่ใช้ในการทำ Real time PCR ด้วยเครื่อง The lightCycle

โดยในการหาปริมาณ 18S rRNA ใช้วิธี Tag man probe และมี Primer ที่ใช้ คือ

18S rRNA sense: 5'GCC CGA AGC GTT TAC TTT GA 3'

18S rRNA Antisense: 5'TCC ATT ATT CCT AGC TGC GGT ATC 3'

18S rRNA probe: 5'FAMAAA GCA GGC CCG AGC CGC C TAMRA 3'

และสำหรับ IFN- α rRNA ใช้วิธี SYBR Green และมี Primer ที่ใช้ คือ

IFN- α rRNA sense: 5'TCC ATG AGA TGA TCC AGC AG 3'

IFN- α rRNA Antisense: 5'ATT TCT GCT CTG ACA ACC TCC C 3'

11. นำชองยาเก่ามาด้วยทุกครั้ง เพื่อประเมินว่าได้ใช้ยาในปริมาณใกล้เคียงกัน (โดยให้พยาบาลผู้จ่ายยาช่วยตรวจสอบด้วย)
12. ประเมินผลข้างเคียงจากการใช้ยา แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ
 - a. ส่วนแรก : ผู้ป่วยเป็นผู้ประเมิน โดยให้ผู้ป่วยทำแบบสอบถามผลข้างเคียงการใช้ยาในรอยโรคทั้งสองตำแหน่ง โดยแบ่งเป็น 4 ระดับ ดังนี้
 - 1) ไม่มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา (none)
 - 2) มีผลเล็กน้อย (mild) มีการระคายเคืองเล็กน้อยไม่รบกวนผู้ป่วย และไม่รบกวนต่อกิจวัตรประจำวัน
 - 3) มีผลปานกลาง (moderate) ค่อนข้างรบกวนผู้ป่วยแต่ยังไม่รบกวนต่อกิจวัตรประจำวัน
 - 4) มีผลรุนแรง(severe) ผลข้างเคียงของยารบกวนต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย

- b. ส่วนที่สอง : แพทย์เป็นผู้ประเมิน โดยการตรวจบริเวณรอยโรคหูดทั้งสองตำแหน่งว่ามีผลข้างเคียงจากการใช้ยา ว่ามีอาการหรืออาการแสดงดังนี้หรือไม่

มี	ไม่มี	
.....	คัน (itching)
.....	แดง (erythema)
.....	แสบร้อน (burning)
.....	ตุ่มน้ำใส (vesicle)
.....	ลอก (flaking or excoriation)
.....	แผลถลอกตื้น (erosion)
.....	แผลลึกถึงชั้นหนังแท้ (ulcer)
.....	บวม (edema)
.....	อื่น ๆ ระบุ.....

14. เมื่อจบการศึกษาทดลองผู้วิจัยทำการเปิดตาราง randomized permuted block เพื่อทราบว่าผู้ป่วยใช้ยาชนิดใดด้านใดระหว่างทำการศึกษาทดลอง
15. ถ้ามีความผิดปกติหรือข้อสงสัยอันเกี่ยวข้องกับการวิจัย ผู้ป่วยสามารถมาพบหรือติดต่อได้ที่ พญ. รัชต์ธร หมอนจันทร์ หน่วยผิวหนัง ตึกจักษุประวัติชั้น 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โทรศัพท์ 02-2564253 ต่อ 0

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลของผู้ป่วยถูกรวบรวมในแบบฟอร์มบันทึกข้อมูล ที่บันทึกเกี่ยวกับชื่อ นามสกุล ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์ ผู้เข้าร่วมศึกษาทดลองรายที่เท่าใด (ID), Hospital Number (HN), วันเดือนปีที่เริ่มการศึกษาทดลอง อายุ เพศ อาชีพ ระยะเวลาเริ่มสังเกตเห็นรอยโรคหูด ตำแหน่งรอยโรคหูด ปริมาตรหูดทั้งสองตำแหน่ง เคยทำการรักษาหูดมาก่อนหรือไม่ ก็ครั้ง เคยรักษาวิธีใดบ้าง ครั้งสุดท้ายรักษานานเท่าใด โรคประจำตัว ประวัติการใช้ยา ประวัติการแพ้ยา อยู่ในช่วงตั้งครรภ์ให้มนบุตรหรือไม่ มีโรคผิวหนังบริเวณทำการวิจัยหรือไม่ โดยผู้วิจัยเป็นคนบันทึกข้อมูลทั้งหมดเอง

เมื่อนัดติดตามผลการรักษาแต่ละครั้ง บันทึกข้อมูลในแบบประเมินนัดติดตามผู้ป่วย บันทึกตำแหน่ง การเปลี่ยนแปลงของหูดทั้งสองตำแหน่ง ถ่ายรูปภาพไว้เพื่อใช้เปรียบเทียบในแต่ละบันทึกผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมิน) และผลข้างเคียงจากการใช้ยา (แพทย์ประเมิน) ของ

รอยโรคหูดทั้งสองตำแหน่ง

นอกจากนี้ข้อมูลทั้งหมดทั้งข้อมูลพื้นฐาน และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ Real time-PCR คู่ ระดับ mRNA for IFN α จะถูกบันทึกลงในโปรแกรม SPSS (โปรแกรมทางสถิติเพื่อใช้ในการวิจัย) โดยผู้วิจัย เพื่อที่จะนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. ข้อมูลเชิงคุณภาพ ได้แก่ เพศ, อาชีพ, ตำแหน่งรอยโรคหูด, ประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน ประวัติการรักษารอยโรคหูดมาก่อน และความแดง หรือการมีกรออักเสบของหูดขณะตัดชิ้นเนื้อหลังการรักษา โดยนำเสนอข้อมูลในรูปแบบของความถี่ และค่าร้อยละ
2. ข้อมูลเชิงปริมาณ ได้แก่ อายุ, ระยะเวลาที่เป็นหูด, ความหนาของหูด และ ระยะเวลาการรักษาเฉลี่ย โดยนำเสนอข้อมูลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (mean), ค่าสูงสุด (max), ค่าต่ำสุด (min), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
3. คำนวณค่า mean และ standard deviation ของค่าระดับ mRNA for IFN α ก่อนและหลังการรักษา ทั้งในรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิควิมอดคริม และยาหลอก
4. ศึกษาเปรียบเทียบระดับ mRNA for IFN α ก่อนการรักษา (baseline) ในรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิควิมอดคริม และยาหลอก โดยใช้สถิติ Wilcoxon signed ranks test ที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$
5. ศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio change in percent from baseline) ของระดับ mRNA for IFN α ก่อนและหลังรักษา ในรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิควิมอดคริม และยาหลอก โดยใช้สถิติ Wilcoxon signed ranks test ที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$
6. การประเมินผลข้างเคียงจากการไช้ยา (ผู้ป่วยประเมิน) ของยาสองชนิดมีความแตกต่างกันหรือไม่ ใช้ Wilcoxon Singed Ranks Test
7. การประเมินผลข้างเคียงจากการไช้ยา (แพทย์ประเมิน) ว่ามีอาการหรืออาการแสดงดังต่อไปนี้หรือไม่ ใช้ Mc Nemar Chi-square ในแต่ละอาการหรืออาการแสดง
8. เปรียบเทียบ ปัจจัยด้านเพศ, อายุ, ตำแหน่งรอยโรคหูด, ประวัติเคยเป็นหูด, ประวัติเคยรักษาหูดมาก่อน, ระยะเวลาที่เป็นหูด, ความแดงของหูดขณะตัดชิ้นเนื้อหลังทายา และความหนาของหูด ก่อนการรักษา ในรอยโรคหูดที่ทายา 5% อิมิควิมอดคริม และทายาหลอก ระหว่างกลุ่มที่มีค่าอัตราการเปลี่ยนแปลง (ratio change from baseline) ของ mRNA สำหรับ IFN α สูงขึ้น และไม่สูงขึ้น มีความแตกต่างกันหรือไม่

โดยการวิเคราะห์ปัจจัยด้านเพศ , ตำแหน่งรอยโรคหู และประวัติเคยรักษาหูมาก่อน ใช้ Chi-square ส่วนปัจจัยด้านอายุ, ระยะเวลาที่เป็นหู, ความแดงของหูขณะตัดชิ้นเนื้อหลังทายา และความหนาของหูก่อนการรักษาใช้ Independent-samples t test

9. นำเสนอข้อมูลเป็นตาราง , แผนภูมิ และกราฟ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7

รายงานผลการวิจัย

คุณลักษณะของประชากรในการศึกษา

ผู้ป่วยโรคหูดบริเวณผิวหนังที่เข้าร่วมโครงการเมื่อมีจำนวน 19 คน เป็นผู้ป่วยที่เข้ามารับการ รักษาในแผนกผู้ป่วยนอกโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทั้งหมด ไม่มีผู้ป่วยคนใดออกจากการศึกษาไปก่อน สิ้นสุดการวิจัย ผู้ป่วยส่วนใหญ่แข็งแรงดี ไม่มีประวัติแพ้ยาใด มีเพียง 1 คนที่มีโรคประจำตัวเป็นเส้นเลือดหัวใจตีบ และความดันโลหิตสูง รักษาอยู่ที่สถาบันประสาท พญาไท ได้รับยา

Hydrochlorothiazide วันละ ½ เม็ด, ยา Isordil ครั้งละ 1 เม็ด 3 เวลา ก่อนอาหาร และยา Aspirin (grV) วันละ 1 เม็ด อาการทั่วไปปกติดี ความดันอยู่ในระดับปกติ

เมื่อพิจารณาข้อมูลทั่วไปของประชากรที่นำมาศึกษาพบว่าเป็นเพศชาย 13 คน (ร้อยละ 68.42) เพศหญิง 6 คน (ร้อยละ 31.58) มีอัตราส่วนเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 2.17:1 โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ ร้อยละ 52.63 มีอายุระหว่าง 15-24 ปี อายุเฉลี่ย 29.47 ปี อายุต่ำสุดเท่ากับ 15 ปี อายุสูงสุดเท่ากับ 64 ปี ส่วนใหญ่เป็นนักเรียนนักศึกษา คิดเป็นร้อยละ 47.37 พบรอยโรคหูดบริเวณนิ้วมือมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 42.11 รองลงมาเป็นบริเวณนิ้วเท้า ร้อยละ 18.42 หูดในผู้ป่วยส่วนใหญ่มีขนาดค่อนข้างเล็ก ค่าเฉลี่ย ความหนาของหูดก่อนทำการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดครีม เท่ากับ 2.0 มิลลิเมตร ความหนาหูดต่ำสุด 1.0 มิลลิเมตร ความหนาหูดมากที่สุด 3.0 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ยความหนาของหูดก่อนทำการรักษาด้วย ยาหลอกเท่ากับ 1.868 มิลลิเมตร ความหนาหูดต่ำสุด 1.0 มิลลิเมตร ความหนาหูดมากที่สุด 3.5 มิลลิเมตร

จากการสอบถามประวัติการเป็น โรคหูด พบว่าระยะเวลาเป็นหูดเฉลี่ย 21.68 เดือน ระยะเวลาต่ำสุดที่เป็นหูดเท่ากับ 4 เดือน ระยะเวลาสูงสุดเป็นหูดเท่ากับ 5 ปี ผู้ป่วยที่ไม่เคยเป็นหูดมาก่อน (การเป็นหูดครั้งนี้เป็นครั้งแรก) มีจำนวน 12 คน คิดเป็นร้อยละ 63.16 ที่เหลือเป็นผู้ที่เคยเป็นหูดมาแล้ว ก่อนหน้านี้ (โดยนับรวมการเป็นหูดครั้งนี้ด้วย) จำนวน 7 คน คิดเป็นร้อยละ 36.84 ในผู้ป่วย 7 คนนี้ ผู้ป่วย 4 คน คิดเป็นร้อยละ 57.1 เคยเป็นหูดมาแล้ว 2 ครั้ง ผู้ป่วย 2 คนเคยเป็นหูดมาแล้ว 3 ครั้ง และมีผู้ป่วย 1 คนที่เป็นหูดมาแล้วถึง 4 ครั้ง โดยผู้ป่วยที่เคยเป็นหูดมาก่อนทุกคนเคยผ่านการรักษาหูดเก่าด้วยวิธีต่างๆ ส่วนใหญ่ใช้วิธีการจี้ด้วยความเย็น (cryosurgery) และ การทายา duofilm (salicylic acid and lactic acid) วิธีอื่นๆ ได้แก่ การใช้รูปจี้ การกัดหูดด้วยยางมะละกอ ใช้กรรไกรตัดเล็บตัดออกเอง ผ่าน ออก เป็นต้น

ด้านประวัติการรักษา พบว่าผู้ป่วยไม่เคยรักษาหูดมาก่อน มีจำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 42.11 ผู้ป่วยที่เคยผ่านการรักษา มีจำนวน 11 คน คิดเป็นร้อยละ 57.89 โดยผู้ป่วยทุกคนรักษาหูดด้วยวิธีต่างๆ มานานมากกว่า 4 สัปดาห์ก่อนจะเข้าร่วมการวิจัยในครั้งนี้ ส่วนใหญ่รักษาด้วยการจี้ด้วยความเย็น (cryosurgery) วิธีอื่นๆ ได้แก่ การทายา duofilm , ยา salicylic acid, การใช้ธูปจี้, การกัดด้วยปูนแดง และมีผู้ป่วย 1 คนที่เคยรักษาด้วย DNCB โดยแปะ dose แรกที่หลังเพียงครั้งเดียว

ตารางที่ 5 แสดงจำนวน และร้อยละของประชากรที่ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยส่วนบุคคล และข้อมูลทั่วไป

ข้อมูลทั่วไป	จำนวนคน	ร้อยละ
1. เพศ		
เพศชาย	13	68.42
เพศหญิง	6	31.58
เพศชาย : เพศหญิง = 2.17: 1		
2. อายุ		
15-24 ปี	10	52.63
25-34 ปี	4	21.05
35-44 ปี	1	5.26
45-54 ปี	2	10.53
55-64 ปี	2	10.53
Mean = 29.47 ปี SD = 15.035 ปี Min = 15 ปี Max = 64 ปี		
3. อาชีพ		
นักเรียน นักศึกษา	9	47.37
รับราชการ	2	10.53
พ่อบ้าน แม่บ้าน	1	5.26
รับจ้างทั่วไป	5	26.32
ธุรกิจส่วนตัว	1	5.26
อื่นๆ ระบุ...แม่ชี	1	5.26

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงจำนวน และร้อยละของประชากรที่ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยส่วนบุคคล และข้อมูลทั่วไป

ข้อมูลทั่วไป	จำนวนคน	ร้อยละ
4. ตำแหน่งรอยโรคหูรวมทั้ง 2 ตำแหน่ง		
นิ้วมือ	16	42.11
นิ้วเท้า	7	18.42
รอบเล็บ	6	15.79
ฝ่ามือ	3	7.90
ข้อศอก	2	5.26
หลังมือ	2	5.26
ข้อเท้า	1	2.63
เข่า	1	2.63
5. ระยะเวลาที่เป็นหูต (เดือน)		
1-15 เดือน	10	52.63
16-30 เดือน	2	10.53
31-45 เดือน	5	26.31
46-60 เดือน	2	10.53
Mean = 21.68 เดือน SD = 18.169 เดือน Min = 4 เดือน Max = 60 เดือน		
6. ประวัติเคยเป็นหูตมาก่อน		
ไม่เคยเป็นหูตมาก่อน ครั้งนี้เป็นครั้งแรก	12	63.16
เคยเป็นหูตมาก่อน	7	36.84
จำนวนครั้งรวมการเป็นหูตครั้งนี้ด้วย		
เป็นหูตรวม 2 ครั้ง	4	57.1
เป็นหูตรวม 3 ครั้ง	2	28.6
เป็นหูตรวม 4 ครั้ง	1	14.3

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงจำนวน และร้อยละของประชากรที่ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยส่วนบุคคล และข้อมูลทั่วไป

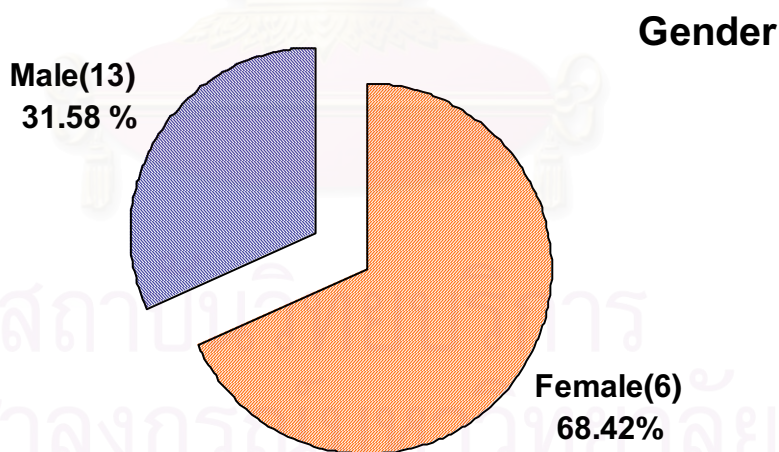
ข้อมูลทั่วไป	จำนวนคน	ร้อยละ
7. ประวัติเคยรักษาหูดเก่ามาก่อน		
ไม่เคยรักษามาก่อน	0	0.0
เคยรักษามาก่อน	7	100.0
8. หูดเก่าเคยรักษาด้วยวิธีการใดบ้าง		
การจี้ด้วยความเย็น (cryosurgery)	3	30.0
การจี้ด้วยไฟฟ้า	0	0.0
การทำลายด้วยเลเซอร์	0	0.0
การทายา salicylic acid	1	10.0
การทายา duofilm	3	30.0
วิธีอื่นๆ เช่น การใช้รูปจี้ การกัดหูดด้วยขยง มะละกอ ใช้กรรไกรตัดเล็บตัดออก ผานออก	3	30.0
9. ประวัติเคยรักษาหูดครั้งนี้มาก่อน		
ไม่เคยรักษามาก่อน	8	42.11
เคยรักษามาก่อน นาน ≥ 4 สัปดาห์	11	57.89
8. หูดครั้งนี้เคยรักษาด้วยวิธีการใดบ้าง		
การจี้ด้วยความเย็น (cryosurgery)	6	42.86
การจี้ด้วยไฟฟ้า	0	0.0
การทำลายด้วยเลเซอร์	0	0.0
การทายา salicylic acid	2	14.28
การทายา duofilm	3	21.43
วิธีอื่นๆ เช่น การใช้รูปจี้, การกัดด้วย ปูนแดง และDNCB (first dose at back)	3	21.43

ตารางที่ 6 แสดงความหนาของหูคก่อนการรักษา (มิลลิเมตร) เปรียบเทียบระหว่างสองตำแหน่ง

ความหนาหูค (มิลลิเมตร)	5% อิมิกวิมอดครีม	ยาหลอก
Number	19	19
Mean	2.0	1.868
Std. Deviation	0.55	0.6
Minimum	1.0	1.0
Maximum	3.0	3.5

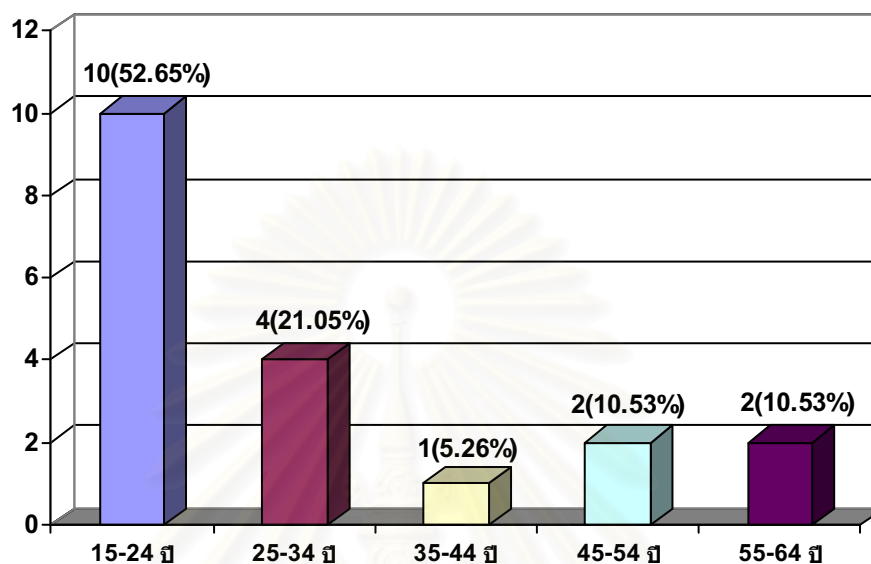
ได้ทำการวัดความหนาของหูคก่อนการรักษา และใช้การวิเคราะห์ด้วย Paired t-test พบว่าความหนาของหูคก่อนการรักษาในสองกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value= 0.399)

แผนภูมิวงกลมที่ 1 แสดงสัดส่วนของเพศชาย และเพศหญิง (เปอร์เซ็นต์) (n=19)



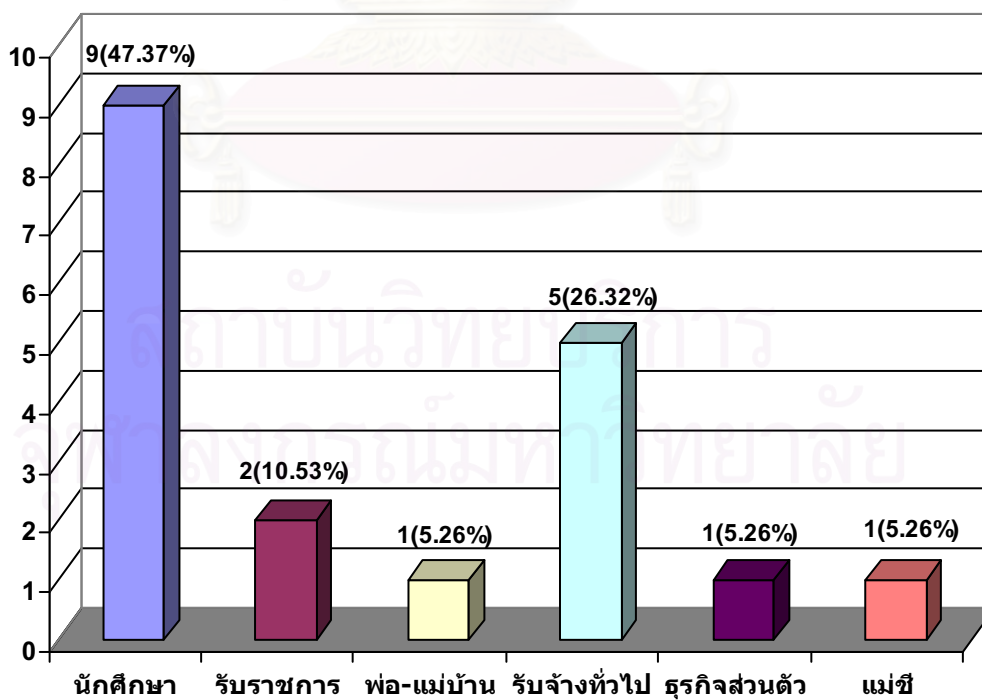
แผนภูมิแท่งที่ 1 แสดงกลุ่มอายุของประชากร

จำนวนคน (เปอร์เซ็นต์)



แผนภูมิแท่งที่ 2 แสดงอาชีพของผู้ป่วย

จำนวนคน (เปอร์เซ็นต์)

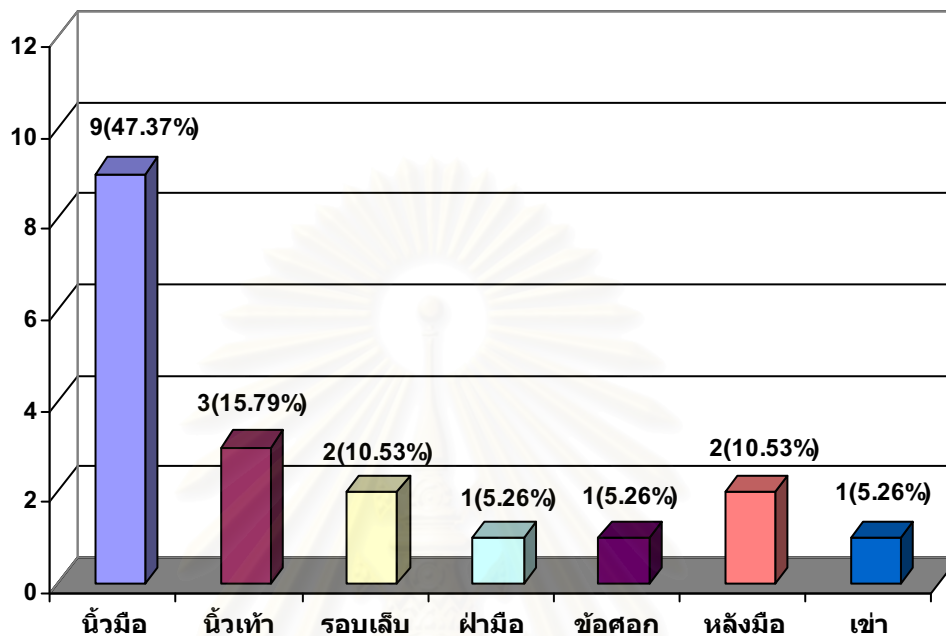


ตารางที่ 7 แสดงตำแหน่งของหูที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม เทียบกับยาหลอกในผู้ป่วยแต่ละราย

ID	ยาหลอก	5% อิมิกวิมอดคริม
1	นิ้วมือ	นิ้วมือ
2	นิ้วมือ	นิ้วมือ
3	นิ้วมือ	นิ้วมือ
4	นิ้วเท้า	นิ้วเท้า
5	ข้อเท้า	เข่า
6	รอบเล็บ	รอบเล็บ
7	นิ้วเท้า	นิ้วเท้า
8	นิ้วเท้า	นิ้วมือ
9	นิ้วมือ	นิ้วมือ
10	นิ้วมือ	หลังมือ
11	นิ้วเท้า	นิ้วเท้า
12	รอบเล็บ	รอบเล็บ
13	ฝ่ามือ	นิ้วมือ
14	นิ้วมือ	นิ้วมือ
15	ฝ่ามือ	นิ้วมือ
16	ข้อศอก	ข้อศอก
17	รอบเล็บ	ฝ่ามือ
18	นิ้วมือ	นิ้วมือ
19	รอบเล็บ	หลังมือ

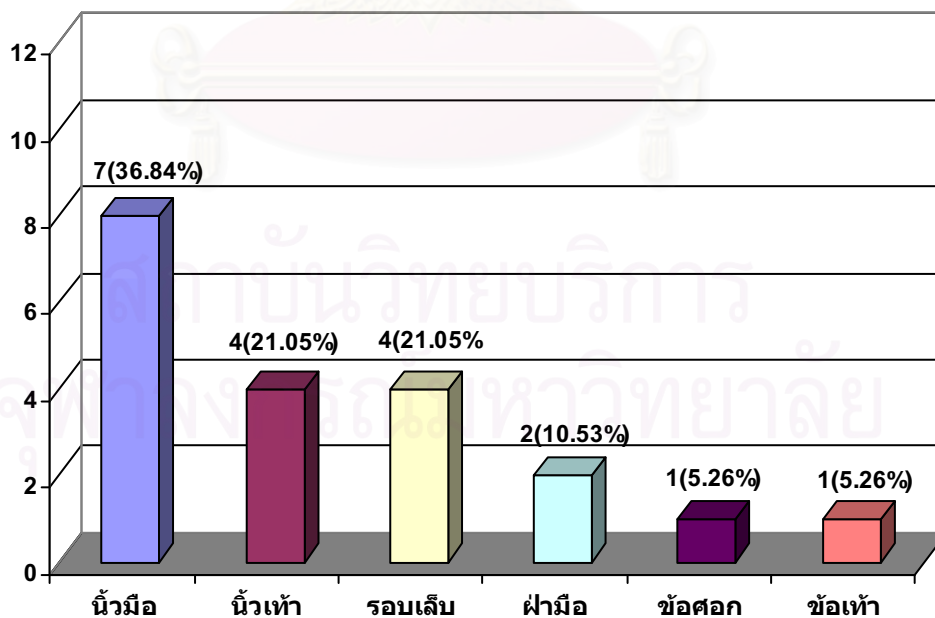
แผนภูมิแท่งที่ 3 แสดงตำแหน่งของรอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอด

จำนวนคน (เปอร์เซ็นต์)



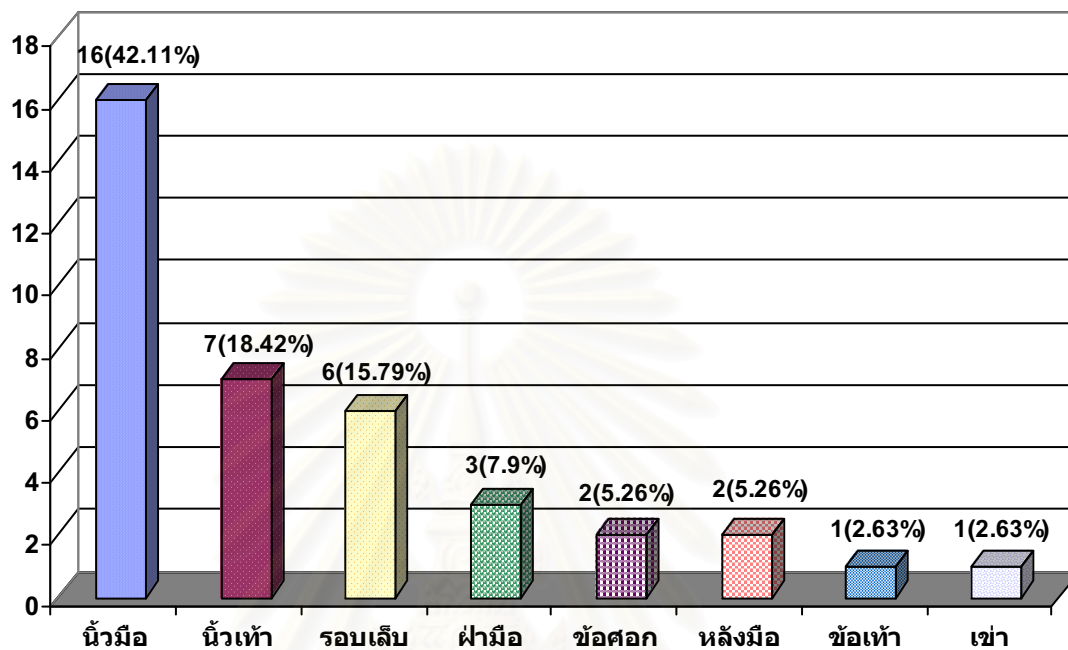
แผนภูมิแท่งที่ 4 แสดงตำแหน่งของรอยโรคหูดที่ได้รับยาหลอก

จำนวนคน (เปอร์เซ็นต์)



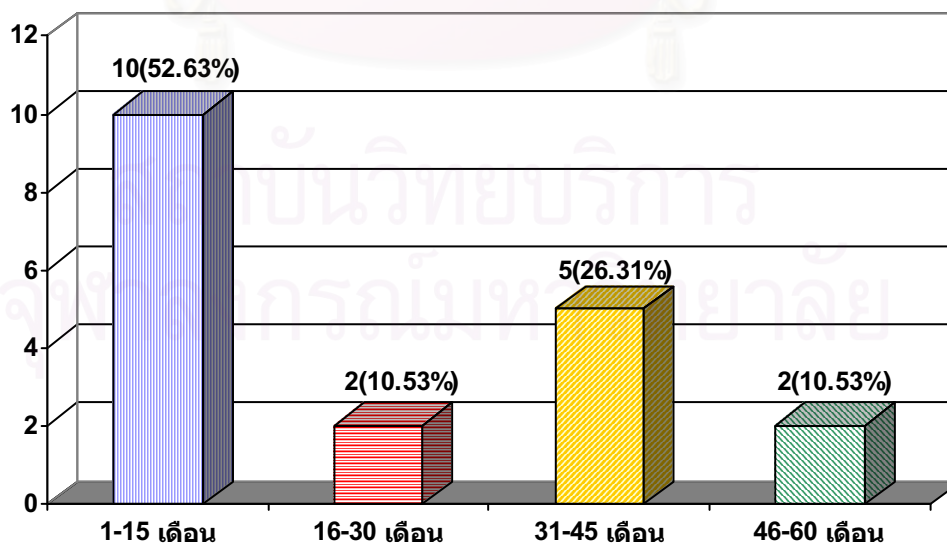
แผนภูมิแท่งที่ 5 แสดงตำแหน่งของรอยโรคหูรวมทั้งสองตำแหน่ง

จำนวนคน (เปอร์เซ็นต์)

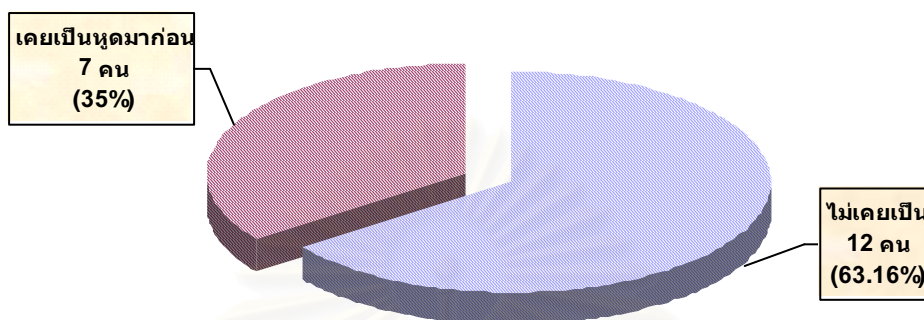


แผนภูมิแท่งที่ 6 แสดงระยะเวลาที่เป็นหูค

จำนวนคน (เปอร์เซ็นต์)

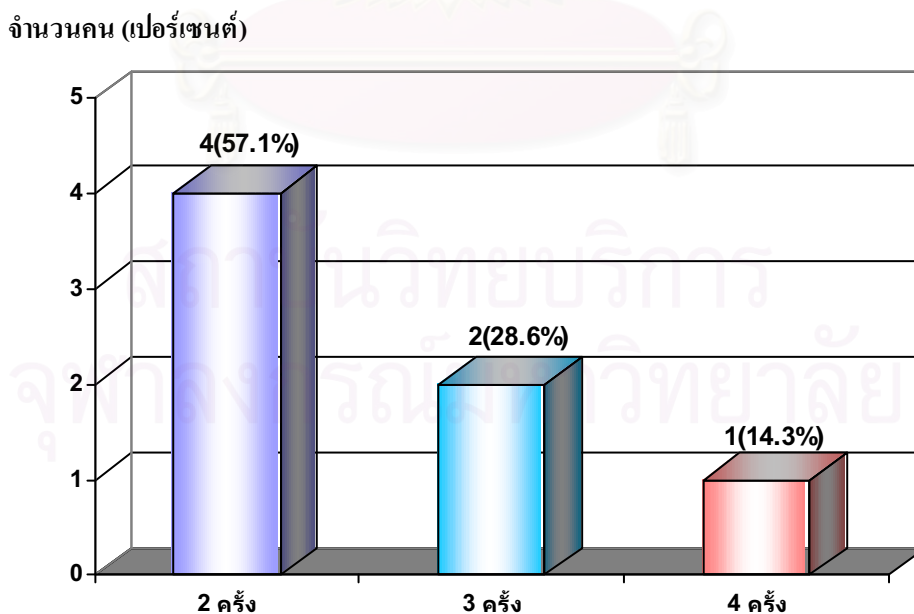


แผนภูมิวงกลมที่ 2 แสดงสัดส่วนประวัติการเป็นหูดมาก่อน (เปอร์เซ็นต์)



ในจำนวนผู้ป่วย 7 คนที่มีประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน ได้สอบถามต่อถึงจำนวนครั้งที่เป็หูด โดยนับรวมการเป็นหูดครั้งนี้ด้วย ดังแสดงในแผนภูมิแท่งที่ 7

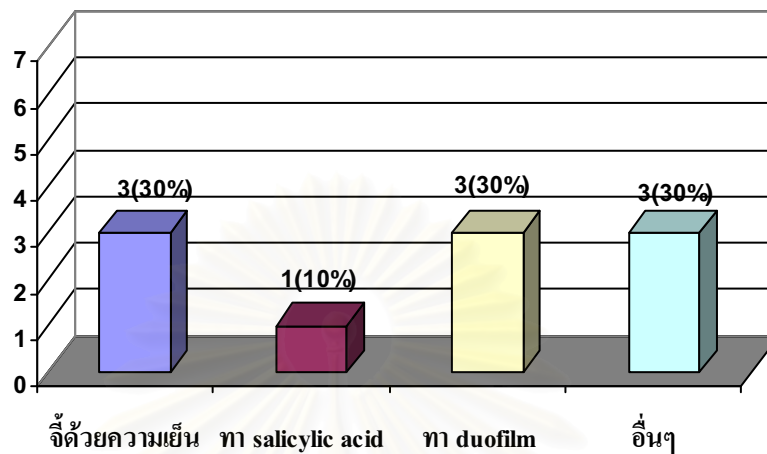
แผนภูมิแท่งที่ 7 แสดงจำนวนครั้งที่ผู้ป่วยเคยเป็นหูดมาก่อน (เปอร์เซ็นต์) (n = 7)



ในจำนวนผู้ที่เคยเป็นหูดมาก่อน 7 ราย ทุกรายเคยผ่านการรักษาหูดเก่ามาหมด ด้วยวิธีต่างๆ

แผนภูมิแท่งที่ 8 แสดงวิธีการรักษาหูดเก่า (เปอร์เซ็นต์)

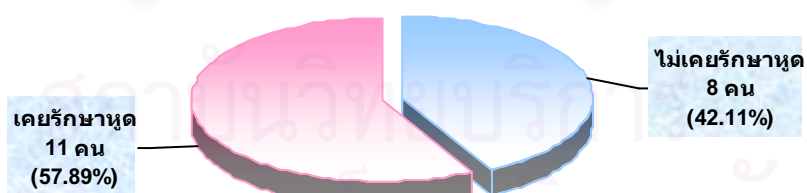
จำนวนคน (เปอร์เซ็นต์)



หมายเหตุ อื่นๆ ได้แก่ การใช้รูปจี้ การกัดหูดด้วยยางมะละกอ ใช้กรรไกรตัดเล็บตัดออก และฝานออก

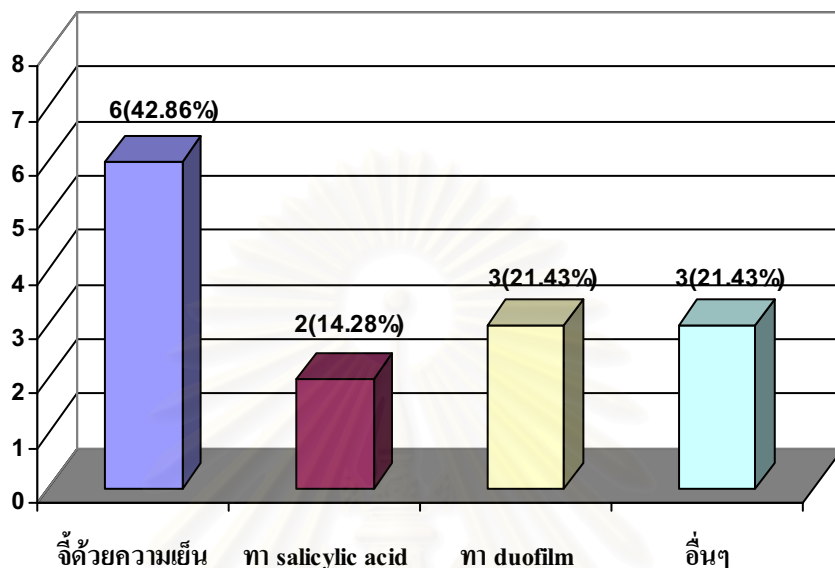
สำหรับรอยโรคหูดที่เข้าร่วมการศึกษาวิจัย ได้สอบถามถึงประวัติการรักษาหูดในครั้งนี้

แผนภูมिवงกลมที่ 3 แสดงสัดส่วนประวัติการรักษาโรคหูดครั้งนี้ (เปอร์เซ็นต์)



แผนภูมิแท่งที่ 9 แสดงวิธีการรักษาหูดครั้งนี้ (เปอร์เซ็นต์)

จำนวนคน (เปอร์เซ็นต์)



หมายเหตุ อื่นๆ ได้แก่ การใช้ชูปี้, การกัดด้วยปูนแดง และ DNCB (first dose at back)

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ Real time PCR

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัย วัดได้จากชิ้นเนื้อหูดที่ตัดไปทำ Real time-PCR ก่อนและหลังการทายา 2-4 สัปดาห์

แสดงผลเป็นค่า mRNA สัมพัทธ์ของ IFN- α (Relative mRNA expression) หรือ สัดส่วนของจำนวน IFN- α เทียบกับจำนวน 18S (the ratio of target mRNA normalized to the levels of 18S)

ซึ่งมีหน่วยเป็นจำนวนเท่าเทียบกับ House keeping genes (18S)

โดยค่าที่วัดได้ในผู้ป่วยแต่ละรายจะมี 4 ค่า คือ

1. mRNA สัมพัทธ์ของ IFN- α ก่อนการรักษา ในรอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม
2. mRNA สัมพัทธ์ของ IFN- α ก่อนการรักษา ในรอยโรคหูดที่ได้รับยาหลอก
3. mRNA สัมพัทธ์ของ IFN- α หลังการรักษา ในรอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม
4. mRNA สัมพัทธ์ของ IFN- α หลังการรักษา ในรอยโรคหูดที่ได้รับยาหลอก

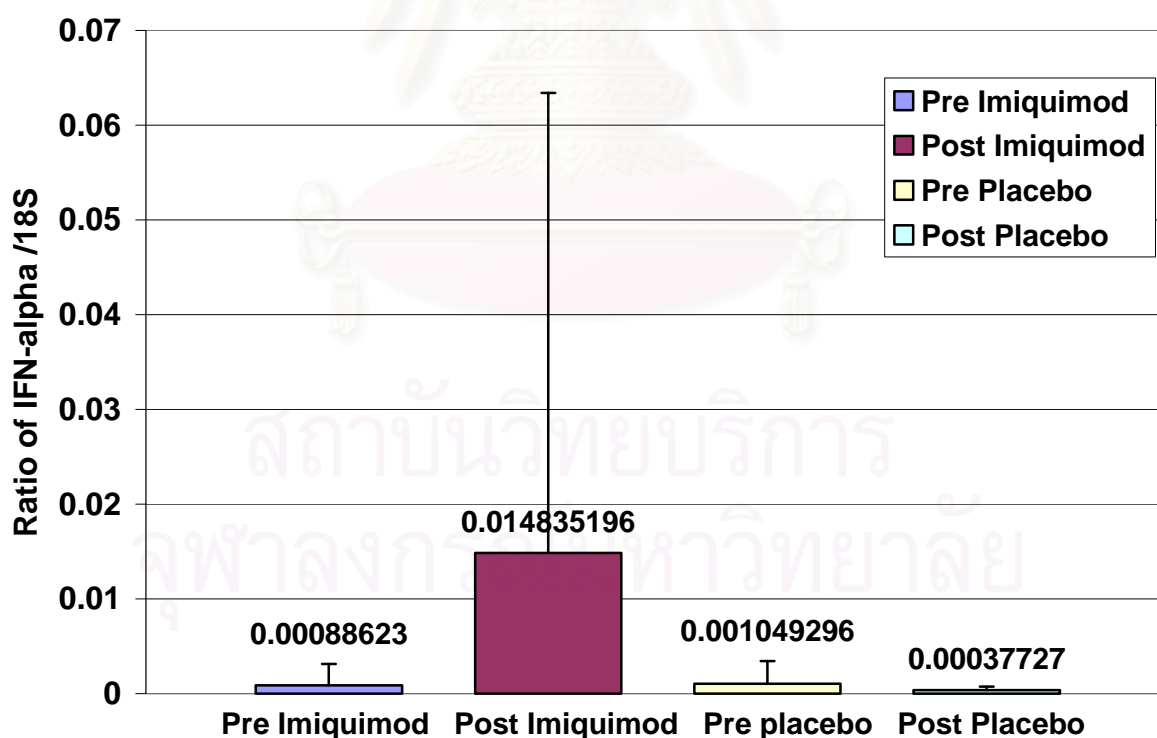
ตารางที่ 8 แสดงค่า mRNA สัมพัทธ์ของ IFN- α (เทียบกับ18S) ในรอยโรคหูตึง 2 ตำแหน่ง ก่อน และหลังการรักษาในผู้ป่วยแต่ละราย

ID	IFN- α /18S ก่อนการรักษา ยา 5% อิมิควิมอด	IFN- α /18S หลังการรักษา ยา 5% อิมิควิมอด	IFN- α /18S ก่อนการรักษา ยาหลอก	IFN- α /18S หลังการรักษา ยาหลอก
1	0.0097186	0.0000358	0.0007698	0.0006606
2	0.0000306	0.0000959	0.0001692	0.0001664
3	0.0001445	0.0000091	0.0007467	0.0006328
4	0.0000545	0.0000294	0.0002281	0.0002241
5	0.0000710	0.0017778	0.0000741	0.0003345
6	0.0000868	0.0000478	0.0002161	0.0000937
7	0.0000308	0.0001560	0.0000089	0.0001899
8	0.0005596	0.0010000	0.0011235	0.0009529
9	0.0008263	0.0001438	0.0014013	0.0001765
10	0.0030469	0.2049608	0.0015899	0.0000112
11	0.0001100	0.0007005	0.0001474	0.0000649
12	0.0002126	0.0001515	0.0003420	0.0001352
13	0.0002408	0.0003733	0.0000642	0.0005544
14	0.0002428	0.0679293	0.0000118	0.0004376
15	0.0007546	0.0001641	0.0107213	0.0002116
16	0.0001374	0.0001789	0.0004717	0.0001161
17	0.0000119	0.0002676	0.0010843	0.0004834
18	0.0000754	0.0004557	0.0000762	0.0001891
19	0.0004834	0.0033916	0.0006902	0.0015333

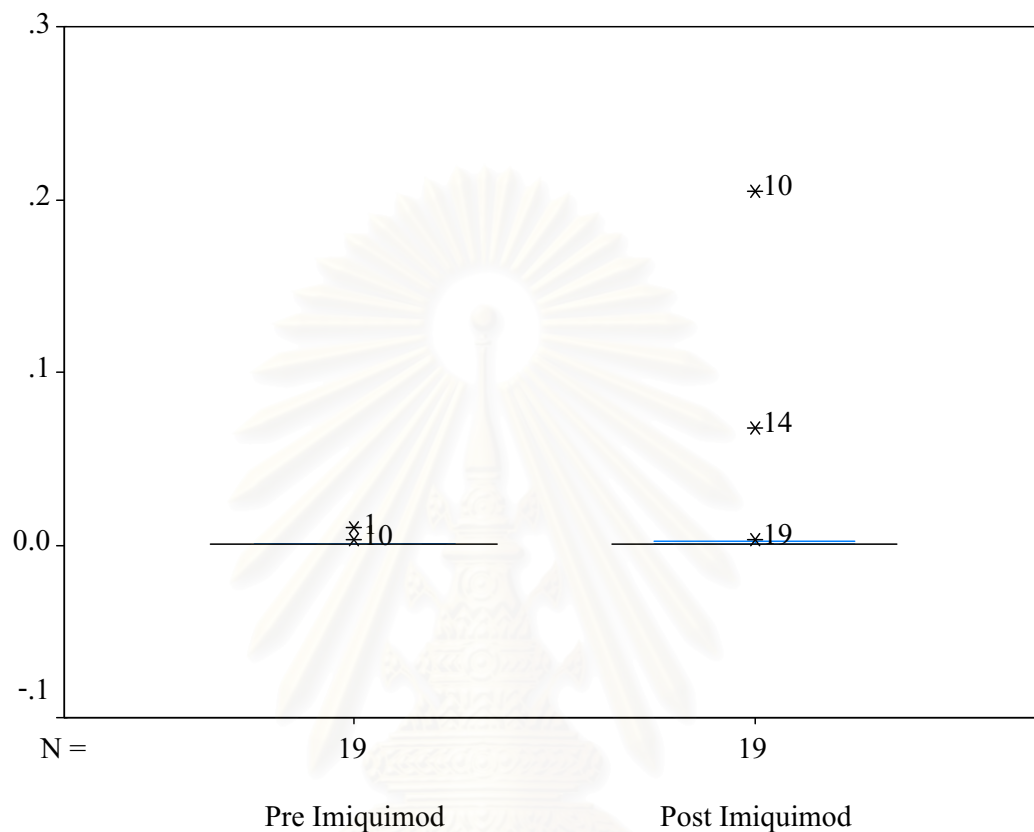
ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ย mRNA ของ IFN- α (เทียบกับ18S) ในรอยโรคหูตทั้ง 2 ตำแหน่ง ก่อนและหลังการรักษา

IFN- α /18S	ก่อนการรักษา ยา 5% อิมิควิมอด	หลังการรักษา ยา 5% อิมิควิมอด	ก่อนการรักษา ยาหลอก	หลังการรักษา ยาหลอก
Mean	0.000886229	0.014835196	0.001049296	0.0003772698
SD	0.00224659	0.04856752	0.00239313	0.00037316
Minimum	0.0000119	0.00000905	0.000008878	0.000011244
Maximum	0.00971864	0.204960836	0.010721311	0.001533333

แผนภูมิแท่งที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของ mRNA ของ IFN- α (เทียบกับ18S) ในรอยโรคหูตทั้ง 2 ตำแหน่ง ก่อนและหลังการรักษา



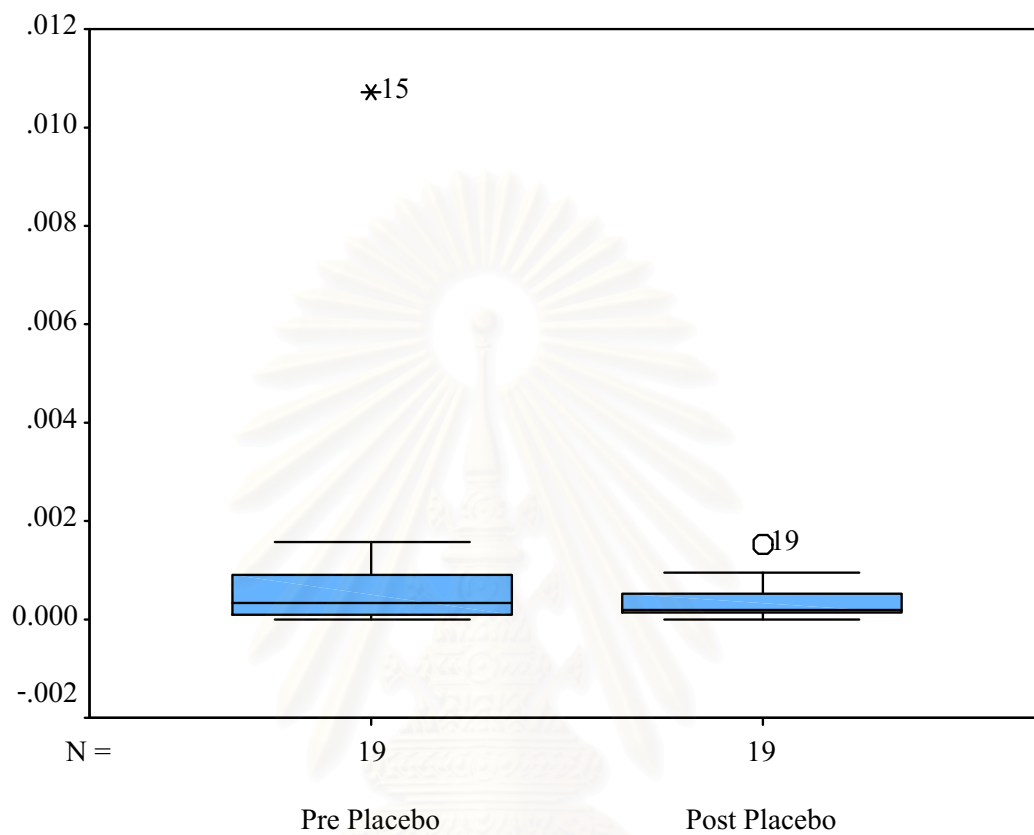
แผนภูมิ Boxplot ที่ 1 แสดงค่า mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูที่เข้ารับยา 5% อิมิกวิมอดครีม เทียบก่อนและหลังการรักษา



จากแผนภูมิ Boxplot แสดงค่า mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคที่เข้ารับยา 5% อิมิกวิมอด ก่อนและหลังรักษา พบว่าในกลุ่มก่อนรักษาด้วย ยา 5% อิมิกวิมอดมีค่าผิดปกติที่อยู่นอกขอบเขตของ ช่วงเชื่อมั่น 99% ไปทางบวก (extremely outlier คือ มากกว่า 3 เท่าของค่า quartile ที่ 3) 2 ราย คือผู้ป่วย รายที่ 1 และรายที่ 10 และในกลุ่มหลังการรักษามีค่าผิดปกติที่อยู่นอกขอบเขตของช่วงเชื่อมั่น 99% ไปทางบวก(extremely outlier) จำนวน 3 ราย คือผู้ป่วยรายที่ 10, รายที่ 14 และรายที่ 19

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

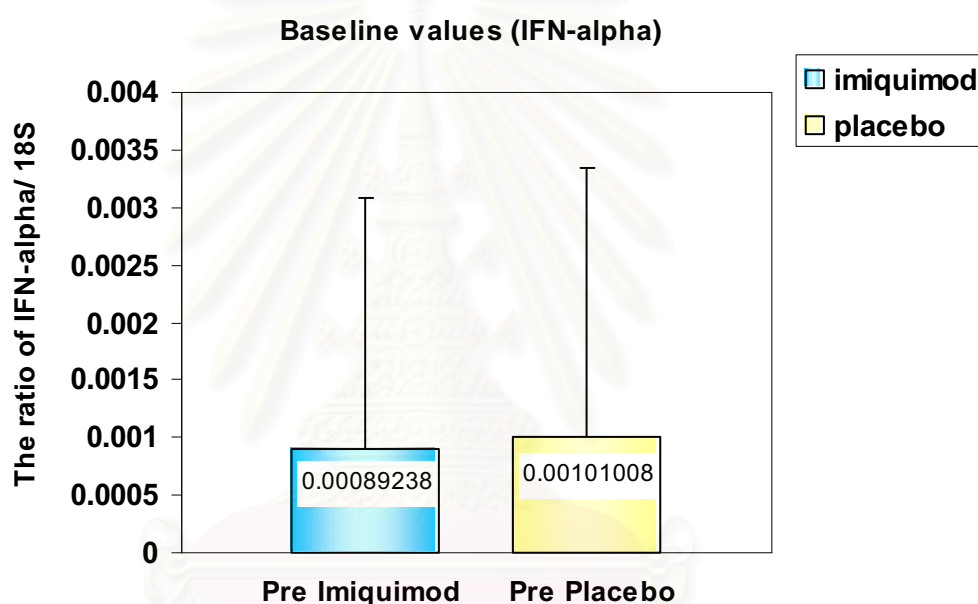
แผนภูมิ Boxplot ที่ 2 แสดงค่า mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดที่ได้รับยาหลอก เทียบก่อนและหลังการรักษา



จากแผนภูมิ Boxplot แสดงค่า mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคก่อนและหลังรักษาด้วยยาหลอกพบว่าในกลุ่มก่อนรักษาด้วย ยา 5% อิมิกวิมอดมีค่าผิดปกติที่อยู่นอกขอบเขตของช่วงเชื่อมั่น 99% ไปทางบวก (extremely outlier) 1 ราย คือผู้ป่วยรายที่ 16 และในกลุ่มหลังการรักษามีค่าผิดปกติที่อยู่นอกขอบเขตของช่วงเชื่อมั่น 92% ไปทางบวก (outlier คือ มากกว่า 1.5 เท่าของค่า quartile ที่ 3) 1 ราย คือผู้ป่วยรายที่ 19

ในการเปรียบเทียบระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดก่อนการรักษาเพื่อเป็น baseline ทั้ง 2 ตำแหน่ง เนื่องจากการทดลองในผู้ป่วยคนเดียวกันทั้ง 2 ตำแหน่งจึงใช้สถิติทดสอบ คือ Wilcoxon signed ranks Test พบว่า ค่า P-value = 0.136 ซึ่งมากกว่า 0.05 หมายความว่า ระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดก่อนการรักษาทั้ง 2 ตำแหน่ง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

แผนภูมิแท่งที่ 11 เปรียบเทียบระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดก่อนการรักษาทั้งในตำแหน่งที่ได้รับยา 5% อิมิควิมอด และยาหลอก



เนื่องจากค่าที่วัดได้มีค่าต่ำเป็นเลขจุดทศนิยม และมีความแตกต่างกันมากในแต่ละบุคคล Standard deviation มีค่าสูงจึงนำค่า mRNA สัมพัทธ์ของ IFN- α มาคำนวณเป็นค่า การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ ของอินเตอร์ฟีรอน อัลฟา (IFN α) ในรอยโรคหูดผิวหนัง ทั้ง 2 ตำแหน่ง ในผู้ป่วยแต่ละคน

$$\text{Ratio changes from baseline} = \left[\frac{\text{Post Treatment} - \text{Pre Treatment}}{\text{Pre Treatment}} \right] * 100$$

(for each patient)

ตารางที่ 10 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของ mRNA ของ IFN α ในผู้ป่วยแต่ละราย

ผู้ป่วย	ยา 5% อิมิกวิมอด	ยาหลอก
1	-99.63	-14.19
2	213.32	-1.64
3	-93.74	-15.26
4	-45.97	-1.75
5	2404.69	351.13
6	-44.97	-56.64
7	406.45	2039.31
8	78.69	-15.18
9	-82.60	-87.40
10	6626.92	-99.29
11	536.93	-55.96
12	-28.73	-60.48
13	55.02	762.91
14	27882.77	3612.30
15	-78.25	-98.03
16	30.21	-75.39
17	2148.74	-55.42
18	504.38	148.16
19	601.62	122.15

จากตารางดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่าค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN- α มีความแตกต่างกันมากในแต่ละบุคคล ดังนั้นจึงเริ่มจากการทดสอบข้อมูลก่อนว่ามีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ โดยใช้สถิติทดสอบ คือ Kolmogorov-Smimov Test

โดยกำหนดสมมติฐานว่า

Ho: ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ

Ha: ข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่เป็นปกติ

(ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$)

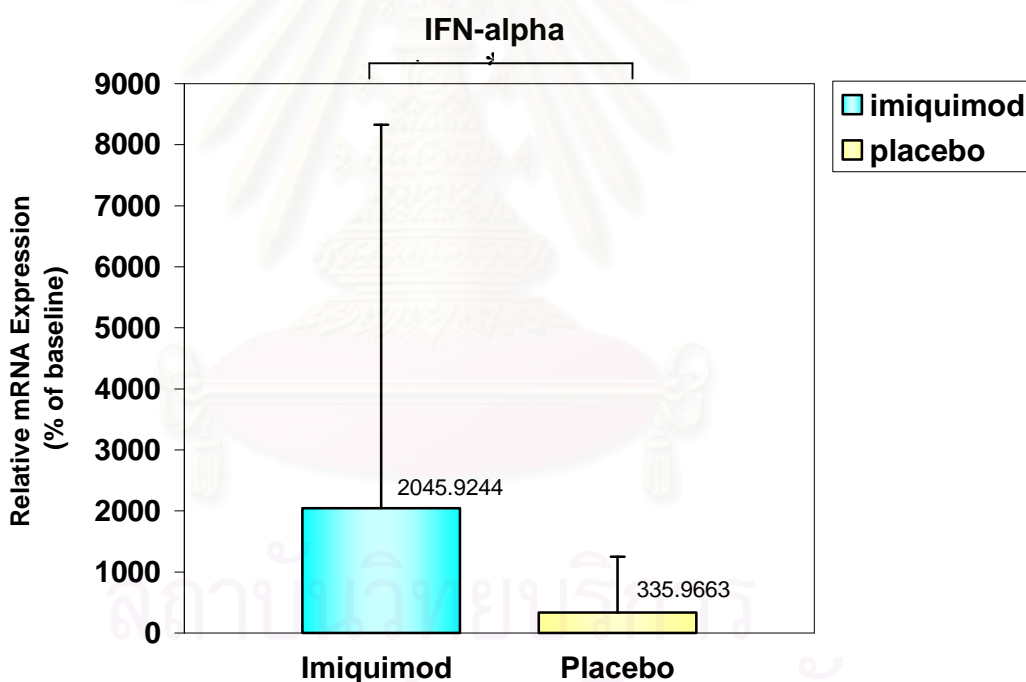
ตารางที่ 11 แสดงลักษณะค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดทั้ง 2 ตำแหน่ง

Ratio change from baseline	ยา 5% อิมิกวิมอด	ยาหลอก
Number	19	19
Mean	2158.729	336.8072
SD	6430.762	938.1101
Minimum	-99.63	-99.29
Maximum	27882.77	3612.30
Skewness	3.965	2.961
Std. Error of Skewness	0.524	0.524

ผลพบว่าค่า KS ของข้อมูลค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio change from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอด เท่ากับ 1.679 Asymp. Sig. (2-tailed) = 0.007 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 คือ ข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่เป็นปกติ และค่า KS ของข้อมูลค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดที่ได้รับยาหลอก เท่ากับ 1.609 Asymp. Sig. (2-tailed) = 0.011 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 คือ ข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่เป็นปกติด้วย

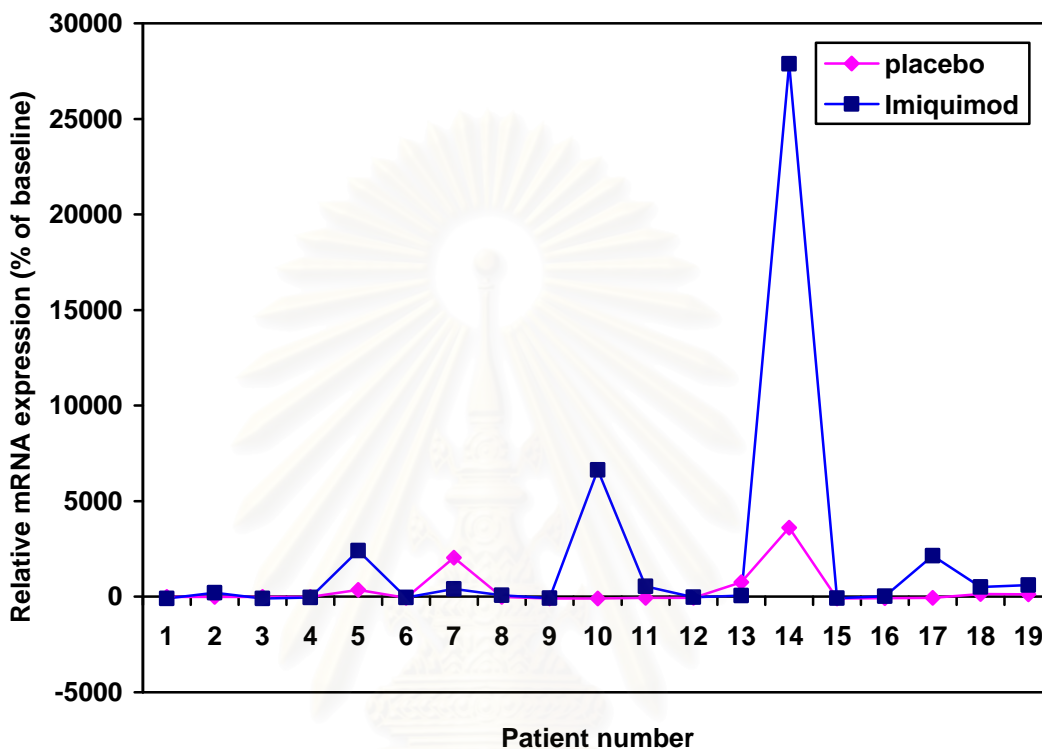
เนื่องจากข้อมูลเป็นเชิงปริมาณ และข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่เป็นปกติ เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดผิวหนังกลุ่มที่ได้รับ ยา 5% อิมิกวิมอดคริม ว่ามีค่าการเปลี่ยนแปลงสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยใช้สถิติทดสอบ คือ Wilcoxon signed ranks Test ซึ่งเป็น non-parametric test พบว่า ค่า P-Value เท่ากับ 0.0265 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 หมายความว่า ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในรอยโรคหูดผิวหนังกลุ่มที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม เทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก

แผนภูมิแท่งที่ 12 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN α ในรอยโรคหูดทั้ง 2 ตำแหน่ง



* $P < 0.05$: Wilcoxon signed rank test ใช้เพื่อเปรียบเทียบ Ratio changes from baseline สำหรับ IFN- α ระหว่างรอยโรคหูดผิวหนังที่ได้รับยา Imiquimod เทียบกับ ยาหลอก ความแตกต่างกันกับ ผิวหนังปกติ

แผนภูมิเส้นที่ 1 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของ IFN α ในรอยโรคที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอด และยาหลอกแต่ละราย



ตารางที่ 12 แสดงสัดส่วนของผู้ป่วยที่มีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN α เพิ่มขึ้นหรือลดลง ในรอยโรคผิวหนังที่ได้รับยาทั้ง 2 ชนิด

จำนวนผู้ป่วย		Ratio changes (Imiquimod)		รวม
		เพิ่มขึ้น	ลดลง	
Ratio changes (Placebo)	เพิ่มขึ้น	6	0	6
	ลดลง	6	7	13
รวม		12	7	19

จากค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดผิวหนัง ทั้ง 2 ตำแหน่ง พบว่า

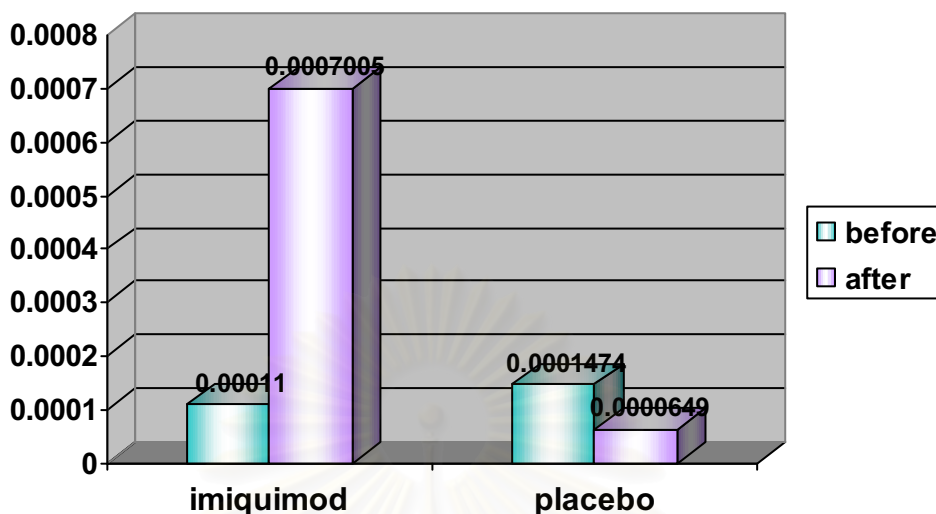
- ผู้ป่วยที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอด มีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนเพิ่มขึ้น (+) หลังทายา จำนวน 12 คน คิดเป็นร้อยละ 63.16
- ผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอกมีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนเพิ่มขึ้น (+) หลังทายา จำนวน 6 คน คิดเป็นร้อยละ 31.58
- ผู้ป่วยที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอด มีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนลดลง (-) หลังทายา จำนวน 7 คน คิดเป็นร้อยละ 36.84
- ผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอกมีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนลดลง (-) หลังทายา จำนวน 13 คน คิดเป็น ร้อยละ 68.42

โดยสามารถแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ของ IFN- α ได้เป็น 3 แบบ ดังนี้

1. รูปแบบที่ 1

มีผู้ป่วย 6 ราย (ผู้ป่วยรายที่ 5, 7, 13, 14, 18 และ 19) ที่มีการเพิ่มขึ้นของค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของระดับ mRNA ของ IFN- α ทั้ง 2 ตำแหน่ง และในจำนวนผู้ป่วย 6 รายนี้ มีผู้ป่วย 4 รายที่รอยโรคที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีมี มีค่า mRNA for IFN α สูงขึ้นหลังการรักษามากกว่า รอยโรคที่ได้รับยาหลอก

ผู้ป่วยรายที่ 5 เป็นเพศชาย อายุ 15 ปี เป็นหูดที่เข้าซ่าย และข้อเท้าซ่าย มานาน 24 เดือน ไม่เคยเป็นหูดมาก่อน หูดครั้งนี้เคยรักษาด้วยการจี้เย็นแต่ไม่หาย ผลการรักษาพบว่ารอยโรคหูดมีขนาดเล็กลง 25-50% ในตำแหน่งที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีมี มีอาการแดงหลังทายา 2 สัปดาห์ ส่วนหูดที่ได้รับยาหลอก หูดมีขนาดเล็กลง < 25% มีอาการแดงหลังทายา 4 สัปดาห์ ทำการตัดชิ้นเนื้อครั้งที่สอง หลังจากทายา 28 วัน ผลการทำ Real time PCR พบว่าระดับ mRNA for IFN α เพิ่มขึ้นทั้ง 2 ตำแหน่ง แต่รอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีมี เพิ่มขึ้นมากกว่า โดยค่า mRNA for IFN α / 18S ก่อนและหลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีมี เท่ากับ 0.0000710 และ 0.0017778 ตามลำดับ ส่วนตำแหน่งที่ได้รับยาหลอกระดับ mRNA for IFN α / 18S ลดลงหลังทายา ค่า mRNA for IFN α / 18S ก่อนและหลัง เท่ากับ 0.0000741 และ 0.0003345 ตามลำดับ ดังแผนภูมิแห่งที่ 13

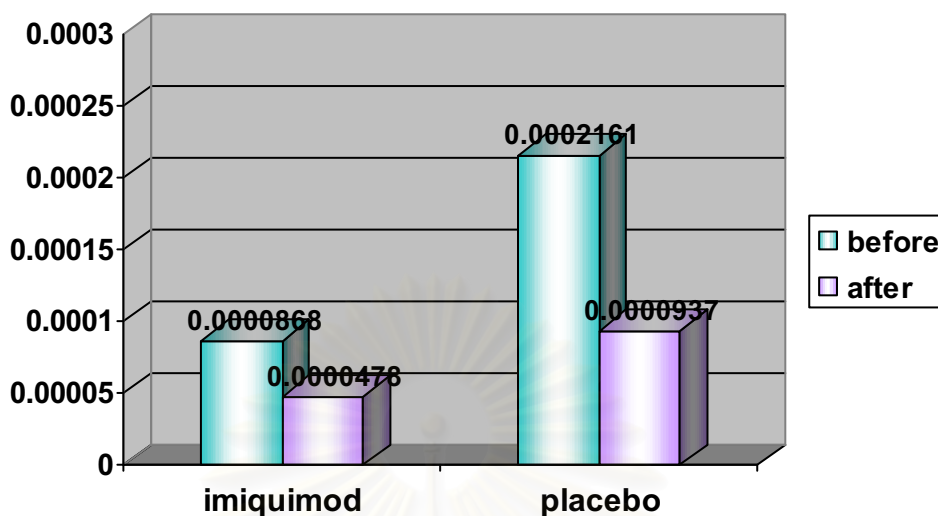


แผนภูมิแท่งที่ 13 แสดงค่าระดับ mRNA for IFN α / 18S ในรอยโรคหูดของผู้ป่วยรายที่ 5 ก่อนและ หลังได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม และยาหลอก

2. รูปแบบที่ 2

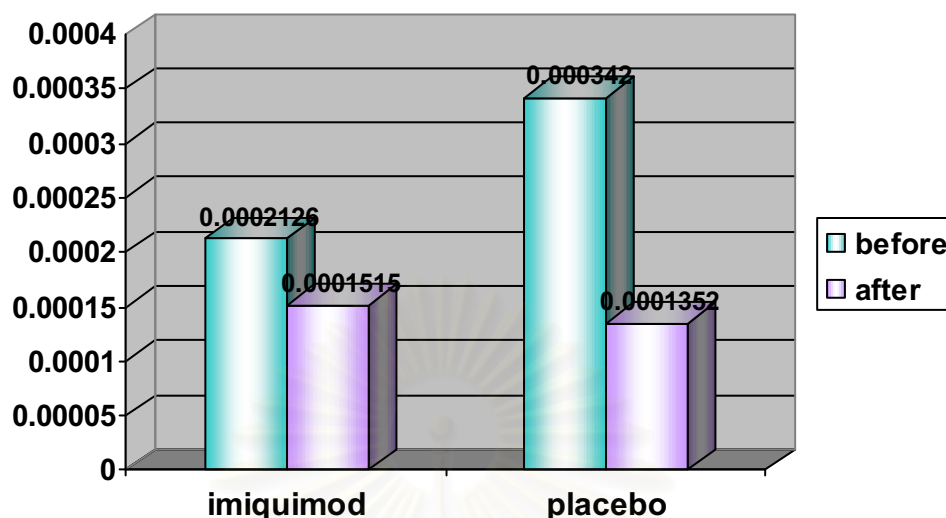
มีผู้ป่วย 7 ราย (ผู้ป่วยรายที่ 1, 3, 4, 6, 9, 12 และ 15) ที่ค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนทั้ง 2 ตำแหน่งลดลงหลังทายา และในผู้ป่วย 7 รายนี้ พบว่ามีผู้ป่วย 4 รายที่รอยโรคที่ได้รับยาหลอกมีค่า mRNA for IFN α ลดลงหลังการรักษามากกว่า รอยโรคที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม

ผู้ป่วยรายที่ 6 เป็นเพศหญิง อายุ 35 ปี เป็นหูดที่ข้างเล็บนิ้วชี้มือขวา และข้างเล็บนิ้วก้อยมือขวานาน 7 เดือน เคยเป็นหูดมาก่อนแล้ว 2 ครั้งรวมครั้งนี้ หูดครั้งแรกรักษาด้วยวิธี cryosurgery แล้วหายไป หูดครั้งนี้ไม่เคยรักษาใดๆมาก่อน ผลการรักษาดีรอยโรคหูดมีขนาดเล็กลงมากกว่า 75% ทั้ง 2 ตำแหน่ง ตัดขึ้นเนื้อครั้งที่สองหลังจากทายา 24 วัน ผลการทำ Real time PCR พบว่าระดับ mRNA for IFN α ลดลงหลังทายาทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยในตำแหน่งที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม ค่า mRNA for IFN α / 18S ก่อนและหลัง เท่ากับ 0.0000868 และ 0.000478 ตามลำดับ ในตำแหน่งที่ได้รับยาหลอก ค่า mRNA for IFN α / 18S ก่อนและหลัง เท่ากับ 0.0002161 และ 0.0000937 ตามลำดับ ดังในแผนภูมิแท่งที่ 14



แผนภูมิแท่งที่ 14 แสดงค่าระดับ mRNA for IFN̑ / 18S ในรอยโรคหูดของผู้ป่วยรายที่ 6 ก่อนและ หลังได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม และยาหลอก

ผู้ป่วยรายที่ 12 เป็นเพศหญิง อายุ 21 ปี เป็นหูดที่ข้างเล็บนิ้วโป้งมือซ้าย และข้างเล็บนิ้วชี้มือ ขวามานาน 6 เดือน เคยเป็นหูดมาก่อนแล้ว 3 ครั้งรวมครั้งนี้ หูดครั้งก่อนๆ ไม่เคยรักษา และหูดครั้งนี้เคย รักษาด้วยยาทา 40% salicylic acid มาก่อนหน้านี้นานกว่า 4 สัปดาห์ ผลการรักษาดีขึ้นเนื้อหูดมีขนาด เล็กลง 50-75% จนต้องตัดชิ้นเนื้อครั้งที่สองหลังจากทายาเพียง 14 วันทั้ง 2 ตำแหน่ง ผลการทำ Real time PCR พบว่าระดับ mRNA for IFN̑ ลดลงหลังทายาทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยในตำแหน่งที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม ค่า mRNA for IFN̑ / 18S ก่อนและหลัง เท่ากับ 0.0002126 และ 0.0001515 ตาม ลำดับ ในตำแหน่งที่ได้รับยาหลอก ค่า mRNA for IFN̑ / 18S ก่อนและหลัง เท่ากับ 0.0003420 และ 0.0001352 ตามลำดับ ตั้งในแผนภูมิแท่งที่ 15

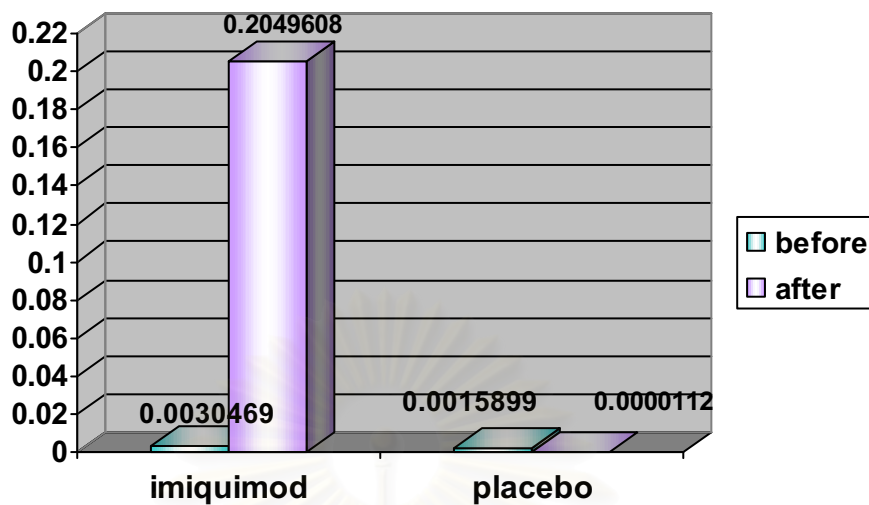


แผนภูมิแท่งที่ 15 แสดงค่าระดับ mRNA for IFN̑ / 18S ในรอยโรคหูดของผู้ป่วยรายที่ 12 ก่อนและ หลังได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม และยาหลอก

3. รูปแบบที่ 3

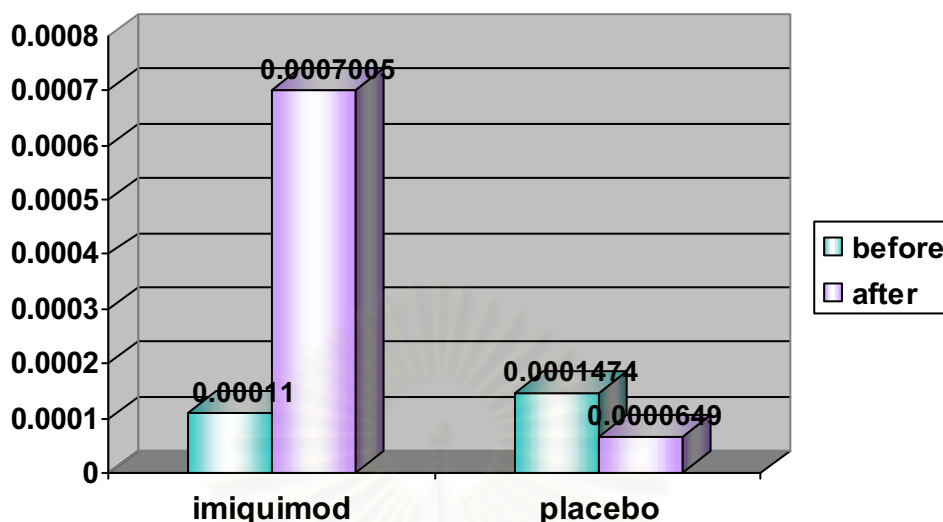
มีผู้ป่วย 6 ราย (ผู้ป่วยรายที่ 2, 8, 10, 11, 16 และ 17) ที่มีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนในรอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอด เพิ่มขึ้น แต่ค่าลดลงในรอยโรคที่ได้รับยาหลอก

ผู้ป่วยรายที่ 10 เป็นเพศชาย อายุ 49 ปี เป็นหูดที่นิ้วโป้งมือขวา และหลังมือขวานาน 12 เดือน เคยเป็นหูดมาก่อน 2 ครั้งรวมครั้งนี้ หูดเก่าเคยรักษาโดยใช้ธูปจี้ และกรรไกรตัดเล็บบัต หูดครั้งนี้ไม่เคยรักษาใดๆมาก่อน ผลการรักษาดีรอยโรคหูดมีขนาดเล็กลง 50-75% ในตำแหน่งที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม โดยมีอาการมีอาการแดง คัน ลอก แสบร้อน และมีรอยถลอกตื้นๆ ตั้งแต่ 2 สัปดาห์หลังทาสวนหูดที่ได้รับยาหลอกขนาดเล็กลงเพียงเล็กน้อย < 25% และหลังทายามีอาการลอก และถลอกตื้นๆ โดยผู้ป่วยประเมินผลข้างเคียงอยู่ใน ordinal scale อันดับที่ 1 (mild) คือ มีการระคายเคืองเล็กน้อยไม่รบกวนผู้ป่วยและกิจวัตรประจำวัน ทำการตัดชิ้นเนื้อครั้งที่สองหลังจากทายา 15 วัน ผลการทำ Real time PCR พบว่าระดับ mRNA for IFN̑ เพิ่มขึ้นในตำแหน่งที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม ค่า mRNA for IFN̑ / 18S ก่อนและหลัง เท่ากับ 0.0030469 และ 0.2049608 ส่วนตำแหน่งที่ได้รับยาหลอกระดับ mRNA for IFN̑ / 18S ลดลงหลังทายา ค่า mRNA for IFN̑ / 18S ก่อนและหลัง เท่ากับ 0.0015899 และ 0.0000112 ตามลำดับ ดังแผนภูมิแท่งที่ 16



แผนภูมิแท่งที่ 16 แสดงค่าระดับ mRNA for IFN α / 18S ในรอยโรคหูดผู้ป่วยรายที่ 10

ผู้ป่วยรายที่ 11 เป็นเพศชาย อายุ 17 ปี เป็นหูดที่นิ้วกลางเท้าซ้ายมือขวา และข้างเล็บนิ้วก้อยมือขวานาน 36 เดือน ไม่เคยเป็นหูดมาก่อน หูดครั้งนี้ไม่เคยรักษามาก่อน ผลการรักษาดีรอยโรคหูดมีขนาดเล็กถึง 50-75% ทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยหูด 5% อิมิกวิมอดคริมมีอาการแดง คัน และลอกตั้งแต่ 2 สัปดาห์หลังได้รับยา ส่วนหูดที่ได้รับยาหลอกก็มีอาการเช่นกัน โดยผู้ป่วยประเมินผลข้างเคียงอยู่ใน ordinal scale อันดับที่ 1 (mild) ทำการตัดชิ้นเนื้อครั้งที่สองหลังจากทายา 33 วัน ผลการทำ Real time PCR พบว่าระดับ mRNA for IFN α เพิ่มขึ้นในตำแหน่งที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม ค่า mRNA for IFN α / 18S ก่อนและหลัง เท่ากับ 0.0001100 และ 0.0007005 ตามลำดับ ส่วนตำแหน่งที่ได้รับยาหลอกระดับ mRNA for IFN α / 18S ลดลงหลังทายา ค่า mRNA for IFN α / 18S ก่อนและหลัง เท่ากับ 0.0001474 และ 0.0000649 ตามลำดับ ดังแผนภูมิแท่งที่ 17



แผนภูมิแท่งที่ 17 แสดงค่าระดับ mRNA for IFN α / 18S ในรอยโรคหูดของผู้ป่วยรายที่ 11 ก่อนและ หลังได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม และยาหลอก

เมื่อนำมาผู้ป่วยมาแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (subgroup analysis) เพื่อดูปัจจัยที่มีผลต่อระดับ mRNA ของ IFN- α โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มี ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้น และลดลงหลังการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดครีม หรือยาหลอก ตามด้วยแผ่นปิดร่วมกับ 20% ซาลิไซลิก แอซิด โดยในการวิเคราะห์ปัจจัยด้านเพศ, ตำแหน่งรอยโรคหูด, ประวัติเคยเป็นหูด, ประวัติเคยรักษาหูดมาก่อน และความแดงของหูด ซึ่งเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพมีความแตกต่างกันหรือไม่ ใช้ การวิเคราะห์ด้วยวิธี Chi-square test

ส่วนปัจจัยด้านอายุ, ระยะเวลาที่เป็นหูด และความหนาหูดก่อนการรักษา ซึ่งเป็นข้อมูลเชิงปริมาณมีความแตกต่างกันหรือไม่ ใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธี Independent-samples t test

พบว่าปัจจัยด้านตำแหน่งรอยโรคหูด, ประวัติเคยเป็นหูด และประวัติเคยรักษาหูดมาก่อนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยระดับความเชื่อมั่น 95%

ส่วนปัจจัยด้านเพศพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.004) โดยกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังทายาหลอกเป็นเพศชายมากกว่าจำนวน 11 ราย เพศหญิง 1 ราย ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้นเป็นเพศหญิงมากกว่าจำนวน 5 ราย และเพศชาย 2 ราย ซึ่งพบความแตกต่างด้านเพศเช่นเดียวกับในกลุ่มผู้ป่วยที่รอยโรคได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม

ในด้านความแดงของหูดขณะตัดชิ้นเนื้อหลังการรักษา พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.048$) โดยกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นจะมีจำนวนรอยโรคหูดที่มีความแดงมากกว่า จำนวน 9 ราย และไม่มีความแดงจำนวน 3 ราย ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้น พบว่ามีผู้ป่วยที่รอยโรคหูดที่มีความแดงน้อยกว่า จำนวน 2 ราย และไม่มีความแดงจำนวน 5 ราย (ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 13)

ส่วนปัจจัยด้านอายุ ระยะเวลาที่เป็นหูด และความหนาของหูดก่อนการรักษา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 13 แสดงสัดส่วนจำนวนของผู้ป่วยที่มีความแดงของรอยโรคหูดขณะตัดชิ้นเนื้อ หลังการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดครีม และมีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN α เพิ่มขึ้น หรือลดลง

จำนวนผู้ป่วย		Ratio changes of mRNA for IFN α		รวม
		ลดลง	เพิ่มขึ้น	
ความแดงของหูด (ยา 5% อิมิกวิมอดครีม)	ไม่แดง	5	3	8
	แดง	2	9	11
รวม		7	12	19

ส่วนในการเปรียบเทียบกลุ่มที่มี ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้น และไม่เพิ่มขึ้น โดยการรักษายาหลอก ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติเช่นเดียวกัน

ผลพบว่าปัจจัยด้านตำแหน่งรอยโรคหูด และประวัติเคยรักษาหูดมาก่อน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนปัจจัยด้านเพศพบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.044$) โดยกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังได้รับยาหลอกทั้งหมด 6 ราย เป็นเพศชายทั้งหมด ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้นทั้งหมด 13 ราย เป็นเพศชายใกล้เคียงกับเพศหญิง คือ เพศชายจำนวน 7 ราย และเพศหญิง 6 รายตามลำดับ โดยพบว่ากลุ่มที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นจะเป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในรอยโรคที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดครีม และยาหลอก

ในด้านประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน กลุ่มที่ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังทายาหลอก ทั้งหมด 6 ราย ไม่เคยมีประวัติเป็นหูดมาก่อน และในกลุ่มที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้นนั้นมีผู้ที่มีประวัติเคยเป็นหูด และไม่เคยเป็นหูดมาก่อน ใกล้เคียงกัน คือ 7 ราย และ 6 รายตามลำดับ

ในด้านความแดงของหูดขณะตัดชิ้นเนื้อหลังการรักษาด้วยยาหลอก พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม โดยกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังทายาหลอกจำนวน 6 ราย รอยโรคหูดส่วนใหญ่ก็พบว่ามีความแดงขณะตัดชิ้นเนื้อ มีจำนวน 4 ราย และมีจำนวน 2 รายที่รอยโรคไม่แดง ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้น จำนวน 13 คน พบมีจำนวนผู้ป่วยที่รอยโรคหูดที่มีความแดงเป็นจำนวนน้อย 3 ราย และส่วนใหญ่จะไม่มีสีแดงจำนวน 10 ราย (ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 14) ซึ่งในรอยโรคที่ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้น และไม่เพิ่มขึ้นมีจำนวนรอยโรคที่มีความแดงหลังทายาหลอก ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนปัจจัยด้านอายุ ระยะเวลาที่เป็นหูด และความหนาของหูดก่อนการรักษา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 14 แสดงสัดส่วนจำนวนของผู้ป่วยที่มีความแดงของรอยโรคหูดขณะตัดชิ้นเนื้อ หลังการรักษาด้วยยาหลอก และมีค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN α เพิ่มขึ้น หรือลดลง

จำนวนผู้ป่วย		Ratio changes of mRNA for IFN α		รวม
		ลดลง	เพิ่มขึ้น	
ความแดงของหูด (ยาหลอก)	ไม่แดง	10	2	12
	แดง	3	4	7
รวม		13	6	19

ตารางที่ 15 แสดงสัดส่วนและค่าเฉลี่ยของปัจจัยต่างๆ เปรียบเทียบในกลุ่มที่มี ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้น หรือไม่เพิ่มขึ้นหลังการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดคริม

ตัวแปร	ค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของระดับ mRNA ของ IFN α		
	เพิ่มขึ้น	ลดลง	p-value
เพศ (ชาย:หญิง)	11 : 1	1 : 2.5	0.004
อายุ (mean)	28.67	30.86	0.174
ตำแหน่งรอยโรค : คน (%)			0.361
นิ้วมือ	5 (41.7%)	4 (57.1%)	
นิ้วเท้า	2 (16.7%)	1 (14.3%)	
รอบเล็บ	-	2 (28.6%)	
ฝ่ามือ	1 (8.3%)	-	
ข้อศอก	1 (8.3%)	-	
หลังมือ	2 (16.7%)	-	
เข่า	1 (8.3%)	-	
ประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน เคย : ไม่เคยเป็น	1:3	1.33:1	0.161
ประวัติเคยรักษาหูดมาก่อน เคย : ไม่เคย	1 : 1	1.6 : 1	0.39
ระยะเวลาเฉลี่ยที่เป็นหูด (เดือน)	26.08 +/- 18.3	14.14 +/- 16.5	0.174
ความหนาหูด (mm.)	2.042 +/- 0.65	1.786 +/- 0.49	0.384
ความแดง (แดง : ไม่แดง)	3 : 1	1 : 2.5	0.048

ตารางที่ 16 แสดงสัดส่วนและค่าเฉลี่ยของปัจจัยต่างๆ เปรียบเทียบในกลุ่มที่มี ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้น หรือไม่เพิ่มขึ้นหลังการรักษาด้วยยาหลอก

ตัวแปร	ค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของระดับ mRNA ของ IFN α		
	เพิ่มขึ้น (n=6)	ลดลง (n=13)	p-value
เพศ (ชาย:หญิง)	6:0	1.16 :1	0.044
อายุ (mean)	26.17	31.0	0.530
ตำแหน่งรอยโรค : คน (%)			0.680
นิ้วมือ	2 (33.3%)	5 (38.4%)	
นิ้วเท้า	1 (16.7%)	3 (23.1%)	
รอบเล็บ	1 (16.7%)	3 (23.1%)	
ฝ่ามือ	1 (16.7%)	1 (7.7%)	
ข้อศอก	-	-	
ข้อเท้า	1 (16.7%)	1 (7.7%)	
ประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน เคย : ไม่เคยเป็น	0:6	1.16:1	0.024
ประวัติเคยรักษาหูดมาก่อน เคย : ไม่เคย	1 : 1	1.6 : 1	0.636
ระยะเวลาเฉลี่ยที่เป็นหูด (เดือน)	30.33 +/- 11.3	17.69 +/- 19.7	0.165
ความหนาหูด (mm.)	2.17 +/- 0.7	1.73 +/- 0.5	0.144
ความแดง (แดง : ไม่แดง)	2 : 1	1 : 3.33	0.067

การประเมินผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมิน)

ตารางที่ 17 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยาโดยผู้ป่วยประเมิน เป็น ordinal scale 1-4

ผู้ป่วย	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ 4	
	Imiquimod	Placebo	Imiquimod	Placebo
1	1	1	1	1
2	1	1	1	1
3	1	1	1	1
4	2	2	2	2
5	1	1	1	1
6	1	1	1	1
7	2	1	2	1
8	1	1	1	1
9	1	1	1	1
10*	2	1	-	-
11	1	1	1	1
12*	1	1	-	-
13	1	1	1	1
14	1	1	1	1
15	1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	1	1	1	1
18	1	1	1	1
19	1	1	1	1

หมายเหตุ * คือผู้ป่วยที่ทำการตัดชิ้นเนื้อหลังการรักษาหลังจากทายา 2 สัปดาห์ เนื่องจากหูดมีขนาดเล็ก

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมิน) แบ่งได้เป็น 4 ระดับ ดังนี้

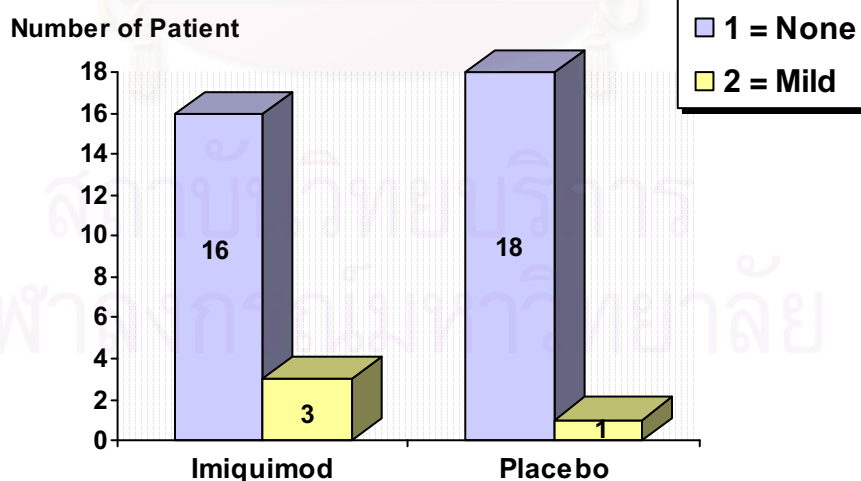
- 1) ไม่มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา (none)
- 2) มีผลเล็กน้อย (mild) มีการระคายเคืองเล็กน้อยไม่รบกวนผู้ป่วย และไม่รบกวนต่อกิจวัตรประจำวัน
- 3) มีผลปานกลาง (moderate) ค่อนข้างรบกวนผู้ป่วยแต่ยังไม่รบกวนกิจวัตรประจำวัน
- 4) มีผลรุนแรง (severe) ผลข้างเคียงของยารบกวนต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย

เนื่องจากค่าที่วัดในการประเมินผลข้างเคียงนี้เป็น ordinal scale เมื่อนำมาคำนวณเพื่อเปรียบเทียบว่ามีความแตกต่างระหว่างสองกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ จึงต้องใช้วิธี Wilcoxon sign ranks test พบว่าค่า p-value ในสัปดาห์ที่ 2 เท่ากับ 0.157 ในสัปดาห์ที่ 4 เท่ากับ 0.317

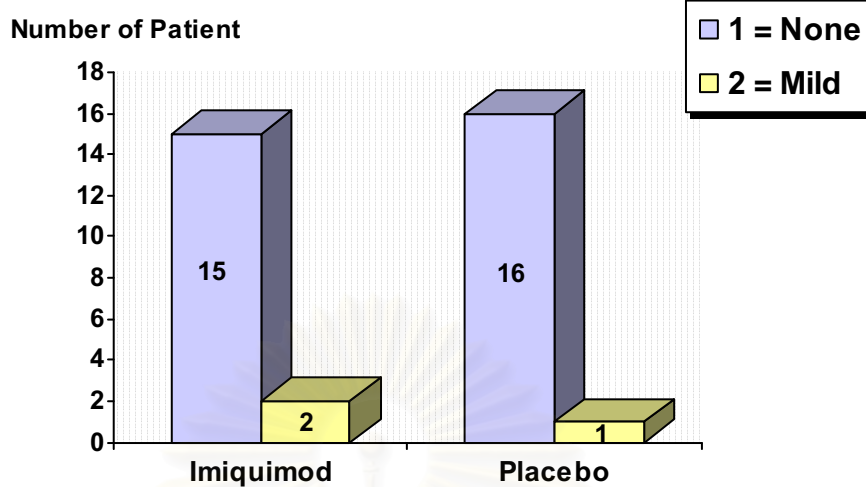
เมื่อมีการวัดหลายครั้งเพื่อประเมินสิ่งเดียวกัน ค่า α จะไม่เท่ากับ 0.05 ต้องมีการคำนวณหา α_{new} โดยใช้ Bonferroni correction คือ

$$\begin{aligned}\alpha_{\text{new}} &= 0.05 / \text{จำนวนคู่ทั้งหมดที่ต้องการเปรียบเทียบ} \\ &= 0.05 / 2 \\ &= 0.025\end{aligned}$$

ดังนั้นการแปลผลว่ามีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ ค่า p-value ต้องน้อยกว่า 0.025



แผนภูมิแท่งที่ 17 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมิน) ในสัปดาห์ที่ 2 หลังทายา



แผนภูมิแท่งที่ 18 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมน) ในสัปดาห์ที่ 4 หลัง
ทายา

สรุปได้ว่าการเปรียบเทียบผลข้างเคียงในการใช้ยาทั้งสองกลุ่มโดยผู้ป่วยเป็นผู้ประเมน
ผลข้างเคียงของยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในสัปดาห์ที่ 2 และ
4 โดย ผลข้างเคียงที่ผู้ป่วยประเมนทั้งหมดอยู่ในระดับ 1 และ 2 เท่านั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การประเมินผลข้างเคียงจากการใช้ยา (แพทย์เป็นผู้ประเมิน)

ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลนับ ว่ามีหรือไม่มีผลข้างเคียงนั้น นำมาคิดเป็นร้อยละ

ตารางที่ 18 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยาโดยแพทย์เป็นผู้ประเมิน คิดเป็นร้อยละ

ผู้ป่วย	ผลข้างเคียงคิดเป็นร้อยละ (จำนวนคน)			
	สัปดาห์ที่ 2		สัปดาห์ 4	
	Imiquimod	Placebo	Imiquimod	Placebo
คัน (itching)	15% (3)	5% (1)	11.1% (2)	5.6% (1)
แดง (erythema)	50% (10)	25% (5)	55.6% (10)	27.8% (5)
แสบร้อน (burning)	5% (1)	0	0	0
ตุ่มน้ำใส (vesicle)	0	0	0	0
ลอก (flaking or excoriation)	55% (11)	45% (9)	44.4% (8)	50% (9)
แผลถลอกตื้น (erosion)	10% (2)	10% (2)	5.3% (1)	16.7% (3)
แผลลึกถึงชั้นหนัง แท้ (ulcer)	0	0	0	0
บวม (edema)	5% (1)	0	5.6% (1)	0

เนื่องจากค่าที่วัดในการประเมินผลข้างเคียงนี้เป็นข้อมูลชนิดนับ คือมีหรือไม่มีอาการ เมื่อนำมาคำนวณเพื่อเปรียบเทียบว่ามีความแตกต่างระหว่างสองกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ จึงต้องใช้วิธี Mc Nemar Chi-square ในแต่ละคู่

พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 กลุ่มที่ใช้ยา 5% อิมิควิมอคครีมมีอาการคันร้อยละ 15 มีอาการแดงค่อนข้างมากร้อยละ 50 มีอาการแสบร้อนร้อยละ 5 มีอาการลอกร้อยละ 55 มีแผลถลอกตื้นร้อยละ 10 และมีอาการบวมร้อยละ 5 ในกลุ่มที่ใช้ยาหลอกมีอาการคันในร้อยละ 5 มีอาการแดงร้อยละ 25 มีอาการลอกร้อยละ 45 และมีแผลถลอกตื้นร้อยละ 10 และจากการวิเคราะห์ผลข้างเคียงในแต่ละคู่ ผลข้างเคียงของยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} > 0.05$)

ในสัปดาห์ที่ 4 กลุ่มที่ใช้ยา 5% อิมิควิมอคครีมมีอาการคันในร้อยละ 11.1 มีอาการแดงร้อยละ 55.6 มีอาการลอกร้อยละ 44.4 มีแผลถลอกตื้นร้อยละ 10 และมีอาการบวมร้อยละ 5.6 ในกลุ่มที่ใช้ยาหลอกมีอาการคันในร้อยละ 5.6 มีอาการแดงร้อยละ 27.8 มีอาการลอกร้อยละ 50 และมีแผลถลอกตื้นร้อยละ 16.7 และจากการวิเคราะห์ในแต่ละคู่ผลข้างเคียงของยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} > 0.05$)

สรุปผลการวิจัยโดยภาพรวม

ตัวแปร	ยา 5% อิมิกวิมอดครีม	ยาหลอก	p-value
เพศ (ชาย:หญิง)	2.17:1	2.17:1	-
อายุ (mean)	29.47	29.47	-
ตำแหน่งรอยโรค			
นิ้วมือ	9 (52.65%)	7 (36.84%)	-
นิ้วเท้า	3 (15.79%)	4 (21.05%)	-
รอบเล็บ	1 (5.26%)	3 (15.79%)	-
ฝ่ามือ	1 (5.26%)	2 (10.53%)	-
ข้อศอก	1 (5.26%)	1 (5.26%)	-
หลังมือ	2 (10.53%)	-	-
ข้อเท้า	-	1 (5.26%)	-
เข่า	1 (5.26%)	-	-
ประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน เคย : ไม่เคยเป็น	1:1.71	1:1.71	-
ประวัติเคยรักษาหูดมาก่อน เคย : ไม่เคย	1.375:1	1.375:1	-
ระยะเวลาเฉลี่ยที่เป็นหูด (เดือน)	21.68	21.68	-
ความหนาหูด (mm.)	2.0	1.868	0.399
Means of Ratio changes	2158.729	336.8072	0.0265
SD of Ratio changes	6430.762	938.1101	(Wilcoxon test)
ผลข้างเคียง (ผู้ป่วยประเมิน) 1-4 ordinal scale (median)			
สัปดาห์ที่ 2	1 (none)	1 (none)	0.157
สัปดาห์ที่ 4	1 (none)	1 (none)	0.317

เนื่องจากการทดลองในบุคคลเดียวกันดังนั้นปัจจัยทางด้านเพศ อายุ อาชีพ ตำแหน่งรอยโรค ประวัติการรักษาหูดมาก่อน ระยะเวลาที่เป็นหูดจึงเหมือนกันในสองกลุ่มทดลอง นอกจากนี้ตำแหน่งของรอยโรคหูดที่ทำการทดลองยังเป็นตำแหน่งคล้ายกัน ความหนาของรอยโรคหูดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในสองกลุ่มทดลอง จึงไม่เป็นอุปสรรคในการนำมาเปรียบเทียบกัน

ผู้ป่วยเข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 19 ราย ผลการทดลองพบว่าระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดผิวหนังกลุ่มที่ได้รับ ยา 5% อิมิกวิมอดคริม มีค่าการเปลี่ยนแปลง (ratio change from baseline) เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0.0265)

จากการเปรียบเทียบกลุ่มที่มี ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มสูงขึ้น และไม่เพิ่มขึ้นทั้งจากการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดคริมหรือยาหลอก ตามด้วยแผ่นปิดร่วมกับ 20% ซาลิไซลิก แอซิด พบว่า ทั้ง 2 กลุ่มปัจจัยด้านตำแหน่งรอยโรคหูด และประวัติการรักษาหูดมาก่อนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนปัจจัยด้านอายุ ระยะเวลาที่เป็นหูด และความหนาของหูดก่อนการไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยระดับความเชื่อมั่น 95% ทางสถิติด้วย

แต่ปัจจัยด้านเพศพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.004) ในกลุ่มผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม โดยกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังทายา เป็นเพศชายมากกว่าจำนวน 11 ราย เพศหญิง 1 ราย ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้นเป็นเพศหญิงมากกว่า จำนวน 6 ราย และเพศชาย 2 ราย

ปัจจัยด้านความแดงของหูดขณะตัดชิ้นเนื้อ หลังการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดคริมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.048) ด้วยระดับความเชื่อมั่น 95% ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นจะมีจำนวนรอยโรคหูดที่มีความแดงมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้น ส่วนในกลุ่มที่ได้รับยาหลอกพบว่าความแดงของหูดขณะตัดชิ้นเนื้อ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการเปรียบเทียบผลข้างเคียงในการใช้ยาทั้งสองกลุ่มโดยผู้ป่วยเป็นผู้ประเมิน พบว่าผลข้างเคียงของยาทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 โดยผลข้างเคียงที่ผู้ป่วยประเมินทั้งหมดอยู่ในระดับ 1 และ 2 เท่านั้น

การเปรียบเทียบผลข้างเคียงในการใช้ยาทั้งสองกลุ่มแพทย์เป็นผู้ประเมิน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างยาทั้งสองชนิดที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

บทที่ 8

การอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาวิจัยโดยมีกลุ่มควบคุมแบบสุ่ม ที่ศึกษากลไกการทำงานของยา 5% อิมิควิมอดคริม ในการรักษาหูดชนิด common warts โดยการเปรียบเทียบระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิควิมอดคริม เทียบกับยาหลอก เมื่อใช้ร่วมกับทา 20% ซาลิไซลิก แอซิด และแผ่นปิดในผู้ป่วยคนเดียวกัน ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาใดทำมาก่อน โดยใช้วิธี Real time polymerase chain reaction และนอกจากนี้ยังมีการประเมินผลข้างเคียงจากการใช้ยา โดยให้ผู้ป่วยเป็นผู้ประเมิน ใช้ 1-4 ordinal scale ประเมินผลข้างเคียงจากการใช้ยาโดยแพทย์เป็นผู้ประเมินจากการใช้ยาทั้งสองชนิด

มีหลายงานวิจัยที่ทำการศึกษาทดลองประสิทธิภาพของยา 5% อิมิควิมอดคริม ในการรักษาหูดชนิด common warts โดยใช้ยา 5% อิมิควิมอดคริม ร่วมกับยาละลายขุย (keratolytic agents) หรือวิธีการต่างๆ ที่เพิ่มการดูดซึมของยา ซึ่งพบว่าได้ผลค่อนข้างดี อัตราการหายสนิทมีตั้งแต่ 30-90% จากหลักฐานที่พบว่าผู้ป่วยที่เปลี่ยนอวัยวะ และ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV มีอุบัติการณ์การติดเชื้อ HPV และการเป็นหูดเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (CMI) ในการจัดการกับการติดเชื้อไวรัสที่มีในร่างกาย กลไกการทำงานของยา 5% อิมิควิมอดคริม ทำงานผ่านกลไกเดียวกับการหายของหูด (spontaneous clearance) ซึ่งพบว่ามีผลกระทบต่อการทำงานของ Th1 cytokines, IFN- α และ CD4+ Th cells เพิ่มขึ้นในรอยโรคหูดอวัยวะเพศ

การคำนวณขนาดตัวอย่างในงานวิจัยนี้ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาใดก่อนหน้านี้ทำการศึกษาค้นคว้าการวิจัยในครั้งนี้ และการทำ Pilot project ใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงใช้ขนาดตัวอย่าง 19 ราย โดยเป็นความเห็นของแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ (expert opinion) โดยกำหนดให้ค่า α (type 1 error) = 0.05, β (type 2 error) = 0.2 หรือ power = 80%

การศึกษานี้ทำในผู้ป่วยคนเดียวกัน โดยเลือกรอยโรคหูดบริเวณอวัยวะเพศเดียวกัน ที่มีขนาดและความหนาใกล้เคียงกัน โดยจะต้องอยู่ในตำแหน่งที่ห่างกันพอสมควรในร่างกาย และในการสุ่ม ว่ารอยโรคด้านใดใช้ยาชนิดใด ใช้วิธี randomized permuted block โดยให้พยาบาลเป็นผู้ทำการเปิดตารางและจ่ายยาแก่ผู้ป่วย เพื่อผู้วิจัยไม่ทราบว่าจะข้างใดได้ยาตัวใด จึงไม่เป็นอุปสรรคในการนำมาเปรียบเทียบกัน

ผลการศึกษาพบว่าระดับ mRNA ของ IFN α ที่วัดได้มีความแตกต่างกันมากในแต่ละบุคคล Standard deviation มีค่าสูง ซึ่งอาจสอดคล้องกับภาวะภูมิคุ้มกันในแต่ละบุคคล จึงนำค่า mRNA

สัมพัทธ์ของ IFN- α มาคำนวณเป็นค่า การเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN α ในรอยโรคหูดผิวหนัง ทั้ง 2 ตำแหน่ง เพื่อเป็นการปรับพื้นฐาน baseline values ให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน

เนื่องจากเป็นข้อมูลเชิงปริมาณ และมีการแจกแจงแบบไม่เป็นปกติ เปรียบเทียบค่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วน (ratio changes from baseline) ของระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดผิวหนังกลุ่มที่ได้รับ ยา 5% อิมิควิมอดคริม ว่ามีค่าการเปลี่ยนแปลงสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ โดยใช้สถิติทดสอบ คือ Wilcoxon signed ranks Test ซึ่งเป็น non-parametric test พบว่า ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0.0265) ในรอยโรคหูดผิวหนังกลุ่มที่ได้รับยา 5% อิมิควิมอดคริม เทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก และเมื่อทำการเปรียบเทียบระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดก่อนการรักษาเพื่อเป็น baseline ทั้ง 2 ตำแหน่ง พบว่าระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดก่อนการรักษาทั้ง 2 ตำแหน่ง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0.136) ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้เพื่อดูกลไกการทำงานของยา 5% อิมิควิมอดคริมในการรักษาหูดบริเวณอวัยวะเพศ และการรักษา actinic keratoses ทั้งในคนและสัตว์ทดลองที่พบว่า มีระดับ mRNA ของ IFN- α ซึ่งเป็นไซโตไคน์หลักในการทำงานของยานี้ และ proinflammatory cytokines อื่นๆเพิ่มขึ้นระหว่างการรักษา และนอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่ายา 5% อิมิควิมอดคริมนี้สามารถซึมผ่านชั้นหนังกำพร้า (keratinization) ในรอยโรคหูดบริเวณผิวหนังชนิด common warts ที่หนาตัวขึ้นมากกว่าในรอยโรคหูดบริเวณอวัยวะเพศ (external genital warts) ไปกระตุ้นให้เกิดผลทางเภสัชพลศาสตร์ของยาได้

จากการศึกษาสังเกตได้ว่ารอยโรคหูดที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α สูงขึ้นจะสัมพันธ์กับการมีอาการแสดงของการอักเสบ (inflammatory reaction) เช่น ความแดง การลอก และบวมที่ตำแหน่งของรอยโรคที่ได้รับยา 5% อิมิควิมอดคริม ร่วมกับ 20% salicylic acid ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบทำ subgroup analysis คุ้บวิจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ mRNA ของ IFN- α พบว่าในปัจจัยด้านความแดงของหูดขณะตัดชิ้นเนื้อหลังการรักษา กลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังการรักษาด้วยยา 5% อิมิควิมอดคริม จะมีจำนวนรอยโรคหูดที่มีความแดงมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.048) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยาหลอก ร่วมกับ 20% salicylic acid ไม่พบมีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ของ IFN- α ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่หลั่งมาในช่วงต้นของขบวนการอักเสบ อาจเกิดมาจากยาอิมิควิมอด ร่วมกับ 20% salicylic acid หรือการตัดชิ้นเนื้อ (shave biopsy) แต่อย่างไรก็ตามการตัดชิ้นเนื้อในครั้งที่สองหลังจากได้รับการรักษานั้นจะทำการตัดที่ 4 สัปดาห์หลังทายา ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ขบวนการซ่อมแซม (wound healing process) ส่วนใหญ่แผลสิ้นสุดลงแล้ว (2-3

สัปดาห์) ดังนั้นจึงเชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของระดับ mRNA ของ IFN- α เป็นผลของยาอิมิกวิมอดที่ได้รับ

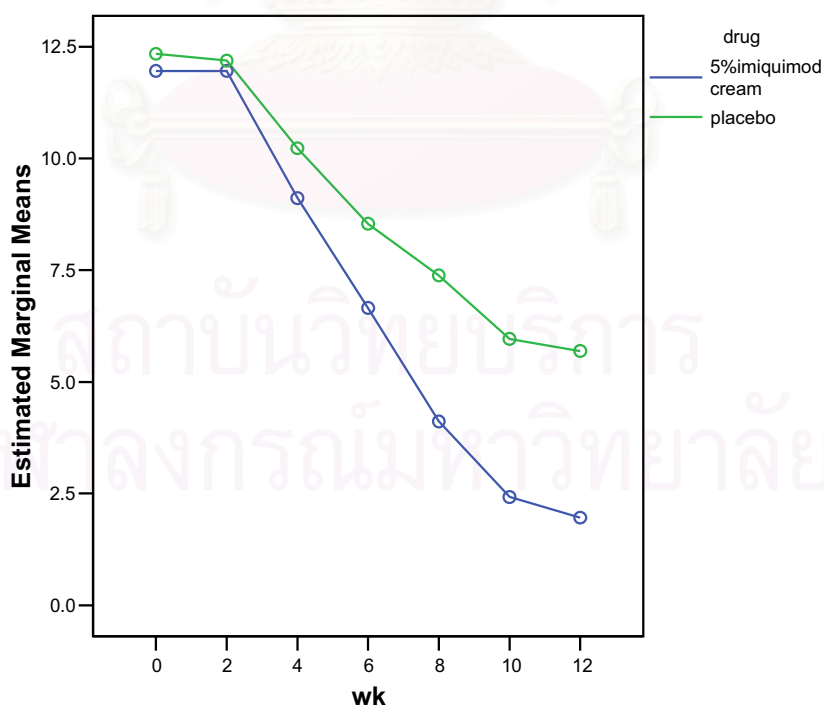
ปัจจัยด้านอายุ, ตำแหน่งรอยโรคหูด, ประวัติเคยรักษาหูด, ระยะเวลาที่เป็นหูด และความหนาของหูดก่อนการรักษาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูด ทั้งในกลุ่มที่ทายา 5% อิมิกวิมอดครีม และยาหลอก

แต่พบว่าปัจจัยด้านเพศ และประวัติเคยเป็นหูดมาก่อนของผู้ป่วย มีผลต่อระดับ mRNA ของ IFN- α โดยความแตกต่างด้านเพศ พบว่าผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังทายา เป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิง จำนวน 11 ราย และ 1 ราย ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้น เป็นเพศหญิงมากกว่า จำนวน 5 ราย และเพศชาย 2 ราย และในด้านประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน พบว่ากลุ่มที่ระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังทายาหลอกทั้งหมด 6 ราย ไม่เคยมีประวัติเป็นหูดมาก่อนเลย และในกลุ่มที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้นนั้น มีผู้ที่มีประวัติเคยเป็นหูด และไม่เคยเป็นหูดมาก่อนใกล้เคียงกัน คือ 7 ราย และ 6 รายตามลำดับ ซึ่งความแตกต่างในปัจจัยทั้งสองอย่างของผู้ป่วยนี้อาจเกิดเนื่องจากขนาดตัวอย่างในการศึกษาทดลองนี้ค่อนข้างน้อย เมื่อนำมาแบ่งกลุ่มผู้ป่วยที่มีผลต่อระดับ mRNA ของ IFN- α ของยาจึงเหลือขนาดตัวอย่างน้อย ถ้าต้องการทำการศึกษาในเรื่องนี้อาจต้องมีการสุ่มตัวอย่างโดยแบ่งตามเพศ หรือประวัติเคยเป็นหูดมาก่อนให้เท่ากัน หรือ กำหนดขนาดตัวอย่างใหม่ ข้อมูลจากการศึกษาย่อยลงไป (subgroup analysis) ในด้านนี้ครั้งนี้อาจใช้คูแวนโน้มปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาเท่านั้น

นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยจำนวน 2 รายมีการตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยาอิมิกวิมอดครีม หูดหายเกือบหมดดังที่กล่าวบรรยายในบทข้างต้น ผู้ป่วย 1 ใน 2 ราย ขึ้นเนื้อหูดมีขนาดเล็กลงหลังทายา เพียง 2 สัปดาห์จึงต้องทำการตัดชิ้นเนื้อก่อน 4 สัปดาห์ แต่พบว่าระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีม ลดลงจากเดิม เช่นในผู้ป่วยรายที่ 6 และ 12 ซึ่งอาจอธิบายได้จากภาวะภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคล และช่วงเวลาในการตัดชิ้นเนื้อ ถ้าตัดชิ้นเนื้อในช่วงเวลาที่หูดใกล้จะหายหมดแล้ว ระดับ mRNA ของ proinflammatory cytokines เช่น IFN- α อาจเริ่มลดต่ำลง แต่อาจตรวจพบระดับ anti-inflammatory cytokines และ differentiation keratinocyte markers เพิ่มขึ้น หรือพบมี viral load และ proliferation keratinocyte markers ลดลง ดังจะสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Isvan Arany และคณะในปี 1999 [33] ที่ศึกษาการใช้ยา 5% อิมิกวิมอดครีมในการรักษาหูดที่อวัยวะเพศ ซึ่งพบว่าที่ 6 สัปดาห์หลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีม รอยโรคหูดมีระดับ mRNA ของ cytokines เช่น IFN- α , IFN- γ และ 2'5' AS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบมีการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ของ CD4+ การลดลงของ viral load เช่น HPV DNA และ L1 mRNA อีกด้วย แต่ในรอยโรคเมื่อสิ้นสุดการศึกษา พบว่าระดับ mRNA ของ IFN- α , TNF และ IL-12 p-40

มีระดับลดลงต่ำกว่าเดิมที่ 6 สัปดาห์ และ mRNA ของ 2'5'AS (2'5' oligo adenylate synthetase) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของ interferon signaling pathway ลดลงต่ำกว่าก่อนรักษา และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับอีกผลการศึกษานึ่งของ Lysa B. และคณะ ปี 2004 [119] ศึกษาการแสดงออกของยีนในรอยโรค actinic keratosis ที่ได้รับการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดครีมเทียบกับ untreated AK และ uninvolved skin ผลพบว่าระดับ mRNA ของ IFN- α มีความแปรผันมากในแต่ละบุคคล มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของระดับ IFN- α หลังการรักษา 3 สัปดาห์ และระดับ IFN- α ที่สิ้นสุดการรักษา (ตัดชิ้นเนื้อ 2 สัปดาห์หลังทายาครบ 6 สัปดาห์) ลดลงต่ำกว่าเดิมที่ 3 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการศึกษานี้เลือกช่วงเวลาในการตัดชิ้นเนื้อหลังทายาที่ 4 สัปดาห์อ้างอิงจากในการศึกษาวิจัยของ พญ.อรพินธ์ และคณะในปี 2005 [12] ที่ศึกษาถึงประสิทธิภาพของยา 5% อิมิกวิมอดครีมในการรักษาหูดชนิด common warts พบว่าปริมาณหูดลดลงต่างจากรอยโรคหูดเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 4 สัปดาห์หลังจากรักษา (ดังแสดงในแผนภูมิเส้นที่ 2) ซึ่งคิดว่า ณ จุดเวลานี้จะเป็นเวลาที่มีการกระตุ้นซัยโตไคน์มากที่สุดแต่ทั้งนี้ผลของต่อภูมิคุ้มกันขึ้นกับหลายปัจจัย และมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล



แผนภูมิเส้นที่ 2 แสดงปริมาณหูด (μL) ในแต่ละสัปดาห์ที่ติดตามผลการรักษาผู้ป่วยเปรียบเทียบระหว่างยาทั้ง 2 ชนิด (คัดแปลงจาก Sukwong O. Chulalongkorn Derm Research 2005)

มีผู้ป่วยจำนวน 12 ใน 19 รายที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังทายา 5% อิมิควิมอดครีม ซึ่งในจำนวนนี้มีผู้ป่วย 6 รายที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดที่ได้รับการรักษา หลอกเพิ่มขึ้นด้วย อาจเป็นเพราะ

1. การหายเองของหูด (spontaneous regression) ซึ่งเกิดได้ประมาณ 20-30% ในหูดชนิด common warts ซึ่งพบว่าการหายเองของหูดสัมพันธ์กับการมีเม็ดเลือดขาว และมาโครฟาจเข้ามาทั้งในชั้นหนังกำพร้า และหนังแท้ ร่วมกับเซลล์ผิวหนัง (keratinocyte) มีการแสดงของการถูกทำลาย (cytopathic effects) ซึ่งเม็ดเลือดขาวส่วนใหญ่ที่เข้าจะเป็น T cell ชนิด CD4+
2. การตัดขึ้นเนื้อเป็นการกระตุ้นทำให้เกิดขบวนการอักเสบ (inflammatory process) หรือทำให้เซลล์แตก กระตุ้นให้ virus หรือ viral antigen ถูกปล่อยออกมาไปกระตุ้นภูมิคุ้มกัน
3. ผลมาจากการรักษาด้วยยา 5% อิมิควิมอดครีมกับหูดอีกตำแหน่ง ซึ่งการหายของหูดในตำแหน่งนี้ (Regression) ส่งผลทำให้เกิดการหายของหูดในตำแหน่งอื่นๆ ได้ จากการที่ viral antigens หรือ virus จากหูดที่ได้รับการรักษาแล้วจะไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ HPV ต่อไป
4. การทายา 20% salicylic acid ซึ่งเป็นสาร keratolytic agents และอาจมีผลให้เกิดขบวนการอักเสบ (inflammatory process) กระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังสร้าง proinflammatory cytokines

มีผู้ป่วยจำนวน 7 รายที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α ลดลงหลังทายา 5% อิมิควิมอดครีม โดยผู้ป่วยทั้ง 7 รายมีระดับ mRNA ของ IFN- α ลดลงหลังทายาทั้ง 2 ตำแหน่ง และในผู้ป่วย 4 ใน 7 รายนี้มีระดับ mRNA ของ IFN- α ลดลง ประกอบกับมีการตอบสนองทางคลินิกไม่ดีทั้ง 2 ตำแหน่ง ขนาดหูดลดลงไม่แตกต่างจากเดิม หรือ < 25% อาจเป็นเพราะสภาวะภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคลมีความแตกต่างกัน หรือ ยา 5% อิมิควิมอดครีมไม่สามารถซึมผ่านชั้นผิวหนังไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาทั้งในแง่ประสิทธิภาพของยาทางคลินิก และการศึกษาในแง่ภูมิคุ้มกันเช่นในการศึกษาวิจัยของ Tamura L. Wagner และคณะ [162] ที่ทำการศึกษากการผลการกระตุ้นต่อเม็ดเลือดขาว (PBMC) ของ Cynomolgus monkeys พบว่า 5 $\mu\text{g/ml}$ imiquimod กระตุ้นให้มี IL-1 β , IL-6, IL-8 และ IFN เพิ่มขึ้นใน supernatants ซึ่งวัดโดยวิธี ELISA ส่วน 1 $\mu\text{g/ml}$ imiquimod ทำให้มี IL-6 เพิ่มขึ้น 2 เท่าแต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของซัยโตไคน์ตัวอื่นๆ นอกจากนี้ พบว่า mRNA ของลิงที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 5 $\mu\text{g/ml}$ imiquimod 4 ชั่วโมง จะมีระดับ IFN- α , IL-6 และ MxA protein เพิ่มขึ้น แต่ 1 $\mu\text{g/ml}$ imiquimod ไม่พบทำให้ระดับ mRNA สำหรับ cytokines ต่างๆ เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของ specific mRNA โดย imiquimod จะสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของยา (dose-dependent) แต่ถ้าวัดขนาดของยาให้สูงขึ้นอีกถึงระดับ 10-20 $\mu\text{g/ml}$ จะให้ผลไม่แตกต่างกับผลของยา 5 $\mu\text{g/ml}$

เมื่อพิจารณาข้อมูลเกี่ยวกับคุณลักษณะประชากรซึ่งมีทั้งหมด 19 คน พบว่าผู้ป่วยที่ศึกษาเป็นเพศชาย 13 คน คิดเป็นร้อยละ 68.42 และเพศหญิง 6 คน คิดเป็นร้อยละ 31.58 ซึ่งพบว่าเพศชายมากกว่าเพศหญิง 2.17 เท่า ประชากรที่เข้าการศึกษาทดลองมีอายุตั้งแต่ 15 ปี ถึง 64 ปี กลุ่มอายุที่มากที่สุดคือ อายุ 15 ปี ถึง 24 ปี มี 10 คน คิดเป็นร้อยละ 52.63 อาจเนื่องจากหูดที่ไม่ใช่หูดที่พบบริเวณอวัยวะเพศมักพบในเด็กและผู้ใหญ่ตอนต้น กลุ่มอายุนี้อาชีพจึงเป็นนักเรียนนักศึกษามากที่สุด จำนวน 9 คน คิดเป็นร้อยละ 47.37

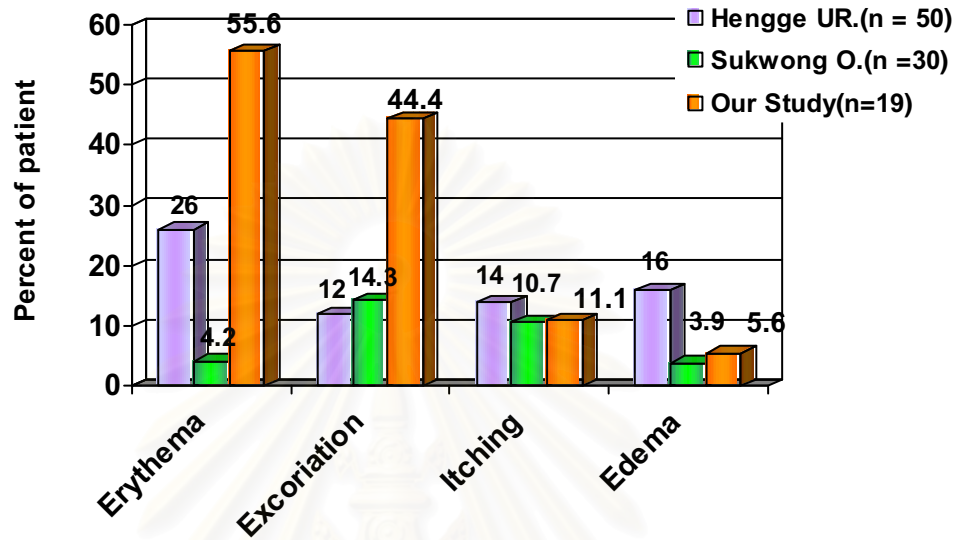
ในประชากรที่นำมาศึกษาพบว่าตำแหน่งรอยโรคหูดมากที่สุด คือ บริเวณนิ้วมือจำนวน 16 คน คิดเป็นร้อยละ 42.11 เนื่องจากหูดชนิด common warts มักพบบริเวณมือและนิ้วมือ ประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่เคยเป็นหูดมาก่อน จำนวน 12 คน คิดเป็นร้อยละ 63.16 ส่วนน้อยที่เคยเป็นหูดมาก่อน (นับรวมการเป็นหูดครั้งนี้อด้วย) จำนวน 7 คน คิดเป็นร้อยละ 36.84 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นหูดตั้งแต่ 2 ถึง 4 ครั้งและส่วนใหญ่หูดเก่าเคยผ่านการรักษามาก่อนด้วยวิธีการต่างๆ ประวัติเคยรักษารอยโรคหูดมาก่อน ผู้ป่วยกลุ่มที่เคยรักษาหูดครั้งนี้อีกก่อนมากกว่ากลุ่มที่ไม่เคยรักษา มีจำนวน 11 คน และ 8 คน คิดเป็นร้อยละ 57.89 และ 42.11 ตามลำดับ ระยะเวลาที่เป็นหูด มีตั้งแต่ 4 ถึง 60 เดือน ช่วงระยะเวลาที่เป็นหูดในการศึกษาทดลองนี้พบมากที่สุด คือ 1 เดือน ถึง 15 เดือน จำนวน 10 คน คิดเป็นร้อยละ 52.63 อาจเนื่องจากรอยโรคหูดมีลักษณะเป็นก้อนเนื้อผิวหนังระคายเคืองบริเวณผิวหนังของร่างกายมีการกระจายได้ อาจมีรอยโรคหลายตำแหน่ง ผู้ป่วยจึงอยากมาทำการรักษา แต่รอยโรคหูดโตช้าๆ ไม่มีอาการผู้ป่วยจึงไม่ได้รับมาทำการรักษามาก

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา โดยผู้ป่วยประเมิน พบว่า ผลข้างเคียงจากการใช้ยาระหว่างยา 5% อิมิกวิมอดครีมและยาหลอกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในสัปดาห์ที่ 2 และ 4 นั้น ซึ่งส่วนใหญ่ไม่มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา มีบางส่วนที่มีผลข้างเคียงในระดับผลเล็กน้อย (mild) คือ มีการระคายเคืองเล็กน้อยไม่รบกวนผู้ป่วยและไม่รบกวนต่อกิจวัตรประจำวัน

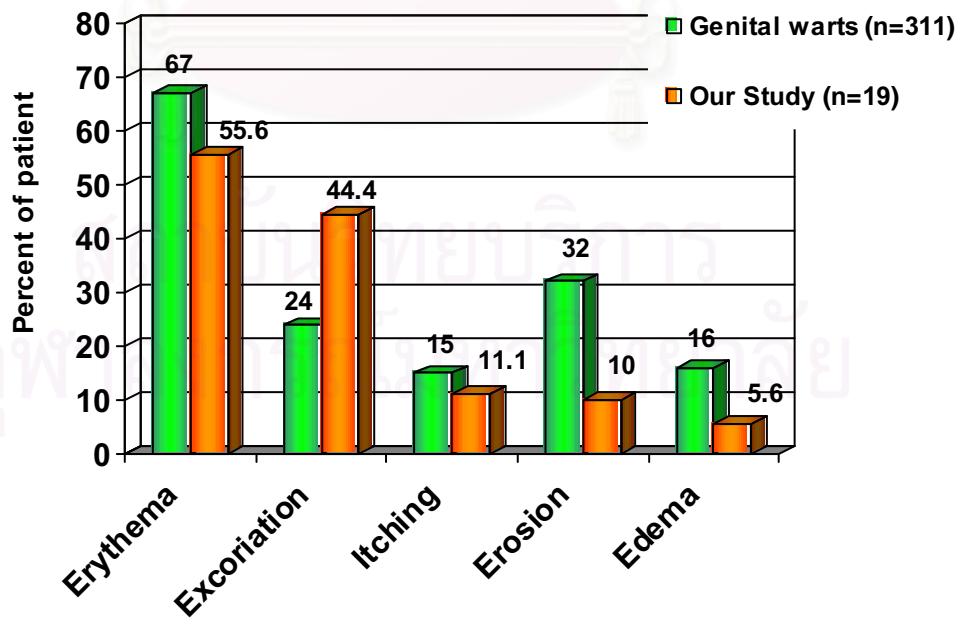
ผลข้างเคียงจากการใช้ยา โดยแพทย์เป็นผู้ประเมิน พบว่า ผลข้างเคียง ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการใช้ยา 5% อิมิกวิมอดครีมกับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยระดับความเชื่อมั่น 95% ในผู้ป่วยที่ใช้ยา 5% อิมิกวิมอดครีมพบรอยโรคบริเวณทวารในสัปดาห์ที่ 2 มีอาการคันร้อยละ 15, อาการแดงพบค่อนข้างมากร้อยละ 50, แสบร้อนร้อยละ 5, ลอกของผิวหนังเล็กน้อยร้อยละ 55 และบวมร้อยละ 5 ส่วนในสัปดาห์ที่ 4 พบมีอาการคันร้อยละ 11.1, แดงร้อยละ 55.6, ลอกของผิวหนังเล็กน้อยร้อยละ 44.4 และบวมร้อยละ 5.6

แม้ว่าการศึกษานี้พบผลข้างเคียงมาก ทั้งอาการแดง และการลอกเมื่อเทียบกับการศึกษาวิจัยทางคลินิกในหูดชนิด common warts ก่อนหน้านี้ ของ Hengge UR และคณะ (ค.ศ.2000) และ Sukwong O. และคณะ (ค.ศ. 2005) [12, 13] (ดังแสดงในแผนภูมิแท่งที่ 20) แต่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ยา 5% อิมิกวิมอดครีมกับหูดที่อวัยวะเพศ (anogenital warts) ของ Edward และคณะ (1998)

(ดังแสดงในแผนภูมิแท่งที่ 21) ซึ่งอาจเกิดจากการตัดฝานชั้นเนื้อทำให้เกิดแผล ร่วมกับการได้รับยา 20% salicylic acid ointment และการปิดด้วยแผ่นพลาสติกพร้อมด้วย



แผนภูมิแท่งที่ 20 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยา 5% อิมิดควิมอดครีมในการรักษาหูดผิวหนังชนิด common warts เทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้



แผนภูมิแท่งที่ 21 แสดงผลข้างเคียงจากการใช้ยา 5% อิมิดควิมอดครีมในการรักษา common warts เทียบกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในการรักษา genital warts ของ Edward และคณะ (1998)

แต่อย่างไรก็ตามผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นพบว่าอยู่ในระดับเล็กน้อย ไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรง ผู้ป่วยสามารถใช้ชีวิตต่อเนื่องได้อย่างปกติ ดังในการประเมินผลข้างเคียงจากการใช้ยาโดยผู้ป่วยพบว่า ส่วนใหญ่อยู่ในระดับ 1-2 คือ ไม่มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา ถึงมีผลข้างเคียง และมีการระคายเคืองเล็กน้อย ไม่รบกวนต่อกิจวัตรประจำวัน และนอกจากนี้ยังไม่พบว่ามีผู้ป่วยรายใดทนต่อผลข้างเคียง ไม่ได้จำเป็นต้องออกจากการทดลอง ดังนั้นจึงถือได้ว่าผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นนั้นมีเพียงเล็กน้อย และไม่มีผลใดๆ ที่ทำให้ผู้ป่วยรู้สึกทนยาไม่ได้

การศึกษาทดลองนี้ทำในผู้ป่วยที่มีสุขภาพแข็งแรง อายุมากกว่าหรือเท่ากับ 15 ปี ไม่ได้อยู่ในช่วงตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร ดังนั้นเมื่อนำผลไปใช้กับผู้ป่วยที่มีโรคอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น โรคที่มีผลกับภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ ผลการรักษาที่ได้อาจแตกต่างจากนี้ และเนื่องจากเป็นยาใหม่ยังไม่มีผลการศึกษาในเด็กเล็ก และหญิงมีครรภ์หรือให้นมบุตร จึงยังมีข้อจำกัดการใช้ยาในผู้ป่วยกลุ่มนี้

ในการศึกษานี้มีผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 19 คน ผู้ป่วยทุกคนอยู่ในการศึกษาจนสิ้นสุด ไม่มีผู้ใดออกจากการศึกษาก่อนสิ้นสุดการศึกษา

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงช่วยยืนยันผลของยา 5% อิมิกวิมอดครีมว ในกระตุ้นการสร้าง Interferon alpha ซึ่งเป็นไซโตไคน์หลักในการกำจัดเชื้อไวรัส ในรอยโรคหูดชนิด common warts
เรื่องค่าใช้จ่าย เมื่อใช้ยา 5% อิมิกวิมอดครีม ถ้ำทายา 5 ครั้งต่อสัปดาห์ ยา 1 ซอง ใช้ได้ประมาณ 1-2 สัปดาห์ ยา 1 ซอง ราคา 250 บาท ค่ารักษาอาจสูงกว่าวิธีอื่น เช่น การจี้ด้วยความเย็นรอยโรคไม่เกิน 5 ตำแหน่งราคา 50 บาทต่อครั้ง การจี้ด้วยไฟฟ้ารอยโรคไม่เกิน 5 ตำแหน่งราคา 100 บาทต่อครั้ง (ราคาจากหน่วยผิวหนัง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์) แต่เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการรักษาที่ผู้ป่วยไม่ต้องเจ็บตัว สะดวกสามารถใช้เองได้อย่างปลอดภัย ประหยัดค่าเดินทางมาโรงพยาบาลบ่อยๆ ไม่มีผลข้างเคียงรุนแรงจากการใช้ยา จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของผู้ป่วยในการรักษาหูดชนิด common warts

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 9

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในรอยโรคหูดที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม เทียบกับยาหลอกในการรักษาหูดชนิด common warts ร่วมกับ 20% ซาลิไซลิก แอซิดและแผ่นพลาสติกเฮอร์ปิด แบบสุ่มและมีกลุ่มควบคุม พบว่าระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0.0265) ในรอยโรคหูดผิวหนังกลุ่มที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม เทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก สรุปได้ว่ายา 5% อิมิกวิมอดคริม สามารถซึมผ่านชั้นหนังกำพร้าที่หนาของ common warts ไปมีผลกระตุ้นการสร้าง IFN- α เพิ่มขึ้นในรอยโรคหูด โดยทายาร่วมกับ 20% ซาลิไซลิก แอซิด และแผ่นพลาสติกเฮอร์ปิด

โดยสังเกตว่ารอยโรคหูดที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α สูงขึ้นจะสัมพันธ์กับการมีอาการแสดงของการอักเสบ (inflammatory reaction) เช่น ความแดง การลอก คัน ที่ตำแหน่งของรอยโรคที่ได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริม ร่วมกับ 20% salicylic acid ซึ่งทำการทดสอบปัจจัยด้านความแดงของหูดขณะตัดชิ้นเนื้อหลังการรักษา พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังทายา 5% อิมิกวิมอดคริม จะมีจำนวนรอยโรคหูดที่มีความแดงมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ไม่เพิ่มขึ้น แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.04) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยาหลอก ร่วมกับ 20% salicylic acid ไม่พบมีความแตกต่างกัน

มีผู้ป่วยบางรายที่หูดมีการตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดคริม แต่พบว่าระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหลังทายา 5% อิมิกวิมอดคริม ลดลงจากอาจอธิบายได้จากภาวะภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคล และช่วงเวลาในการตัดชิ้นเนื้อ ตัดในช่วงที่รอยโรคหูดใกล้จะหายหมดแล้ว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับ mRNA ของ IFN- α สัมพันธ์กับระยะเวลาที่ตัดชิ้นเนื้อ

มีผู้ป่วยบางรายที่ระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดที่ได้รับยาหลอกเพิ่มสูงขึ้นด้วย อาจเป็นเพราะการหายเองของหูด (spontaneous regression) ซึ่งเกิดได้ประมาณ 10-30% ในหูดชนิด common warts, การตัดชิ้นเนื้อเป็นการกระตุ้นทำให้เกิดขบวนการอักเสบ, การทายา 20% salicylic acid ซึ่งเป็นสาร keratolytic agents หรืออาจเป็นผลมาจากการรักษาด้วยยา 5% อิมิกวิมอดคริมกับหูดอีกตำแหน่ง ซึ่งการหายของหูดในตำแหน่งนี้ส่งผลทำให้เกิดการหายของหูดในตำแหน่งอื่นๆ ได้ จาก

การที่ viral antigens หรือ virus จากหูดที่ได้รับการรักษาแล้วจะ ไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ HPV ต่อไป

แนวโน้มนำปัจจัยด้านอายุ, ตำแหน่งรอยโรคหูด, ประวัติเคยเป็นหูดมาก่อน, ประวัติเคยรักษาหูด, ระยะเวลาที่เป็นหูด และความหนาของหูดก่อนการรักษาไม่มีผลต่อระดับ mRNA ของ IFN- α ในรอยโรคหูดทั้งในกลุ่มที่ทายา 5% อิมิกวิมอดคริมและยาหลอก แต่ปัจจัยด้านเพศของผู้ป่วยพบว่ามีผลต่อระดับ mRNA ของ IFN- α ในทั้ง 2 กลุ่มโดยพบว่าผู้ป่วยที่มีระดับ mRNA ของ IFN- α เพิ่มขึ้นหลังทายา เป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.004)

ผลข้างเคียงในการใช้ยาทั้งสองกลุ่มโดยผู้ป่วยเป็นผู้ประเมิน ผลข้างเคียงของยาไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลข้างเคียงที่ผู้ป่วยประเมินทั้งหมดอยู่ในระดับ 1 และ 2 เท่านั้น ผลข้างเคียงจากการใช้ยาโดยแพทย์เป็นผู้ประเมิน พบว่าผลข้างเคียงไม่มีความแตกต่างกัน ระหว่างการใช้ยา 5% อิมิกวิมอดคริมกับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 19 แสดงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยา 5% อิมิกวิมอดคริม ร่วมกับ 20% ซาลิไซลิกแอซิดและแผ่นพลาสติกปิดจำนวนเป็นร้อยละในสัปดาห์ที่ 2 และ 4

ผลข้างเคียง	จำนวนเป็นร้อยละในสัปดาห์ที่	
	2	4
แดง (erythema)	50	55.6
คัน (itching)	15	11.1
แสบร้อน (burning)	5	-
ลอกของผิวหนังเล็กน้อย (flaking)	55	44.4
บวม (edema)	5	5.6

แม้ว่าการศึกษานี้พบผลข้างเคียงมาก ทั้งอาการแดง และการลอก อาจเกิดจากการตัดผ่านชั้นเนื้อทำให้เกิดแผล แต่อย่างไรก็ตามผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นพบว่าอยู่ในระดับเล็กน้อย ไม่มีผลข้างเคียงที่รุนแรง ไม่รบกวนผู้ป่วย ไม่รบกวนต่อกิจวัตรประจำวัน ผู้ป่วยสามารถใช้ยาต่อเนื่องได้อย่างปกติ

จึงสรุปได้ว่าการศึกษาในครั้งนี้ช่วยยืนยันถึงประสิทธิภาพของยา 5% อิมิกวิมอดคริมในการรักษาหูดชนิด common warts โดยการกระตุ้นให้ร่างกายฆ่าไวรัสเองจาก cytokine ที่หลั่งออกมา โดยเฉพาะ Interferon alpha

ข้อเสนอแนะ

1. จากข้อมูลการศึกษาวิจัยนี้ ถือว่าเป็น Pilot Project พบว่าระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในรอยโรคหูดชนิด common warts ที่ได้รับยา 5% อิมิควิมอดครีมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value = 0.0265) เทียบกับยาหลอก โดยพบว่าค่าของระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในรอยโรคมีความแตกต่างกันของค่อนข้างมากในแต่ละบุคคล ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่า ถ้าศึกษาเพิ่มโดยการเก็บจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยมากขึ้น ผลที่ได้น่าจะเห็นความแตกต่างมากขึ้นกว่าเดิม
2. ในการตรวจ Real time PCR ในการศึกษาทดลองนี้ถ้าได้วัดดูระดับ mRNA ของ proinflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, cell surface markers, keratinocyte (proliferative and differentiated), cell cycle markers และ viral load (HPV DNA, L1 and E7 mRNA) รวมทั้งการตัดชิ้นเนื้อตรวจทาง histopathology โดยมีการประเมินเป็น series ของระยะเวลา ร่วมไปกับการผลการตอบสนองทางคลินิก จะทำให้สามารถอธิบายกลไกระดับโมเลกุลของยาได้ดีขึ้น
3. การศึกษาผลการกระตุ้นต่อ Tcell lymphocyte transformation โดยการทำให้ lymphoblast transformation test ต่อ specific type HPV antigen ในการรักษาผู้ป่วยโรคหูดชนิด common warts ด้วยยา 5% imiquimod cream อาจช่วยอธิบายกลไกการทำงานของยา 5% อิมิควิมอดครีม ว่ามีผลกระตุ้นซัยโตไคน์เฉพาะที่หรือส่งผลทางร่างกาย (systemic) และอธิบายการหาย (regression) และการเพิ่มขึ้นของระดับ mRNA ของ Interferon alpha ในรอยโรคหูดที่ได้รับยาหลอกได้
4. การรักษาหูดชนิด common warts ด้วยยา 5% อิมิควิมอดครีม ร่วมกับวิธีอื่น เช่นการทายา 20% salicylic acid, การใช้พลาสเตอร์ปิด (occlusion), การฝานออก หรือการแช่มือในน้ำ เป็นการทำให้ยาซึมผ่านได้ดีขึ้น ทำให้อัตราการหายของหูดมากขึ้น และยังส่งผลให้ยาออกฤทธิ์ กระตุ้นซัยโตไคน์ได้ดีขึ้นด้วย

รายการอ้างอิง

- [1] Irwin M Freedberg Wart. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine 2003:2119-30.
- [2] Richard Miller. Imiquimod stimulates innate and cell mediated immunity which controls virus infections and tumors. Int J of Dermatol 2002; 41(suppl.1): 3-6.
- [3] Daniel N Sauder. Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod. J Am Acad Dermatol 2000; Vol 43, No1, part 2: S6-11.
- [4] DH Dockrell. Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulator. J of Antimic chem 2001; 48: 751-755.
- [5] Yamamoto M. TIR domain-containing adaptors define specificity of TLR signaling. Mol immunol 2004; 40: 861-8.
- [6] Norval M, Jan D Bos. Human papilloma virus. Skin immune system. Cutaneous immunology and clinical immunodermatology (Third edition) 2004: 627-35.
- [7] Mark V. Dahl. Imiquimod: an immune response modifier. J Am Acad Dermatol.2000; 43(1): S1-5.
- [8] Ivanyi L, WL. Morison In vitro lymphocyte stimulation by wart antigen in man. Br J of dermatol 1976; 94: 523-527.
- [9] Stephen Tying. Imiquimod, an international update on therapeutic uses in dermatology. International Journal of Dermatology 2002; 41: 810-816.
- [10] Coleman N. Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryaite BK, Bryne M, Taylor-Robinson D, Stanley MA. Immunological events in regressing genital warts. Am J Clin Pathol 1994; 102:768-74.
- [11] Robert B. Skinner. Imiquimod. Dermatol clin 2003; 21: 291-300..
- [12] Sukwong O. A randomized, placebo-controlled, combination topical 5% imiquimod cream under occlusion with 20% salicylic acid for common warts. Chulalongkorn Dermatology Research 2005.
- [13] Hengge UR, Esser S, Schultewolter T, Behrendt C, Meyer T, Stockfleth E, et al. Self-administered topical 5% imiquimod for treatment of common warts and molluscum. Br. J dermatol 2000 Nov; 143(5): 1026-31.

- [14] Obalek S, Glinski W. Comparative studies on cell-mediated immunity in patients with different warts. Dermatologica 1980; 161(2): 73-83.
- [15] Chardonnet, Y. CMI to HPV. Clin Dermatol 1985; 3: 156-164.
- [16] Warwick L.Morison. In vitro assay of CMI to wart antigen. Br J of dematol 1974; 90: 531-4.
- [17] A.K.Y. Lee, Magdalena eisinger. CMI to human wart virus and wart-associated tissue antigens. Clin exp Immunol 1976; 26: 419-24.
- [18] Berman A. Involuting common warts. Clinical and histopathologic findings. J Am Acad Dermatol 1980; 3: 356-362.
- [19] Beutner KR, Spruance SL, Hougham AJ. Treatment of genital warts with an immune-response modifier (imiquimod). J Am Acad Dermatol 1998; 38: 230-9.
- [20] Grussendorf-Conen EI, Jacobs S, Rubben A, Dethlefsen U. Topical 5% imiquimod long-term treatment of cutaneous warts resistant to standard therapy modalities. Dermatology 2002; 205 (2): 139-45.
- [21] Grussendorf-Conen EI, Jacobs S. Efficacy of imiquimod 5% cream in the treatment of recalcitrant warts in children. Pediatr Dermatol 2002 May-Jun; 19(3): 263-6.
- [22] Housman TS, Jorizzo JL. Anecdotal reports of 3 cases illustrating a spectrum of resistant common warts treated with cryotherapy followed by topical imiquimod and salicylic acid. J Am Acad Dermatol 2002 Oct; 47(4 Suppl): S217-20.
- [23] Muzio G, Massone C, Rebora A. Treatment of non-genital warts with topical imiquimod 5% cream. Eur J dermatol 2002; Jul-Aug, 12(4): 347-9.
- [24] Hesterberg U, Bohlen LM, Brand CU. Imiquimod in the treatment of recalcitrant warts: a new therapy option? Schweiz Rundsch Med Prax 2003 Mar 19; 92(12): 535-9.
- [25] Harrison CJ, Miller RL, Bernstein DI. Posttherapy suppression of genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and enhancement of HSV-specific T-cell memory by imiquimod in guinea pigs. Antimicrob Agents Chemother 1994 Sep; 38(9): 2059-64.
- [26] Miller RL, Tomai MA, Harrison CJ, Bernstein DI. Immunomodulation as a treatment strategy for genital herpes: review of the evidence. Int Immunopharmacol 2002 Mar; 2(4): 443-51.
- [27] Abdel-Haq N, Chearskul P, Al-Tatari H, Asmar. New antiviral agents. Indian J Pediatr 2006 Apr; 73(4): 313-21.

- [28] Sidky YA, Borden EC, Weeks CE, Reiter MJ, Hatcher JF, Bryan GT. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. Cancer Res 1992 Jul 1; 52(13): 3528-33.
- [29] Borden EC, Sidky YA, Erturk E, Wierenga W, Bryan GT. Protection from carcinogen-induced murine bladder carcinoma by interferons and an oral interferon-inducing pyrimidinone, bropirimine. Cancer Res 1990 Feb 15; 50(4): 1071-4.
- [30] Testerman T L, Gester. Cytokine induction by immunomodulators imiquimod and S-27609. J. Leukocyte Biol 1995; 58: 365-72.
- [31] Imbertson L M. Cytokine induction of the immune response modifier imiquimod and S-28463. J Invest Dermatol 1998; 110: 734-9.
- [32] Tying SK, Arany. A randomized, controlled, molecular study of condyloma acuminata clearance during treatment with imiquimod. J. Infect. Dis 1998; 178: 551-55.
- [33] Arany I, Tying, S.K. Enhancement of innate and cellular immune response in patients with genital warts treated with topical imiquimod. Antiviral Research 1999; 43: 55-633.
- [34] Renata L.A. Bottrel. Immune response modifier, Imiquimod requires STAT-1 for induction of IFN, IRF-1 and IL-6. Antimic. Agents and Chem 1999; 43(3): 856-61.
- [35] Arany I. Correlation between pretreatment levels of IRF-1 and clinical responses to Imiquimod in genital warts. Antimic. Agents and Chem 2000; 44(7): 1869-73.
- [36] S. Jacobs E-I Grubendorf Conen. Molecular analysis of the effect of Topical Imiquimod Treatment of HPV2/27/57 induced common warts. Skin Pharmacol Physiol 2004; 17: 258-66.
- [37] Laurent R, Kienzler JL. Epidemiology of HPV infections. Clin Dermatol 1985; 3: 64.
- [38] Centers for Disease Control, Division of STD Prevention. Prevention of Genital HPV Infection and Sequelae: report of an external consultants' meeting. Department of Health and Human Services. Atlanta: Centers for disease Control and Prevention, 1999.
- [39] Ho. Gy, Bierman R, Beardsley L. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. N Engl J Med 1998; 338: 423-8.
- [40] Kokelj F. Study of the partners of women with human papillomavirus infection. Int J Dermatol 1993; 32: 661.

- [41] Barrasso R. High prevalence of papillomavirus associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. N Engl J Med 1987; 317: 916.
- [42] Kashima HK. Recurrent respiratory papillomatosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1996; 23: 699.
- [43] Shah KV. Risk factors for juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis. Pediatr Infect Dis J 1998; 17: 372.
- [44] Hildesheim A. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. J infect Dis 1994; 169: 235.
- [45] Bosch FX. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 796-802.
- [46] Carr J, Gyorfi T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission and pathogenesis. Clin Lab Med 2000; 20: 235-55.
- [47] Melnick JL. Papova virus group. Science 1962; 135:1128-30.
- [48] Rowson KEB, Mahy BWJ. Human papova (Wart) virus. Bacteriological reviews 1967; 31: 110-131.
- [49] De Villiers EM. Papillomavirus and HPV typing. Clin Dermatol 1997; 15: 199.
- [50] Sauders NA, Frazer IH. Simplifying the molecular mechanisms of human papillomavirus. Dermatol Clin 1998; 16:823-7, xv.
- [51] Mohr IJ, Clark R, Sun S, ANDroophy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein, to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. Science 1990; 250:1694-9.
- [52] McBride AA, Romanczuk H, Howley PM. The papillomavirus E2 regulatory proteins. J Biol Chem 1991; 226: 18411-4.
- [53] Shirasawa H, TomitaY, Sekiya S, Takamizawa H, Simizu B. Intergration and transcription of human papillomavirus type 16 and 18 sequences in cll lines derived from cervical carcinomas. J Gen Virol 1987; 68: 583-91
- [54] DoorbarJ, Gallimore PH. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. J Virol 1987; 61: 2793-9.
- [55] Gentles JC, Evans EGV. Foot infections in swimming baths. Br Med J 1973; 2: 260.

- [56] Tyring SK. Human papillomavirus infections: Epidemiology, Pathogenesis, and host immune response. J Am Acad Dermatol 2000; 43: s18-27.
- [57] Riou G, Favre M, Jeannel D, Bourhis J, Le Doussal V, Orth G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. Lancet 1990; 335: 1171-4.
- [58] Giroglou T. Human papillomaviruses infection requires heparin sulfate. J Virol 2001; 75: 1565.
- [59] Roden RB. A broad-spectrum microbicide with virucidal activity against sexually transmitted viruses. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 314.
- [60] Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 690.
- [61] Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and their replication. In fields virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001: 2197.
- [62] O'Brien PM, Campo MS. Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenicity? Trend Microbiol 2003; 11: 300.
- [63] Fausch SC, DA Silva DM, Rudolf MP, Kast WM. Human papillomavirus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. J Immunol 2002; 169: 3242.
- [64] Chardonnet Y, Viac J, Thiovet J. Langerhans cells in human warts. Br J Dermatol 1986; 226: 669.
- [65] Mota F, Rayment N, Chong S, Singer A, Chain B. The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus related premalignant cervical epithelium. Clin Exp Immunol 1999; 116:33.
- [66] Memar OM, Arany I, Tyring SK. Skin-associated lymphoid tissue in human immunodeficiency virus-I, human papillomavirus and herpes simplex virus infections. J Invest Dermatol 1995; 105: 99s.
- [67] Rogozinski TT, Jablonska S, Jarzabe-Chorelska M. Role of cell-mediated immunity in spontaneous regression of plane warts. Int J Dermatol 1988; 27: 322.
- [68] Offringa R, de Jong A, Toes REM, van der Burg SH, Melief CJM. Interplay between human papillomaviruses and dendritic cells. Curr Top Microbiol. Immunol 2003; 276: 215.

- [69] Kono T, Kondo S, Pastore S, Shivji GM, Tomai MA, McKenzie RC, Sauder DN. Effect of novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocytes cytokine gene expression. Lymphokine Cytokine Res 1994; 13: 71.
- [70] Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, et al. Frequent display of human papillomavirus type16 E6-specific memory T-helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. Cancer Res 2003; 63: 636.
- [71] Syrjnen K, Syrjens. Epidemiology of human papillomavirus infections and genital neoplasia. Scand J Infect Dis Suppl 1990; 60: 7-17.
- [72] Holly EA, Whittemore AS, Aston DA, et al. Anal cancer incidence: genital warts, anal fissure or fistula, hemorrhoids, and smoking. J Natl Cancer Inst 1989; 81: 1726-31.
- [73] Demeter LM, Stoler MH, Bennez W, et al. Penile intraepithelial neoplasia: Clinical presentation and an analysis of the physical state of human papillomavirus DNA. J Infect Dis 1993; 168: 38-46.
- [74] Von Krogh G, Lacey CJN, Gross G, et al. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. Sex transm Infect 2000; 76(3): 162-168.
- [75] Androphy EJ. X-linked inheritance of epidermodysplasia verruciformis: Genetic and virologic studies of a kindred. Arch Dermatol 1985; 121: 864.
- [76] Praetorius F. HPV-associated diseases of oral mucosa. Clin Dermatol 1997; 15: 399.
- [77] Schiffman MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. Cancer 1995; 76: 1888.
- [78] Lowy DR, Howley PM. Papillomaviruses. In Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wikins 2001: 2231.
- [79] Palefsky JM. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1(HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 226.
- [80] Frisch M. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. J Natl Cancer Inst 2000; 92:1500.

- [81] Penneys N. Diseases caused by viruses. Lever's Histopathology of the skin. 8th ed. Philadelphia: lippincott-Raven 1997: 569-89.
- [82] Ahmed I. Liquid nitrogen cryotherapy of common warts: Cryo-spray vs. cotton wool bud. Br J Dermatol 2001; 144: 1006.
- [83] Connolly M. Cryotherapy of viral warts: A sustained 10-s freeze is more effective than the traditional method. Br J Dermatol 2001; 145: 554.
- [84] Maw RD. Treatment of anogenital warts. In: Freedman D, editor. Dermatologic Clinics. Philadelphia: Saunders 1998; 16(4): 829-838.
- [85] Stone KM, Becker TM, Hadgu A, et al. Treatment of external genital warts: a randomized clinical trial comparing podophyllin, cryotherapy and electrodesiccation. Genitourin med 1990; 66: 16-9.
- [86] Sawchuk WS. Infectious papillomavirus in the vapor of warts treated with carbon dioxide laser or electrocoagulation: Detection and protection. J Am Acad Dermatol 1989; 21: 41.
- [87] Ferenczy A, Bergeron C, Richart RM. Human papillomavirus DNA in CO2 laser generated plume of smoke and its consequences to the surgeon. Obstet Gynecol 1990; 75: 114-8.
- [88] Bellina JH. The use of the carbon dioxide laser in the management of condyloma acuminatum with eight-year follow-up. Am J Obstet Gynecol 1983; 147: 375-8.
- [89] Beutner KR, Ferenczy A. Therapeutic approaches to genital warts. Am J med 1997; 102(5A): 28-37.
- [90] Wade TR, Ackerman AB. The effects of resin of podophyllin on condyloma acuminatum. Am J Dermatopathol 1984; 6: 109-22.
- [91] Miller R.A.W. Nail dystrophy following intralesional infections of bleomycin for a periungual wart. Arch Dermatol 1984; 120:963.
- [92] Reid R, Greenberg MD, Lorincz AT, et al. Superficial laser vaporization and adjunctive 5-fluorouracil therapy of human papillomavirus - associated vulvar disease. Obstet Gynecol 1990; 76: 439-48.
- [93] Krebs H. Treatment of extensive vulvar condylomata acuminata with topical 5-fluorouracil. South Med J 1990; 83: 761-4.

- [94] Swinehart JM, Sperling M, Phillips S, et al. Intralesional fluorouracil/epinephrine injectable gel for treatment of condylomata acuminata : a phase 3 clinical study. Arch Dermatol 1997; 133: 67-73.
- [95] Beutner KR, Wiley DJ, Douglas JM, et al. Genital warts and their treatment. Clin Infect Dis 1999; 28 (suppl 1): S37-56.
- [96] Haglund S. Interferon therapy in juvenile laryngeal papillomatosis. Arch Otolaryngol 1981; 107: 327.
- [97] Androphy EJ. Response of warts in epidermodysplasia verruciformis to treatment with systemic and intralesional alpha interferon. J Am Acad Dermatol 1984; 11: 197.
- [98] Reichman RC, Oakes D, Bonny W, et al. Treatment of condyloma acuminatum with three different interferon-alpha preparations administered parenterally: a double-blind, placebo-controlled trial. J Infect Dis 1990; 162: 1270-6.
- [99] Petersen CS, Weismann K. Quercetin and Kaempferol: an argument against the use of podophyllin? Genitourin Med 1995; 71: 92-3.
- [100] Snoech R, Van Ranst M, Audrie G, et al. Treatment of anogenital papillomavirus infections with an acyclic nucleoside phosphonate analogue. N Engl J med 1995; 333: 943-4.
- [101] Hengge UR, Tietze G. Successful treatment of recalcitrant condyloma with topical cidofovir. Sex transm Infect 2000; 76(2): 143.
- [102] Petersen CS, Weismann K. Quercetin and Kaempferol: an argument against the use of podophyllin? Genitourin Med 1995; 71: 92-3.
- [103] Matteelli A. Efficacy and tolerability of topical 1% cidofovir cream for the treatment of external anogenital warts in HIV-infected persons. Sex Transm Dis 2001; 28:343.
- [104] Snoeck R. Phase II double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of cidofovir topical gel for the treatment of patients with human papillomavirus infection. Clin Infect Dis 2001; 33:597.
- [105] Megyeri K, Au W-C, Rosztoczy I. Stimulation of interferon and cytokine gene expression by imiquimod and stimulation by sendai virus utilize similar signal transduction pathways. Mol Cell Biol 1995; 15: 2207-18.

- [106] Sidky UA, Borden EC, Weeks CE, Reiter MS, Hatcher JF, Bryan GT. Inhibition of murine tumor growth by an interferon-inducing imidazoquinolinamine. Cancer Res 1992; 52: 3528-33.
- [107] Miller R, Birmachu W, Geister J. Imiquimod: cytokine induction and antiviral activity. Int Antiviral News 1995; 3: 111-3.
- [108] Testerman TL, Gerster JF, Imbertson LM. Cytokine induction by the immunomodulators imiquimod and s-27609. J Leukoc Biol 1995; 58: 365-72.
- [109] Bernstein Di, Harrison CJ. Effects of the immunomodulating agent R837 on acute and latent herpes simplex virus type 2 infections. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1511-15.
- [110] Kende M, Lupton HW, Canonico PG. Treatment of experimental viral infections with immunomodulators. Adv Biosci 1989; 68: 51-63.
- [111] Imbertson LM, Beaurline JM, Couture AM, Gibson SJ, Smith RM, Miller RL, et al. Cytokine induction in hairless mouse and rat skin after topical application of the immune response modifiers imiquimod and S-28463. J Invest Dermatol 1998; 110: 734-9.
- [112] Reichman RC, Oakes K, Bonnez W. Treatment of condyloma acuminatum with three different interferons administered intralesionally: a double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 1988; 108: 675-9.
- [113] Kono T, Kondo S, Pastore S, Shivji GM, Tomai MA, McKenzie RC, et al. Effects of a novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocyte cytokine gene expression. Lymphokine Cytokine Res 1994; 13: 71-6.
- [114] Wagner TL, Ahonen CL, Couture AM, Gibson SJ, Miller RL, Smith RM, et al. Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune modifiers R-848 and imiquimod. Cell Immunol 1999; 191:10-9.
- [115] Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R β 2 subunit expression in developing T helper (TH1) and TH2 cells. J Exp Med 1997; 185: 817-24.
- [116] Suzuki H, Wang B, Amerio P, Toto P, Shivji GM, Miller RL, et al. Imiquimod, a novel topical immune response modifier, induces migration of Langerhans' cells. J Invest Dermatol 2000; 114: 135-41.

- [117] Burns R, Ferbel B, Tomai MA, Miller RL, Gaspani AA. The imidazoquinolones, imiquimod (R-837) and R-842 both induce functional but not phenotypic maturation of human epidermal Langerhans' cells in vitro. Clin Immunol 2000; 94:13-23.
- [118] Reichman RC, Oakes K, Bonneze W. Treatment of condyloma acuminatum with three different interferons administered intralesionally: a double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 1988; 108: 675-9.
- [119] Lysa B, Tartler U, Wolf R, Arenberger P, Benninghoff B, Ruzicka T, et al. Gene expression in actinic keratoses: pharmacological modulation by imiquimod. Br J of dermatol 2004; 151: 1150-59.
- [120] Urosevic M, Maire T, Benninghoff B, Slade H, Burg G, Dummer R. Mechanisms underlying imiquimod-induced regression of basal cell carcinoma in vivo. Arch Dermatol 2003; 139: 1325-1332.
- [121] Data on file, (NDA Application Summary), 3M Pharmaceuticals.
- [122] Gollnick H, Barrasso R, Benninghoff B. Safety and efficacy of imiquimod 5% cream in uncircumscribed male with foreskin-associated genital warts. 8th EADV congress, Amsterdam, the Netherlands. September 1999.
- [123] Beutner KR, Wiley Dj. Recurrent external genital warts: a literature review. Papillomavirus report 1997; 8: 69-74.
- [124] Liota E, Smith K, Buckley R. Imiquimod therapy for molluscum contagiosum. J cut Med Surg. 2000; 4: 76-81.
- [125] Barba AR, Kapoor S, Berman B. An open label study of topical imiquimod 5% cream in the treatment of molluscum contagiosum in children. Dermatol online J 2001; 7: 20.
- [126] Full Prescribing Information for Aldara™ (imiquimod), March 1997.
- [127] Kary Mullis tells how the idea for PCR came to him out of the blue in "The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction." Scientific American 1990; April: 56-65.
- [128] Kwok S., Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339: 237-238.
- [129] Clementi M, Menzop S, Bagnarelli P, Manzin A, Valenza A and Varaldo PE. Quantitative PCR and RT-PCR in virology. PCR Methods Appl 1993; 2: 191-6.
- [130] Tompkins LS. The use of molecular methods in infectious diseases. N Engl J Med 1992; 327: 1290-7.

- [131] Mezza C, Mantero G and Primi D. DNA enzymic immunoassay: A rapid and convenient colorimetric method for diagnosis of cystic fibrosis. Mol Cell Probes 1991; 5: 459-66.
- [132] Zhang XY and Ehrlich M. Detection and quantification of low numbers of chromosome containing bcl-2 oncogene translocation using semi-nested PCR. Biotechniques 1994; 16: 502-7.
- [133] Arnheim N, White T and Rainey WE. Application of PCR: organismal and population biology. BioScience 1990; 40: 174-82.
- [134] Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K et al. Natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. N Engl J Med 1992; 327: 1899-905.
- [135] Boerman RH, Peters ACB, Arnoldus EPJ, Raap AK, van Loon AM, Bloem B RF and van der Ploeg M. Polymerase chain reaction detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid. In Diagnosis of Human Viruses by Polymerase Chain Reaction Technology. edited by Becker Y and Darai G, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1992; pp. 19-133.
- [136] Reischl U and Kochanowski B. Quantitative PCR. In Methods in Molecular Medicine: Quantitative PCR Protocols. edited by Kochanowski B and Reischl U. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999; pp. 3-30.
- [137] Mullis KB, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Method Enzymol 1987; 155: 335-50.
- [138] Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific Am 1990; 262: 56-65.
- [139] Saiki K. Optimization of polymerase chain reaction. In : Earich HA, Gibbs R, Kazazian HH. Editors Polymerase chain reaction. Current communication in molecular biology. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press 1989: 25-30.
- [140] Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by thermophilus DNA polymerase. Biochemistry 1991; 30: 7661-6.
- [141] Erlich AA, Gelfand DH, Saiki RK. Specific DNA amplification. Nature 1988; 331: 461-2.

- [142] Svanvik N, Westman G, Wang D and Kubista M. Light-up probes: Thiazole orangeconjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogenous solution. Anal Biochem 2000; 281: 261-35.
- [143] Longo MC, Berninger MS, Hartly JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry over contamination in polymerase chain reactions. Gene 1990; 93:125-8.
- [144] Thornton CG, J.L. Hartley and A. Rashtakian. Utilizing uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR: Characterization of residual activity following thermal cycling. BioTechniques 13 (1992): 80-82.
- [145] Sarkar G and S.S. Sommer. Shedding light on PCR Contamination. Nature 1990; 343: 27.
- [146] Fronthingham R, R.B. Blichinton, D.H. Lee, R.C. Greene and K.H. Wilson, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH and Buchardt O. Sequence selective recognition by strand displacement with a thymine-substituted polyamid. Science 1991; 254: 1497-500.
- [147] Reischl U and Kochanowski B. Quantitative PCR. In Methods in Molecular Medicine: Quantitative PCR Protocols. edited by Kochannowski B and Reischl U. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999, pp. 3-30.
- [148] Svanvik N, Westman G, Wang D and Kubista. Light-up probes: Thiazole orangeconjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogenous solution. Anal Biochem 2000; 281: 261-35.
- [149] Nielsen PE, Egholm M, Berg RH and Buchardt O. Sequence selective recognition by strand displacement with a thymine-substituted polyamid. Science 1991; 254: 1497-500.
- [150] Egholm M, buchartd O, Christensen L et al. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. Nature 1993; 365: 566-8.
- [151] Iyer M, Norton JC and Corey DR. Accelerated hybridization of oligonucleotides to duplex DNA. J Biol Chem 1995; 270: 14712-7.
- [152] Isacsson J, Cao H, Ohlsson L et al. Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. Mol Cell Probes 2000; 14: 321-8.
- [153] Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339: 237-8.

- [154] Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS and Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY) 1992; 10: 413-7.
- [155] Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA and Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 1997; 22:130-8.
- [156] Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA and Balis UJ. The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 1997; 22: 176-81.
- [157] Ririe KM, Rasmussen RP and Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem 1997; 245: 154-60.
- [158] Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnick PC and Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 85: 8790-4.
- [159] Bernard PS and Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. Clin Chem 2000; 46: 147-8
- [160] Lee LG, Connell CR and Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res 1993; 21: 3761-6.
- [161] Tyagi S and Kramer FR. Molecular Beacon: Probes that fluorescence upon hybridization. Nature Biotechnology 1996; 14: 303-8.
- [162] Tamura LW, Vicki LH, Gary LC, Paula EM, Sheila JG, Linda MI. Induction of cytokines in cynomolgus monkeys by the immune response modifiers, imiquimod, S-27609 and S-28463. Cytokine 1997; 9(11): 837-45.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

แบบบันทึกข้อมูล

เรื่อง: การศึกษาระดับ เอ็มอาร์เอ็นเอ ของอินเตอร์เฟอรอน อัลฟาอีในรอยโรคที่ไช้ยา 5% อิมิกวิมอด
ครีม ในการรักษาหูดผิวหนัง โดยมีกลุ่มควบคุมแบบสุ่ม

	ID.....	1 2
	Date.....	
I. ข้อมูลส่วนตัว		เฉพาะเจ้าหน้าที่
1. อายุ ปี		... AGE
		3 4
2. เพศ1. ชาย2. หญิง		.. SEX
		5
3. อาชีพ		
..... 1. นักศึกษา		
..... 2. รับราชการ		
..... 3. แม่บ้าน		.. OCC
..... 4. รับจ้างทั่วไป		6
..... 5. ธุรกิจส่วนตัว		
..... 6. อื่นๆ ระบุ.....		
4. เป็นหูดมานานเดือน		... TIME
		7 8 9
5. หูดที่บริเวณที่จะทำการวิจัย		
1.....		.. THICK 1
ความหนา.....mm.		10
2.....		.. THICK 2
ความหนา.....mm.		11

6. เคยเป็นหูดมาก่อนหรือไม่	
..... 0. ไม่เคย (กรุณาข้ามไปตอบข้อ 9)	.. OLD WART
..... 1. เคย	12
ถ้าเคยเป็นหูดมาแล้ว.....ครั้ง (รวมครั้งนี้)	... RECUR TIME
	13 14
7. หูดเก่าเคยผ่านการรักษามาก่อนหรือไม่	
.....0. ไม่เคย (กรุณาข้ามไปตอบข้อ 9)	.. TREAT OLD
.....1. เคย	15
8. หูดเก่าเคยรักษาโดยใช้วิธีการใดบ้าง	
..... 1. CRYOSURGERY	.. M1
	16
..... 2. ELECTROCAUTERY	.. M2
	17
..... 3. LASER	.. M3
	18
..... 4. SALICYLIC ACID	.. M4
	19
..... 5. SALICYLIC ACID + LACTIC ACID	.. M5
	20
..... 6. TCA	.. M6
	21
..... 7. อื่นๆ ระบุ.....	.. M7
	22
9. หูดครั้งนี้เคยผ่านการรักษามาก่อนหรือไม่	
.....0. ไม่เคย	
.....1. เคย (กรุณาตอบข้อ 10)	.. TREAT NEW
.....1. เคยรักษาหูดนาน ≥ 4 สัปดาห์	23
.....2. เคยรักษาหูดนาน < 4 สัปดาห์	

10. หูดครั้งนี้เคยรักษาโดยใช้วิธีการใดบ้าง

..... 1. CRYOSURGERY	.. M1
	24
..... 2. ELECTROCAUTERY	.. M2
	25
..... 3. LASER	.. M3
	26
..... 4. SALICYLIC ACID	.. M4
	27
..... 5. SALICYLIC ACID + LACTIC ACID	.. M5
	28
..... 6. TCA	.. M6
	29
..... 7. อื่นๆ ระบุ.....	.. M7
	30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

III ข้อมูลของการวิจัย

1. โรคประจำตัว

.....0. ไม่มี

.....1. มี

.....1. โรคเบาหวาน

.....2. โรคไต

.....3. โรค AIDS

.....4. โรคหัวใจ

.....5. โรคความดันโลหิตสูง

.....6. อื่น ๆ ระบุ.....

.. UNDERLY DIS

31

2. การเจ็บป่วยอื่นๆ ในปัจจุบัน

.....0. ไม่มี

.....1. มี

.....1. โรคเมเร็งทุกชนิด

.....2. วัณโรคที่ยังรักษาไม่หาย

.....3. มีภาวะติดเชื้อไวรัสอื่นๆ (เช่น หัด)

.....4. อื่น ๆ ระบุ.....

.. CONCOMIT DIS

32

3. ใช้อย่าอะไรบ้างในขณะนี้

.....0. ไม่ใช่

.....1. ใช่

.....1. Oral corticosteroid > 30 mg/day ต่อเนื่องกัน

มากกว่า 3 สัปดาห์ ในระยะเวลาภายใน 1ปี

.....2. Oral corticosteroid ในขนาดอื่นๆ

.....3. Inhale corticosteroid > 1,000 mg/day

ภายใน 2 สัปดาห์ก่อนเข้ารับการรักษา

.....4. Inhale corticosteroid ในขนาดอื่นๆ

.....5. Topical corticosteroid บริเวณที่จะทำการศึกษา

ภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์

.....6. Topical corticosteroid ในขนาดอื่นๆ

.....7. Chemotherapy และ/หรือ Radiation

.....8. อื่น ๆ ระบุ.....

.. DRUG

33

3. การตั้งครรภ์
-0. ไม่ได้ตั้งครรภ์ .. PREG
-1. กำลังตั้งครรภ์ 34
4. การให้นมบุตร
-0. อยู่ช่วงให้นมบุตร .. LAC
-1. ไม่ได้อยู่ช่วงให้นมบุตร 35
5. มีโรคผิวหนังอื่นในบริเวณหูที่จะทำการศึกษาหรือไม่
-0. ไม่มี .. SKIN
-1. มี ระบุ..... 36
6. ประวัติการแพ้ยา
-0. ไม่มี .. ALLERGY
-1. มี ระบุ ชื่อยา..... 37
- อาการที่แพ้.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

III แบบประเมินนัดติดตามผู้ป่วย

Part I ครั้งที่ 1

หูดที่แรก

ตำแหน่ง.....

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมิน)

-1. ไม่มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา (none)
2. มีผลเล็กน้อย (mild) มีการระคายเคืองเล็กน้อยไม่รบกวนผู้ป่วย และกิจวัตรประจำวัน
3. มีผลปานกลาง (moderate) ค่อนข้างรบกวนผู้ป่วย แต่ยังไม่รบกวนกิจวัตรประจำวัน
4. มีผลรุนแรง(severe) ผลข้างเคียงของยารบกวนต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (แพทย์ประเมิน)

มี ไม่มี Visit 2

- 1.คัน (itching)
 2.แดง (erythema)
 3.ลอก (flaking or excoriation)
 4.แสบร้อน (burning)
 5.ตุ่มน้ำใส (vesicle)
 6.แผลถลอกตื้น (erosion)
 7.แผลลึกถึงชั้นหนังแท้ (ulcer)
 8.บวม (edema)
 9.อื่น ๆ ระบุ.....

Part I ครั้งที่ 1**ชุดที่สอง**

ตำแหน่ง.....

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมน)

-1. ไม่มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา (none)
-2. มีผลเล็กน้อย (mild) มีการระคายเคืองเล็กน้อยไม่รบกวนผู้ป่วย และกิจวัตรประจำวัน
-3. มีผลปานกลาง (moderate) ค่อนข้างรบกวนผู้ป่วย แต่ยังไม่รบกวนกิจวัตรประจำวัน
-4. มีผลรุนแรง(severe) ผลข้างเคียงของยารบกวนต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (แพทย์ประเมน)

มี ไม่มี Visit 2

- 1.คัน (itching)
- 2.แดง (erythema)
- 3.ลอก (flaking or excoriation)
- 4.แสบร้อน (burning)
- 5.ตุ่มน้ำใส (vesicle)
- 6.แผลถลอกตื้น (erosion)
- 7.แผลลึกถึงชั้นหนังแท้ (ulcer)
- 8.บวม (edema)
- 9.อื่น ๆ ระบุ.....

Part I ครั้งที่ 2**ชุดที่แรก**

ตำแหน่ง.....

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมน)

-1. ไม่มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา (none)
-2. มีผลเล็กน้อย (mild) มีการระคายเคืองเล็กน้อยไม่รบกวนผู้ป่วย และกิจวัตรประจำวัน
-3. มีผลปานกลาง (moderate) ค่อนข้างรบกวนผู้ป่วย แต่ยังไม่รบกวนกิจวัตรประจำวัน
-4. มีผลรุนแรง(severe) ผลข้างเคียงของยารบกวนต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (แพทย์ประเมน)

มี ไม่มี Visit 2

- 1.คัน (itching)
- 2.แดง (erythema)
- 3.ลอก (flaking or excoriation)
- 4.แสบร้อน (burning)
- 5.ตุ่มน้ำใส (vesicle)
- 6.แผลถลอกตื้น (erosion)
- 7.แผลลึกถึงชั้นหนังแท้ (ulcer)
- 8.บวม (edema)
- 9.อื่น ๆ ระบุ.....

Part I ครั้งที่ 2**ชุดที่สอง**

ตำแหน่ง.....

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (ผู้ป่วยประเมน)

-1. ไม่มีผลข้างเคียงจากการใช้ยา (none)
-2. มีผลเล็กน้อย (mild) มีการระคายเคืองเล็กน้อยไม่รบกวนผู้ป่วย และกิจวัตรประจำวัน
-3. มีผลปานกลาง (moderate) ค่อนข้างรบกวนผู้ป่วย แต่ยังไม่รบกวนกิจวัตรประจำวัน
-4. มีผลรุนแรง(severe) ผลข้างเคียงของยารบกวนต่อกิจวัตรประจำวันของผู้ป่วย

ผลข้างเคียงจากการใช้ยา (แพทย์ประเมน)

มี ไม่มี Visit 2

- 1.คัน (itching)
- 2.แดง (erythema)
- 3.ลอก (flaking or excoriation)
- 4.แสบร้อน (burning)
- 5.ตุ่มน้ำใส (vesicle)
- 6.แผลถลอกตื้น (erosion)
- 7.แผลลึกถึงชั้นหนังแท้ (ulcer)
- 8.บวม (edema)
- 9.อื่น ๆ ระบุ.....

Part II ผลทางห้องปฏิบัติการ Real-time PCR

(Relative gene expression comparisons: fold above background level)

mRNA for IFN- α	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
หูดตำแหน่งที่ 1		
หูดตำแหน่งที่ 2		

mRNA for 18S	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
หูดตำแหน่งที่ 1		
หูดตำแหน่งที่ 2		

MRNA for IFN- α /18S	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
หูดตำแหน่งที่ 1		
หูดตำแหน่งที่ 2		

Ratio change from baseline	
หูดตำแหน่งที่ 1	
หูดตำแหน่งที่ 2	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

แบบฟอร์มใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

บันทึกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าอายุ.....ปี ที่อยู่

..... มีความประสงค์ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย เรื่องการศึกษาเปรียบเทียบผลการกระตุ้นการแสดงออกของอินเตอร์เฟอรอนอิน ในรอยโรคที่ไชยา 5% อิมิกวิมอดคริม ในการรักษาหูดผิวหนัง โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบผลของ ยา 5% อิมิกวิมอดคริมต่อการกระตุ้นภาวะภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสหูด โดยวัดค่าความต่างระดับการแสดงออกของอินเตอร์เฟอรอนอิน ในรอยโรคหูดผิวหนัง 2 ตำแหน่ง และเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวในห้องทดลอง ก่อนและหลังทายา 5% อิมิกวิมอดคริม โดยข้าพเจ้าเข้าใจรายละเอียดการศึกษาวิจัยดังกล่าวรวมถึงการปฏิบัติตนระหว่างการวิจัยดีโดยตลอดแล้ว

ในระหว่างที่ข้าพเจ้าเข้าร่วมการศึกษาวิจัยนี้ ข้าพเจ้ามีสิทธิจะถอนตัวจากการศึกษาเมื่อใดก็ได้ โดยควรแจ้งแก่แพทย์ผู้ดูแลก่อน การถอนตัวนั้นจะไม่ก่อให้เกิดอคติในการได้รับการดูแลรักษาพยาบาลต่อไป ยังคงได้รับการดูแลตามมาตรฐานที่เหมาะสม และข้อมูลทั้งหลายจะถูกเก็บเป็นความลับ และได้รับประโยชน์จากการศึกษาคือ ท่านที่ได้เข้าร่วมการศึกษาก็จะได้รับยา 5% อิมิกวิมอดคริมในการรักษาหูดในระหว่างการศึกษาวิจัยโดยไม่เสียค่าใช้จ่ายใดๆ ตลอดช่วงเวลาที่ทำการศึกษา และท่านจะยังคงได้รับการดูแลรักษาอย่างต่อเนื่องแม้ว่าการศึกษาจะสิ้นสุดแล้ว โดยข้าพเจ้าไม่มีสิทธิได้รับค่าตอบแทน และไม่มีสิทธิเรียกร้องทรัพย์สิน หรือประโยชน์อื่นใดทั้งสิ้น

ข้าพเจ้าตกลงใจเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยดังกล่าวข้างต้น โดยความสมัครใจของข้าพเจ้าเอง ไม่มีผู้ใดบังคับ ชูเชิญ หลอกลวง หรือให้สัญญาแต่ประการใด

ข้าพเจ้าได้อ่านและทำความเข้าใจข้อความทั้งหมดของใบยินยอมนี้ครบถ้วนดีแล้ว จึงลงลายมือชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ (ผู้ยินยอม)

(.....)

ลงชื่อ..... (แพทย์ผู้วิจัย)

(.....)

ลงชื่อ (พยาน)

(.....)

ลงชื่อ (พยาน)

(.....)

ลงชื่อ (ผู้ปกครอง)

(.....)

(เฉพาะกรณีผู้ป่วยอายุต่ำกว่า 20 ปี)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำแนะนำผู้เข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย

ชื่อโครงการ : การศึกษาผลการกระตุ้นการแสดงออกของอินเตอร์เฟอรอนอิน ในรอยโรคที่ใช้ ยา 5% อิมิกวิมอดคริม ในการรักษาหูดผิวหนัง

วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย : เพื่อเปรียบเทียบผลของ ยา 5% อิมิกวิมอดคริมต่อการกระตุ้นภาวะภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสหูด โดยวัดค่าความต่างระดับการแสดงออกของอินเตอร์เฟอรอนอิน ในรอยโรคหูดผิวหนังทั้ง 2 ตำแหน่ง และเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวในห้องทดลอง ก่อนและหลังทายา 5% อิมิกวิมอดคริม 4 สัปดาห์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการศึกษาวิจัย : นำความรู้ที่ได้รับจากการศึกษาวิจัย ไปพัฒนา และประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคหูดที่ผิวหนัง ให้มีประสิทธิภาพหรือได้ผลดียิ่งขึ้นไป

รายละเอียดของการศึกษาวิจัยที่ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยควรทราบ :

แพทย์ซักถาม ตรวจร่างกาย ทำการถ่ายภาพหูด วัดปริมาตรหูด และแนะนำรายละเอียดเกี่ยวกับการรักษา การศึกษาวิจัย และการปฏิบัติตน

ขั้นตอนการใช้ยา :

1. ก่อนใช้ยาให้ผู้ป่วยล้างและเช็ดรอยโรคหูดให้แห้ง
2. ในตอนเช้าของวันจันทร์ถึงวันศุกร์ ทา 20% ซาลิไซลิก แอซิด กับหูดที่ทำการศึกษาทั้งหมด
3. ในตอนกลางคืนของวันจันทร์ถึงวันศุกร์ ทายาชนิดที่หนึ่งกับหูดตำแหน่งแรกที่ทำสุ่มไว้ และทายาชนิดที่สอง กับหูดอีกตำแหน่งหนึ่ง
4. ห้ามสลับชองยากัน ใช้ช่องเดิมกับที่เดิมตลอด
5. วิธีทายาให้ใช้ยาปริมาณตามขนาดของหูด และถูยาจนยาซึมลงไปไม่เห็นตัวยา
6. ใช้แผ่นพลาสติกที่แจกให้ปิดบริเวณที่ทายาทิ้งไว้ทั้งคืน ไม่ต่ำกว่า 6-10 ชั่วโมง
7. ตอนเช้าล้างออกด้วยสบู่ และน้ำตามปกติ
8. ไม่อนุญาตให้ทายาใด ๆ ระหว่างช่วงการทดลอง

ทำการเก็บเลือดของผู้ป่วย /ผู้เข้าร่วมการวิจัยเพื่อไปทำการตรวจดูผลของยาต่อการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวในห้องทดลอง ก่อนและ 4 สัปดาห์หลังทายา และทำการเก็บตัดฝานเนื้อหูด

ทั้ง 2 ตำแหน่ง ไปทำการตรวจเพื่อหาระดับการแสดงออกของอินเทอร์เฟอรอนอิน ก่อน และ 4 สัปดาห์ หลังการรักษา หรือก่อนที่รอยโรคหูดจะหายสนิท จนไม่สามารถทำการตัดชิ้นเนื้อได้

นัดติดตามผู้ป่วยทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งหูดหาย วัดปริมาตร และซักถาม ตรวจดูผลข้างเคียง จากการใช้ยา

ถ้ามีความผิดปกติหรือข้อสงสัยอันเกี่ยวข้องกับการวิจัย ผู้ป่วย / ผู้เข้าร่วมการวิจัย สามารถมา พบหรือติดต่อสอบถามได้ที่ พญ.รัชต์ธร หมอนจันทร์ ที่อยู่หน่วยผิวหนัง ตึกจิระประวัติ ชั้น 2 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โทรศัพท์ 02-2564253 ต่อ 0 , 09-8923819

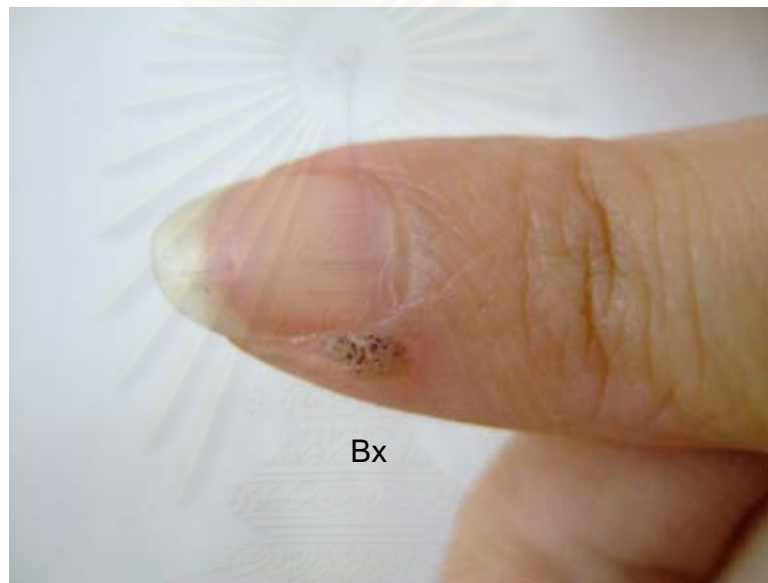


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

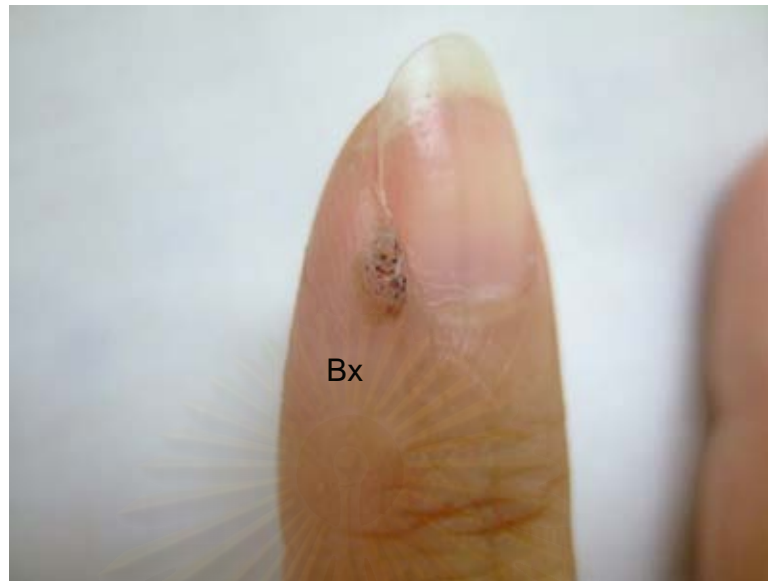
ภาพถ่ายแสดงการเปลี่ยนแปลงของรอยโรคระหว่างการรักษา

ผู้ป่วยรายที่ 6

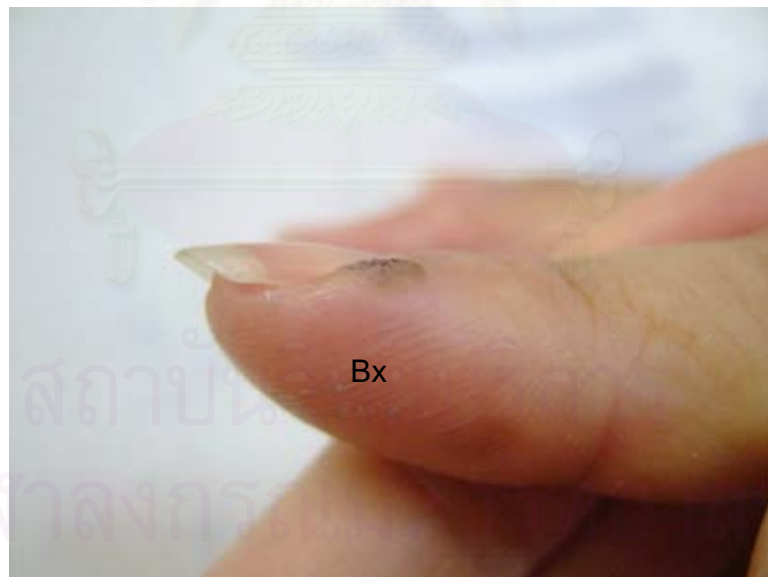


รูปที่ 60 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วชี้มือขวา ก่อนทายา 5% อิมิกวิมอดครีม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



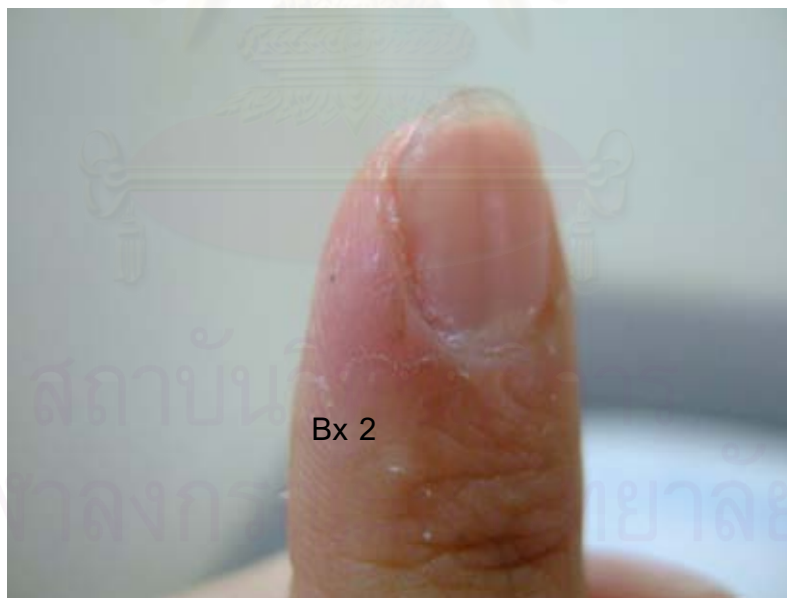
รูปที่ 61 แสดงภาพหูดรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วชี้มือขวา ก่อนทายา 5% อิมิกวิมอดครีม



รูปที่ 62 แสดงภาพหูดรายที่ 6 มองจากด้านข้างบริเวณข้างเล็บนิ้วชี้มือขวา ก่อนทายา 5% อิมิกวิมอดครีม



รูปที่ 63 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วชี้มือขวา หลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีม 14 วัน



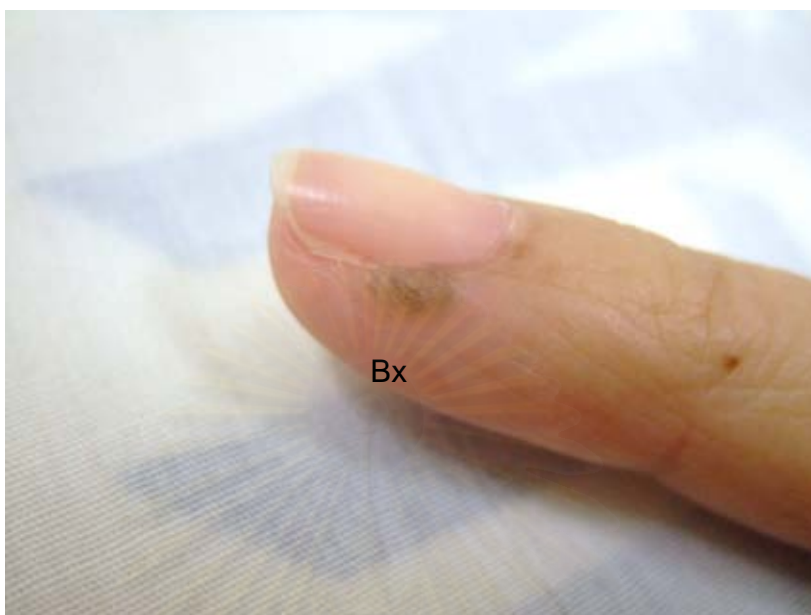
รูปที่ 64 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วชี้มือขวา ก่อนตัดชิ้นเนื้อ หลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีม 24 วัน



รูปที่ 65 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วชี้มือขวา หลังทายา5% อิมิกวิมอดครีม 24 วัน



รูปที่ 66 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วก้อยมือขวา ก่อนทายาหลอก



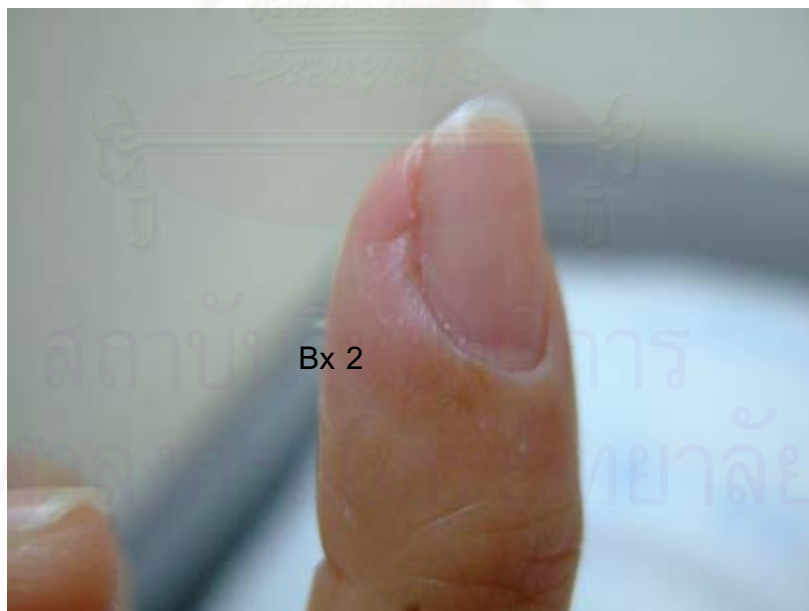
รูปที่ 67 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วก้อยมือขวา ก่อนทายาหลอก



รูปที่ 68 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วก้อยมือขวา หลังทายาหลอก 14 วัน



รูปที่ 69 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วก้อยมือขวา หลังทายาหลอด 24 วัน

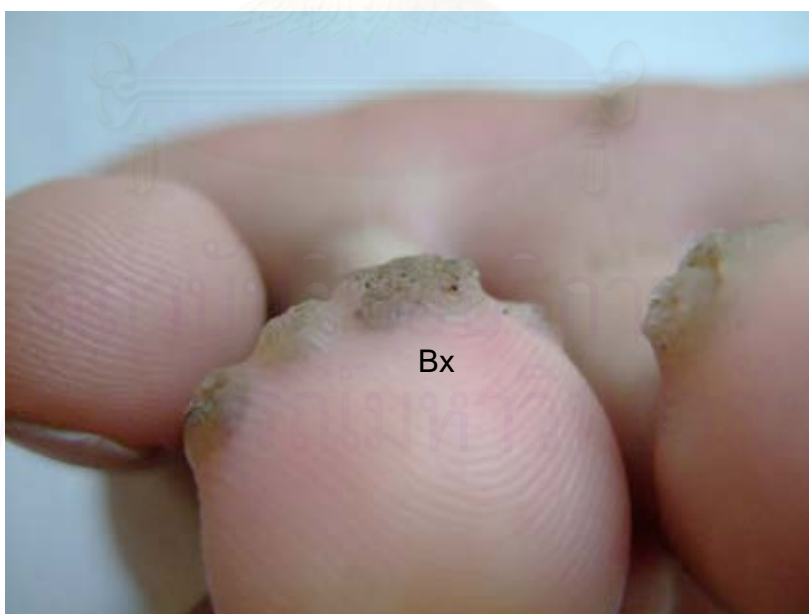


รูปที่ 70 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 6 บริเวณข้างเล็บนิ้วก้อยมือขวา หลังทายาหลอด 24 วัน

ผู้ป่วยรายที่ 11



รูปที่ 71 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 11 มองจากด้านหน้า บริเวณนิ้วนางเท้าซ้าย ก่อนทายา 5% อิมิกวิมอดครีม



รูปที่ 72 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 11 มองจากด้านข้าง บริเวณนิ้วนางเท้าซ้าย ก่อนทายา 5% อิมิกวิมอดครีม



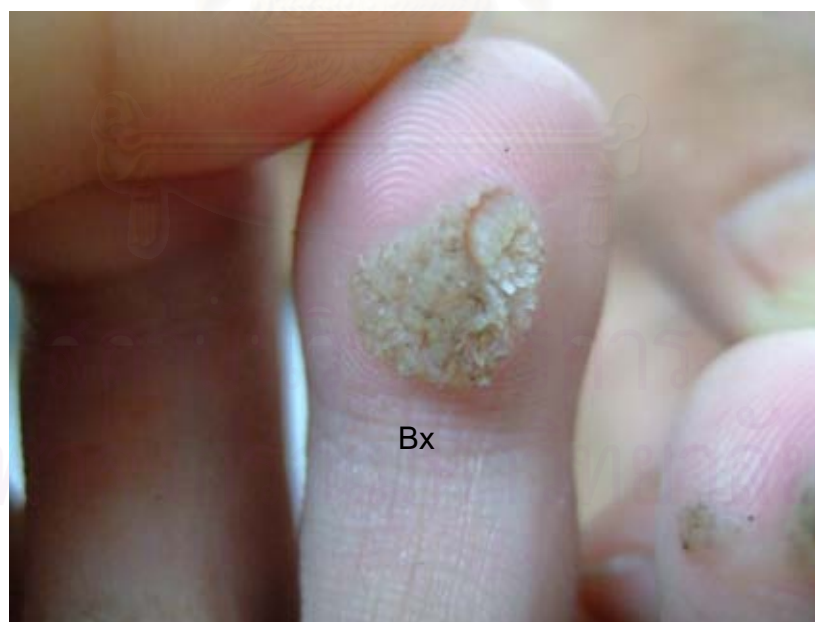
รูปที่ 73 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 11 บริเวณนิ้วนางเท้าซ้าย หลังทายา 5% อิมิควิมอดครีม 15 วัน



รูปที่ 74 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 11 บริเวณนิ้วนางเท้าซ้าย หลังทายา 5% อิมิควิมอดครีม 28 วัน



รูปที่ 75 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 11 บริเวณนิ้วนางเท้าซ้าย หลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีม 28 วัน



รูปที่ 76 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 11 มองจากด้านหลัง บริเวณนิ้วกลางเท้าซ้าย ก่อนทายาลอก



รูปที่ 77 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 11 มองจากด้านข้าง บริเวณนิ้วกลางเท้าซ้าย ก่อนทายาหลอก



รูปที่ 78 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 11 บริเวณนิ้วกลางเท้าซ้าย หลังทายาหลอก 15 วัน



รูปที่ 79 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 11 บริเวณนิ้วกลางเท้าซ้าย หลังทายาหลอก 28 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ป่วยรายที่ 10

รูปที่ 80 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 10 บริเวณหลังมือขวา ก่อนทายา5% อิมิกวิมอดครีม



รูปที่ 81 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 10 บริเวณหลังมือขวา หลังตัดชิ้นเนื้อ ก่อนทายา5% อิมิกวิมอดครีม



รูปที่ 82 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 10 บริเวณหลังมือขวา หลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีม 15 วัน



รูปที่ 83 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 10 บริเวณหลังมือขวา หลังทายา 5% อิมิกวิมอดครีม 15 วัน



รูปที่ 84 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 10 บริเวณนิ้วโป้งมือขวา ก่อนทายาหลอก



รูปที่ 85 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 10 บริเวณนิ้วโป้งมือขวา ก่อนทายาหลอก



รูปที่ 86 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 10 บริเวณนิ้วโป้งมือขวา หลังตัดชิ้นเนื้อครั้งแรก
ก่อนทายาหลอก



รูปที่ 87 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 10 บริเวณนิ้วโป้งมือขวา หลังทายาหลอก 15 วัน



รูปที่ 88 แสดงภาพหูดผู้ป่วยรายที่ 10 บริเวณนิ้วโป้งมือขวา หลังทายาหลอก 15 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นามสกุล	นางสาวรัชต์ธร หมอนจันทร์
ประวัติส่วนตัว	เกิดวันที่ 6 ตุลาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546
ประวัติการทำงาน	ได้รับการบรรจุเป็นพนักงานของรัฐตำแหน่งนายแพทย์ 4 ที่โรงพยาบาล ศูนย์จังหวัดนครปฐม ในปี พ.ศ.2546-2548 และเลื่อนตำแหน่งเป็น นายแพทย์ 5 ก่อนลาออกจากราชการเพื่อศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขา ตจวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ.2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย