รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การตรวจหาภาวะการเปลี่ยนแปลงการควบคุมเหนือพันธุกรรมในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) Detection of epigenetic changes in cervical samples with different lesions severity

หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ชั้น 16 ตึก อปร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถ.พระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330

ผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร.อาคม ไชยวงศ์คต Arkom Chaiwongkot, PhD	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. รศ.ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล Asso. Prof. Parvapan Bhattarakosol , PhD	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. รศ.นพ.สมชัย นิรุตติศาสน์ (เสียชีวิต) Asso. Prof. Somchai Niruthisard, MD	ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ผู้วิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๙

บทคัดย่อภาษาไทย

บทนำ โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองในผู้หญิงทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งรวมประเทศไทยด้วย มีการศึกษาพบภาวะ global DNA hypomethylation ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ รวมถึงมะเร็งปากมดลูกด้วย การศึกษานี้จึงสนใจพัฒนาวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) ในการตรวจ global DNA methylation เพื่อตรวจกรองมะเร็งปากมดลูกซึ่งวิธี ELISA เหมาะสมกับประเทศกำลังพัฒนา

วิธีดำเนินการวิจัย การศึกษานี้พัฒนาวิธี ELISA ในการตรวจ global DNA methylation พร้อมเปรียบเทียบผลกับวิธี bisulfite LINE1 pyrosequencing โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ

ผลการวิจัย โดยวิธี ELISA วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ณ เวลา 40 นาที พบค่า global DNA methylation ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆได้ค่าร้อยละดังนี้ Caski คือ 3.72 SiHa คือ 1.74 HeLa คือ 2.42 ME180 คือ 4.79 MS751 คือ 5.09 และ C33A คือ 1.47 และจากเม็ดเลือดขาวจากคนปกติได้ค่าคือ 8.20 ผลการตรวจ LINE1 methylation โดยวิธี pyrosequencing ได้ค่าดังนี้ Caski ร้อยละ 45 SiHa ร้อยละ 35 และเม็ดเลือดขาวจากคนปกติได้ค่าคือ ร้อยละ 62 สำหรับผลตรวจ global DNA methylation ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูก 161 ตัวอย่าง โดยวิธี LINE1 pyrosequencing ได้ค่าดังนี้ Normal ร้อยละ 55.6 cervical intraepithelial lesion 1 (CIN1) ร้อยละ 56.8 CIN2-3 ร้อยละ 57.3 และมะเร็งปากมดลูกร้อยละ 48.8 พบว่าค่าเฉลี่ยของมะเร็งมีความแตกต่างกับระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลตรวจโดยวิธี ELISA ในตัวอย่าง 100 ตัวอย่าง มีค่าดังนี้ Normal ร้อยละ 4.50 CIN1 ร้อยละ 3.83 CIN2-3 ร้อยละ 2.83 และมะเร็งปากมดลูกร้อยละ 3.03 พบว่าค่าเฉลี่ยของมะเร็งมีความแตกต่างกับระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

วิจารณ์ผลการวิจัย พบว่าในเซลล์มะเร็งมีภาวะ global DNA hypomethylation เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ แต่ยังพบปัญหาการจับของดีเอ็นเอบนพื้นผิวสไลด์ในการทำ ELISA ทำให้ได้ค่าร้อยละของการเกิด global DNA methylation โดยวิธี ELISA ในระดับต่ำมากเมื่อเทียบกับวิธี LINE1 pyrosequencing จึงควรทำการพัฒนาเทคนิค ELISA เพิ่มเติมเพื่อให้ผลการวิจัยที่น่าเชื่อถือ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Introduction; Cervical cancer is the second most cancer found in women worldwide especially in developing countries including Thailand. Previous reports showed that global DNA hypomethylation is found in many types of cancer including cervical cancer. We aimed to develop enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) for detection of global DNA methylation in order to screening of cervical cancer in low resource countries.

Materials and methods; ELISA assay was developed and the results obtained from ELISA assay were compared to bisulfite LINE1 methylation by pyrosequencing. DNA extracted from cervical cells with different lesions severity were used.

Results; ELISA plate was read at 405 nm within 40 min, the percentage of global DNA methylation in cervical cancer cell lines were 3.72 (Caski), 1.74 (SiHa), 2.42 (HeLa), 4.79 (ME189), 5.09 (MS751), 1.47 (C33A) and 8.20 of white blood cells collected from normal population. Bisulfite LINE1 pyrosequencing were 45% of Caski, 35% of SiHa and 62% of normal white blood cells. Mean of global DNA methylation by pyrosequencing in 161 cervical samples were as followed; 55.6% of normal, 56.8% of CIN1, 57.3% of CIN2-3 and 48.8% of cervical cancer, there was significant difference among groups ($p<0.05$). By ELISA assay in 100 cervical samples, 4.50% of Normal, 3.83 of CIN1, 2.83% of CIN2-3 and 3.03% of cervical cancer, there was significant difference among groups ($p<0.05$).

Discussion; Global DNA hypomethylation was significantly found in cervical cancer compared to normal cervical cells. Problem of ELISA assay is the binding affinity of DNA on ELISA plate leading to the low percentage of global DNA methylation when compared to LINE1 pyrosequencing assay. ELISA assay must be further developed and evaluated in clinical samples for reliable results.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) 2

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) 3

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) 4

สารบัญตาราง (List of Tables) 6

สารบัญภาพ (List of Illustration) 7

คำอธิบายสัญญาลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviation) 8

1. บทนำ (Introduction) 9

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 9

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 10

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 10

1.4 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง 11

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 16

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and method) 16

2.1 การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ 16

2.2 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอโดยน้ำยา Roche และ QIAGEN 16

2.3 การตรวจ Global DNA methylation โดยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) 17

2.4 การตรวจ Global DNA methylation โดยวิธี Pyrosequencing 18

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้สถิติ 19

3. ผลการวิจัย (Results) 19

3.1 หาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง 19

3.2 การคำนวณหาร้อยละของ methylation จากกราฟมาตรฐาน 20

3.3 ภาวะ global methylation ในเซล์มะเร็งเพาะเลี้ยงตรวจโดยวิธี ELISA และ pyrosequencing 21

3.4 ผลการตรวจภาวะ global methylation ในตัวอย่างโดยวิธี ELISA และ pyrosequencing 21

3.5 การหาค่าความสัมพันธ์ของผลการตรวจ global methylation ระหว่างวิธี pyrosequencing กับวิธี ELISA 23

3.6 หาค่าความไวและความจำเพาะในการใช้การตรวจ global methylation 23

4. อภิปรายผลการวิจัย (Discussion) 25

5. สรุปผลการวิจัย 26

เอกสารอ้างอิง 27

ประวัติคณะผู้วิจัย 31

สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่ 1 แสดงค่าความไว ความจำเพาะของการตรวจ global methylation โดย วิธี pyrosequencing ที่ค่าต่างๆ กัน 25

ตารางที่ 2 แสดงค่าความไว ความจำเพาะของการตรวจ global methylation โดย วิธี ELISA ที่ค่าต่างๆ กัน 25

สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm 20

รูปที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm 20

รูปที่ 3 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานและสมการที่ใช้ในการคำนวณหาร้อยละการเกิดภาวะ methylation โดยวิธี ELISA 21

รูปที่ 4 ผลการตรวจ global methylation (LINE1) โดยวิธี pyrosequencingในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูก 161 ตัอย่าง ($p<0.05$ (Kruskal wallis)) 22

รูปที่ 5 ผลการตรวจ global methylation โดยวิธี ELISA ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูก 100 ตัอย่าง ($p<0.05$, (Kruskal wallis)) 22

รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า global methylation ระหว่างวิธี pyrosequencing กับวิธี ELISA 23

รูปที่ 7 กราฟ Receiver operating characteristic (ROC) แสดงค่าความไวความจำเพาะและพื้นที่ใต้กราฟของการตรวจ global methylation โดยวิธี pyrosequencing 24

รูปที่ 8 กราฟ Receiver operating characteristic (ROC) แสดงค่าความไวความจำเพาะและพื้นที่ใต้กราฟของการตรวจ global methylation โดยวิธี ELISA 24

คำอธิบายสัญญาลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviation)

CIN	cervical intraepithelial neoplasia
CIS	carcinoma in situ
COBRA	combined bisulfite restriction analysis
E	early
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay
E2BS	E2 binding site
FFPE	formaline fixed paraffin embedded tissue
HDACs	histone deacetylases
HSIL	high grade squamous intraepithelial lesions
HPCE	high-performance capillary electrophoresis
HPV	Human papillomavirus
L	late
LINE	Long interspersed nuclear element
LCR	Long control region
LSIL	low grade squamous intraepithelial lesions
NASBA	nucleic acid sequence-based amplification
Pap smear	Papanicolaou smear
ROC	receiver operating characteristic
SCC	squamous cell carcinoma
TSG	Tumor suppressor gene
URR	Upper regulatory region
VIA	Visual Inspection with Acetic acid

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองในผู้หญิงทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งรวมประเทศไทยด้วย ข้อมูลจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศไทยพบว่ามีการตรวจพบมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ในแต่ละปีกว่า 6,000 ราย และในจำนวนนี้ประมาณครึ่งหนึ่งจะเสียชีวิต จากโรคนี้โดยเฉลี่ย 7 รายต่อวัน

การเกิดเป็นมะเร็งปากมดลูกเนื่องจากติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) ชนิดที่มีความเสี่ยงสูง [high risk (hr)-HPVs] เช่น HPV ไทป์ 16 และ ไทป์ 18 แบบเรื้อรัง โดยมักจะพบว่าในเซลล์มะเร็งมีสารพันธุกรรมของไวรัสสอดแทรกอยู่ภายในโครโมโซม ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ก่อให้เกิดมะเร็งของไวรัสคือ E6 และ E7 ในระดับที่สูง ซึ่งไปรบกวนการทำงานของโปรตีนของโฮสต์เช่น p53 และ pRb ตามลำดับ

จากจำนวนผู้หญิงที่มีการติดเชื้อไวรัส HPVs มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกซึ่งแสดงว่าการติดเชื้อไวรัส HR-HPVs เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก การเกิดมะเร็งปากมดลูกใช้เวลา 20-30 ปี ปัจจัยด้านพันธุกรรม (genetics) และกระบวนการนอกเหนือพันธุกรรม (epigenetics) มีส่วนร่วมในการทำให้เกิดมะเร็ง

ในส่วนกระบวนการนอกเหนือพันธุกรรม เช่นการเกิด DNA methylation ตรง CpG และทำให้โครมาตินมีการม้วนจัดโครงสร้างใหม่และอยู่ในสภาวะปิด ทำให้ยับยั้งการจับของ host transcription factors ส่งผลให้ยับยั้งการแสดงออกของยีน การเกิดภาวะ DNA hypermethylation ในเซลล์มะเร็งพบเกิดตรง promoter ของ tumor suppressor genes (TSGs) ซึ่งจะไปควบคุมการแสดงออกของ TSGs และในเซลล์ปกติยังสามารถพบ hypermethylation ตรง CpG บริเวณอื่นในจีโนมของเซลล์เช่น บริเวณที่เป็น repetitive sequences ขนาดใหญ่ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันหลายชุดและมีการศึกษาพบว่ามีการเกิดภาวะ global DNA hypomethylation ตรงบริเวณนี้ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ และภาวะการเปลี่ยนแปลงแบบ methylation ยังสามารถพบได้ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งในจีโนมของโฮสต์และเชื้อไวรัส HPV ได้เช่นกัน ในกรณีจีโนมของเชื้อไวรัสสามารถพบได้ทั้งสภาวะ productive infection และ transforming infection ซึ่งการเกิด methylation ในจีโนมของไวรัสเป็นกลไกหนึ่งในวงจรชีวิตของไวรัสเพื่อสร้างอนุภาคไวรัส (productive infection) แต่ในสภาวะที่เกิดการติดเชื้อแบบยืดเยื้อพร้อมทั้งมีการเกิด methylation ตรง HPV E2 binding sites (E2BS) ตรงตำแหน่งที่จำเพาะอาจจะนำไปสู่ภาวะการติดเชื้อที่ทำให้เซลล์ผิดปกติ (transforming infection) และนำไปสู่การเกิดเป็นมะเร็งได้

การตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งปากมดลูก ปัจจุบันคือการตรวจ pap smear และมีการตรวจดูการติดเชื้อ hr-HPVs ซึ่งมีการตรวจเฉพาะในโรงพยาบาลใหญ่หรือเฉพาะทาง สำหรับการตรวจหาเชื้อ hr-HPVs อย่างเดียวเพื่อวินิจฉัยภาวะเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปากมดลูกอาจจะไม่เพียงพอเนื่องจากมีผู้หญิงเพียงส่วนน้อยที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก จึงได้มีการพัฒนาการตรวจ Biomarker ต่างๆว่าเซลล์ปากมดลูกมีความผิดปกติ เช่น ดูการแสดงออกของโปรตีน เช่น โปรตีน p16/Ki67 การตรวจ hypermethylation ตรงโปรโมเตอร์ของยีนที่จำเพาะ(specific gene promoter hypermethylation) เช่น *CADM1, RARB* และ *DAPK* การ

ตรวจความผิดปกติของโครโมโซม (aneuploidy หรือ polyploidy) ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของโครโมโซม เช่น 1p, 1q, 3q และ 20q หรือ การลดลงของโครโมโซม เช่น 2q, 3p, 4p, 11p, 17p และ 19p และการตรวจ methylation ในส่วนยีน hr-HPVs long control region (LCR) และ L1 เป็นต้น แต่ก็ยังไม่ได้นำมาใช้ในการวินิจฉัยในงานประจำทั่วไป เนื่องจากมีราคาที่สูงไม่เหมาะสมกับประเทศกำลังพัฒนา ที่จะต้องตรวจในกลุ่มประชากรจำนวนมาก

ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีตรวจกรองที่มีทั้งความไวและความจำเพาะและเหมาะสมกับประเทศกำลังพัฒนา ในการตรวจกรองผู้หญิงที่มีความเสี่ยงเป็นมะเร็งปากมดลูก มีการศึกษาวิธีการตรวจเมธิลเลชั่นที่เกิดขึ้นทั้งเซลล์ของโฮตส์ (global DNA methylation) โดยตรวจยีนในกลุ่ม repetitive sequences เช่น Long interspersed nuclear element (LINE1), Alu, Satellite-alpha และ Satellite-2 ใช้วิธีทางอณูโมกุล เช่น real time methylation specific PCR, bisulfite sequencing PCR, combined bisulfite restriction analysis (COBRA) และ pyrosequencing ซึ่งวิธีทางอณูโมเลกุลมีราคาแพง ยังไม่สามารถนำมาใช้ในประเทศกำลังพัฒนาที่ต้องตรวจในกลุ่มประชากรผู้หญิงจำนวนมากได้ ดังนั้นการศึกษาปัจจุบันจึงสนใจวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีการที่จะถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้ซึ่งเป็นการตรวจจีโนมทั้งหมดในเซลล์ เพื่อทำการตรวจกรองขั้นต้นเพื่อคัดแยกกลุ่มผู้หญิงที่มีความเสี่ยงสูงกับความเสี่ยงต่ำในการจะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก ตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกจากกลุ่มผู้หญิงที่มีการติดเชื้อ HPV และให้ผลลบต่อเชื้อ HPV จะถูกตรวจ global DNA methylation ทั้งหมด จะตรวจ LINE1 methylation โดยวิธี pyrosequencing เพื่อเปรียบเทียบกับวิธี ELISA

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อหาภาวะการเปลี่ยนแปลงการควบคุมนอกเหนือพันธุกรรมแบบ methylation ในจีโนมของเซลล์โดยรวม (global DNA methylation) ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติระยะต่าง ๆ ได้แก่ normal cervices, cervical intraepithelial neoplasia (CIN)-1, CIN-2/CIN-3 และ squamous cell carcinoma (SCC) เพื่อประเมินความเป็นไปได้ของการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพกับการดำเนินโรค โดยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) และวิธี pyrosequencing

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เป็นการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงนอกเหนือพันธุกรรมแบบ methylation ของดีเอ็นเอของเซลล์โดยรวม (global DNA methylation) ในเซลล์ปากมดลูกที่มีความผิดปกติระยะต่าง ๆ ได้แก่ normal cervices, cervical intraepithelial neoplasia (CIN)-1, CIN-2/CIN-3 และ squamous cell carcinoma (SCC) โดยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) และจะเปรียบเทียบวิธี ELISA ที่ถูกพัฒนากับการตรวจ LINE1 methylation โดยวิธี pyrosequencingแล้วนำมาคำนวณทางสถิติเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างภาวะการเกิด Global DNA methylation กับความเสี่ยงในการเป็นมะเร็ง

1.4 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

Human Papillomavirus (HPV) เป็นไวรัสจัดอยู่ใน *Family Papillomaviridae* มีขนาด 52-55 นาโนเมตร ไม่มีเปลือกหุ้ม (Non-Envelop หรือ Naked Virus) มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอวงกลมขนาดประมาณ 8,000 เบส ประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นโครงสร้างประมาณร้อยละ 88 โดยมีโครงสร้างจีโนมแบ่งออกเป็น3 ส่วน ดังนี้ [1]

1. Early region (E) เป็นบริเวณที่มียีนควบคุมการสร้างโปรตีน ซึ่งประกอบไปด้วย E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 โดย E1, E2 และ E4 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไวรัส และการสร้างไวรัสตัวใหม่ ส่วน E5, E6 และ E7เป็นโปรตีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง หรือเรียกว่า oncoprotein ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากในการก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก โดยเฉพาะ E6 และ E7
2. Late region (L) เป็นบริเวณที่มียีนควบคุมการสร้างโปรตีนประกอบด้วย L1 และ L2 ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแคพสิดโปรตีนของไวรัส โดยพบว่า L1 เป็นส่วนที่มีความเหมือนกันมากที่สุดในเชื้อ HPV แต่ละไทป์และเป็นชิ้นส่วนที่สำคัญในการนำมาพัฒนาผลิตวัคซีน
3. Upper regulatory region(URR) หรือ Long control region (LCR) เป็นบริเวณที่ไม่มียีนควบคุมการสร้างโปรตีน แต่เป็นบริเวณที่สามารถจับได้กับ repressors และ activators ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน

จากการศึกษาพบว่า HPV เป็นสาเหตุก่อโรคมะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer) โดยมากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยจะพบดีเอ็นเอของ HPV (HPV DNA) [2] มีการศึกษาที่พบดีเอ็นเอของเชื้อ HPV ในตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกถึงร้อยละ 99.7 โดยใช้ไพร์เมอร์มากกว่า 1 ชนิดในการตรวจ [3].

ปัจจุบันมี HPV มากกว่า 100 ชนิด ซึ่งแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่โดยอาศัยคุณสมบัติในการก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก หรือ ความเสี่ยงในการก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ดังนี้ [4]

1. HPV types ที่มีความเสี่ยงสูง (high risk) ได้แก่ ชนิด 16,18,31,33,35,39,45,51, 52, 56, 58, 59,68,73 และ 82
2. HPV types ที่มีความเสี่ยงต่ำ (low risk) ได้แก่ ชนิด 6,11,40,42,43,44, 54,61,70,72,81 และ CP6108

ในกลุ่มที่เป็น high risk พบว่า HPV type 16 และ HPV type 18 มีความสำคัญต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก มากที่สุดโดยมากกว่าร้อยละ 50 ของ squamous cell carcinoma พบ HPV-16 DNA และมากกว่าร้อยละ 50 ของ adenocarcinomas พบ HPV-18 DNA [4, 5] และในประชากรผู้หญิงเอเชียตะวันออกยังพบ HPV 58 และ 52 สูงในกลุ่มมะเร็งปากมดลูก [6-10].

การติดต่อของไวรัสแปปิโลมาเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับรอยโรค และเชื่อว่าการติดเชื้อไวรัสเกิดจากการมีเพศสัมพันธ์และมีรอยฉีกขาดของผิวเยื่อบุปากมดลูก (mucosa) ทำให้ไวรัสติดเข้าไปในเซลล์ชั้นล่างหรือ basal cells ตรงบริเวณ squamo-columnar junction ดังนั้นจึงจัดเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์

โรคหนึ่ง การติดเชื้อไวรัสแปปิโลมาโดยทั่วไปพบว่าสามารถหายได้เอง ซึ่งสารพันธุกรรมของไวรัสจะอยู่ในลักษณะ Extrachromosomal stage ซึ่งใน basal cells มีการแสดงออกของโปรตีน E1 และ E2 เพื่อช่วยจำลองสารพันธุกรรมของไวรัสโดยโปรตีน E1 ทำหน้าที่เป็น DNA helicase และ ATPase activity และจะมีจำนวนไวรัสประมาณ 50-100 copies ต่อเซลล์และโปรตีน E2 จะควบคุมการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 โดยเมื่อมีโปรตีน E2 ในระดับต่ำจะไปจับตรง distal E2BS แบบ high affinity แล้วกระตุ้นการแสดงออกของ early proteins และเมื่อมีการแสดงออกของ early proteins มากขึ้นรวมทั้ง E2 ด้วย โปรตีน E2 จะถูกเบียดให้ไปจับกับ proximal E2BS ที่อยู่ติดกับ early promoter แบบ low affinity ซึ่งสามารถไปบดบังการจับของ host proteins เช่น RNA polymerase complexes และ SP-1 ทำให้มีการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 โดยโปรตีน E6 และ E7 ในระดับต่ำจะช่วยทำให้จีโนมของไวรัสอยู่ในเซลล์ได้ (viral genome maintenance) และเมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (cellular differentiation) เซลล์ที่ไม่ติดเชื้อจะตายไป ในขณะที่เซลล์ติดเชื้อไวรัสมีการแสดงออกของโปรตีน E6 และ E7 จะช่วยให้เซลล์ที่ติดเชื้อไม่ตาย โดยโปรตีน E7 สามารถจับกับ pRB ทำให้ E2F ซึ่งเป็น Transcriptional factor เป็นอิสระไปกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ s-phase และเข้าสู่วงจรของเซลล์ (cell cycle) อีกครั้งและจำนวนไวรัสใน differentiated cells จะมีปริมาณสูงถึง 1,000 copies ต่อเซลล์ และจะมีการกระตุ้นการแสดงออกของ Late proteins เพื่อสร้างอนุภาคไวรัสและ โปรตีน E1^E4 เพื่อช่วยปลดปล่อยอนุภาคไวรัส (Permissive infection) ซึ่งสามารถติดต่อไปสู่เซลล์อื่นได้ [11] แต่บางครั้งไวรัสแปปิโลมาสามารถคงอยู่ในเซลล์ติดเชื้อได้นานโดยไม่มีการสร้างอนุภาคไวรัสเรียกการติดเชื้อนี้ว่า Persistent infection โดยในภาวะนี้ถ้ามีการแสดงออกของโปรตีนที่ก่อให้เกิดมะเร็งคือ E6 และ E7 สูงขึ้น จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์ตามมาซึ่งการติดเชื้อแบบนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งหรือ Transforming infection และพบว่ามีการสอดแทรกสารพันธุกรรมของไวรัสเข้าไปในสารพันธุกรรมของเซลล์โฮสท์พร้อมกับมีการขาดหายไปของยีน E2

มีการศึกษาหาความสัมพันธ์และความชุกของไวรัสแต่ละชนิดในรอยโรคชนิดต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็งปากมดลูกนั้นพบว่ามีไวรัสแปปิโลมาที่เป็นสาเหตุก่อโรคอยู่ประมาณ 30 ชนิด และที่ตรวจพบมีความชุกมากที่สุดคือ HPV-16 พบประมาณร้อยละ 50 ข้อมูลของผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบ HPV-DNA ร้อยละ 82 ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก โดยร้อยละ 42.68 เป็น HPV-16 ร้อยละ 20.73 เป็น HPV-18 [12] ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยระยะก่อนมะเร็ง Cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 1, 2, 3 พบ HPV-DNA ร้อยละ 33.3, 36.8, 75 ตามลำดับ โดยในระยะ CIN III พบ HPV-16 ร้อยละ 44.44 และ HPV-18 ร้อยละ 16.05 กลุ่มควบคุมพบ HPV-DNA เพียงร้อยละ 2.7 เท่านั้น [13]

กลไกที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้หรือ Transforming infection มีการสร้าง Early protein โดยเฉพาะ E6 และ E7 ในระดับสูง ซึ่งปัจจุบันจัดโปรตีนทั้ง 2 ตัวนี้เป็นสารก่อมะเร็ง (oncoprotein) โดย E7 สามารถทำให้เซลล์เจริญได้อย่างต่อเนื่องและไม่ตาย (immortalized cell) เพราะ E7 สามารถจับกับ pRB ทำให้ E2F ซึ่งเป็น Transcriptional factor เป็นอิสระ ไปกระตุ้นให้วงจรของเซลล์เข้าสู่ s-phase มีขบวนการ Transcription มีผลให้เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนได้ pRB เป็น tumor suppressor ตัวหนึ่งซึ่งตามปกติจะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ระยะ G1 [14] นอกจากนี้ E6 ก็มีคุณสมบัติจับกับ tumor suppressor p53 ซึ่งโดยปกติ p53 จะจับกับ p21 กระตุ้นขบวนการ apoptosis (program cell death) การที่

E6 จับกับ p53 ทำให้ยับยั้งขบวนการดังกล่าว ทำให้เซลล์ขาดระบบควบคุมและเกิดการ transformation ของเซลล์ [15] คุณสมบัติที่กล่าวมานี้พบได้ในกลุ่มเสี่ยงสูง ได้แก่ HPV-16, 18 คุณสมบัติของโปรตีน E6 และ E7 ของไวรัสแปปิโลมาไทป์อื่น ๆ พบว่าแตกต่างกันไป ในกลุ่มเสี่ยงต่ำ พบว่า E6 และ E7 ไม่สามารถจับเกาะกับ p53 และ pRB ได้ หรือบางครั้งจับได้แต่หลวมและไม่สามารถยับยั้งคุณสมบัติของโปรตีนทั้งสองชนิดได้ ส่วน E5 พบว่านอกจากมีคุณสมบัติยับยั้งขบวนการ apoptosis โดยไปยับยั้งการกระตุ้นของ TRAIL ผ่าน death-inducing signal complex แล้ว ยังสามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนและมี differentiation ของ keratinocytes ด้วย [16, 17]

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองในผู้หญิงทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา ซึ่งพบว่าอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งปากมดลูกเพิ่มสูงขึ้น [18] องค์การอนามัยโลกประมาณการณ์ว่า ในปัจจุบันมีผู้หญิงมากกว่า 2 ล้านคนที่เป็นมะเร็งปากมดลูก และมีการตรวจพบมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ 470,000 รายทุกปี ดังนั้น จึงพบผู้ป่วยรายใหม่ 1,200 รายในแต่ละวัน ส่วนประเทศไทย พบว่ามีการตรวจพบมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ในแต่ละปีกว่า 6,000 ราย และในจำนวนนี้ประมาณครึ่งหนึ่งจะเสียชีวิต จากโรคนี้โดยเฉลี่ย 7 รายต่อวัน[19]

จากจำนวนผู้หญิงที่มีการติดเชื้อไวรัส HPVs มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกซึ่งแสดงว่าการติดเชื้อไวรัส HR-HPVs เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก การเกิดมะเร็งปากมดลูกใช้เวลา 20-30 ปี ปัจจัยด้านพันธุกรรม (genetics) และกระบวนการนอกเหนือพันธุกรรม (epigenetics) มีส่วนร่วมในการทำให้เกิดมะเร็ง

ในส่วนกระบวนการนอกเหนือพันธุกรรม เช่นการเกิด DNA methylation ตรง CpG โดยเอนไซม์ DNA methyltransferase มาเติมหมู่ methyl ตรง cytosine ตำแหน่งที่ 5 [20] ทำให้มีการชักนำโปรตีน histone deacetylases (HDACs) มาตรงบริเวณที่เกิด methylation ทำให้เกิดการตัดหมู่ acetyl ออกจากโปรตีนฮิสโตน (histone) ทำให้โครมาตินมีการม้วนจัดโครงสร้างใหม่และอยู่ในสภาวะปิด ทำให้ยับยั้งการจับของ host transcription factors และ RNA polymerase complex ส่งผลให้ยับยั้งการแสดงออกของยีน

จากการศึกษาการเกิดภาวะการเปลี่ยนแปลงแบบ methylation ในเซลล์ของคน มีการรายงานพบ hypermethylation ในเซลล์มะเร็งซึ่งเกิดตรง promoter ของ tumor suppressor genes (TSGs) เช่น *TSLC1*, *RASSF1A*, *CDH1, RARB*, $p16^{INK4a}$ *DAPK, CADM1* และ *CCNA1* เป็นต้น ซึ่งจะไปควบคุมการแสดงออกของ TSGs นอกจากการตรวจตรงบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่จำเพาะแล้ว ยังมีการตรวจภาวะ methylation ตรงบริเวณบริเวณดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ยีน เช่น บริเวณ repetitive sequences ขนาดใหญ่ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันหลายชุดโดยในเซลล์ปกติพบว่าบริเวณนี้มีภาวะ hypermethylation ตรง CpG และมีการศึกษาพบว่ามีการเกิดภาวะ global DNA hypomethylation ตรงบริเวณนี้ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านม [21] มะเร็งต่อมลูกหมาก[22] มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ[23] มะเร็งตับ[24] มะเร็งเม็ดเลือดขาว [25] และมะเร็งปากมดลูก [26] เป็นต้น

ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกยังสามารถพบความผิดปกติของภาวะ methylation ทั้งในจีโนมของโฮสต์และเชื้อไวรัส HPV ได้เช่นกัน ในกรณีจีโนมของเชื้อไวรัสสามารถพบการเกิด methylation ได้ทั้งสภาวะ productive infection และ transforming infection ซึ่งการเกิด methylation ในจีโนมของไวรัสเป็นกลไก

หนึ่งในวงจรชีวิตของไวรัสเพื่อสร้างอนุภาคไวรัส (productive infection) เช่น จะควบคุมการแสดงออกของ late gene ในเซลล์ที่เป็น undifferentiated cells [27]แต่ในสภาวะที่เกิดการติดเชื้อแบบยืดเยื้อพร้อมทั้งมีการเกิด methylation ตรง HPV LCR บริเวณที่จำเพาะอาจจะนำไปสู่ภาวะการติดเชื้อที่ทำให้เซลล์ผิดปกติ (transforming infection) [28] และนำไปสู่การเกิดเป็นมะเร็งได้ สำหรับภาวะ Global DNA methylation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ถูกศึกษา โดยตรวจยีน LINE1 [29] โดยใช้เทคนิค combined bisulfite restriction analysis (COBRA) และพบว่าภาวะ LINE1 hypomethylation สัมพันธ์กับการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งและมีอีกการศึกษาใช้วิธีการย้อม formaline fixed paraffin embedded tissue (FFPE) โดยใช้ antibody ต่อ 5-methylacytosine และวิธี high-performance capillary electrophoresis (HPCE) พบว่าภาวะ global DNA hypomethylation สัมพันธ์กับภาวะการเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก [26]

ปัจจุบันวิธีการตรวจหามะเร็งปากมดลูกมีดังนี้ [30, 31]

1. การตรวจเซลล์ทาง cytology ได้แก่การตรวจ Papanicolaou smear (Pap smear) วิธีนี้ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญในการตรวจเพื่อดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตั้งแต่เป็น dysplasia จนกลายเป็นเซลล์มะเร็งซึ่งถ้าไม่ชำนาญอาจมีความผิดพลาดในการอ่านและแปลผลได้ง่าย
2. การตรวจหา HPV DNA โดยเทคนิคทางด้านอณูโมเลกุล (molecular detection) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่มีความจำเพาะและความไวสูงกว่าการตรวจ Pap smear แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ต้องอาศัยบุคลากรที่ได้รับการอบรมความชำนาญของเทคนิคมาก่อน นอกจากนี้การตรวจพบ HPV DNA ไม่ได้เป็นข้อบ่งชี้ว่าเป็นเซลล์มะเร็ง การบ่งชี้ยังต้องอาศัยการอ่านผลทางเซลล์พยาธิวิทยา
3. การตรวจโดยวิธี Visual Inspection with Acetic acid(VIA) โดยใช้น้ำยา acetic acid เจือจาง 3-5% ป้ายลงบนบริเวณปากมดลูก แล้วสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงของสีของปากมดลูกหลังจากป้ายน้ำยา 1 นาทีภายใต้แสงไฟที่ส่องสว่าง โดยเซลล์ที่มีความผิดปกติจะมีปริมาณโปรตีนที่มากกว่าปกติและน้ำยา acetic acid จะไปทำให้โปรตีนในเซลล์เกิดเกาะกลุ่ม เมื่อแสงไฟตกกระทบจะไม่สามารถผ่านไปได้จึงเกิดการสะท้อนแสงทำให้เห็นเป็นฝ้าขาว (acetowhite) ซึ่งเกิดขึ้นชั่วคราวซึ่งเห็นได้ด้วยตาเปล่า ให้ผลบวก แต่เซลล์ปกติแสงจะผ่านเซลล์ได้ทำให้ได้เห็นเป็นสีแดงของเส้นเลือดฝอย ซึ่งมีการศึกษาในประเทศไทยพบว่าการได้ผล VIA ได้ผลบวกสามารถพบได้ในเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูกที่อยู่ในช่วงมีการซ่อมแซม หรือมีการอักเสบอาจทำให้เกิดเป็นฝ้าขาวได้
4. การตรวจ HPV mRNA โดยใช้หลักการ target amplication เช่น The APTIMA HPV Assay เพื่อตรวจ E6/E7 mRNA ของไวรัสในกลุ่มความเสี่ยงสูง 14 ชนิด ได้แก่ HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, และ 68 และอีก 2 การทดสอบ ได้แก่ PreTect HPV-Proofer และ NucliSENS Easy Q HPV ใช้หลักการ nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) โดยใช้อุณหภูมิเดียวเพื่อตรวจ E6/E7 mRNA แบบ RNA real-time amplification และสามารถตรวจเชื้อไวรัสในกลุ่ม HR-HPV ได้ 5 ชนิด (16, 18, 31, 33, และ

45) ซึ่งวิธีนี้มีความจำเพาะที่สูงกว่าการตรวจ HPV DNA แต่อย่างไรตามการตรวจ HPV mRNA ยังต้องมีการใช้เครื่องมือราคาสูงในการตรวจ

5. การตรวจการแสดงออกของโปรตีน L1 ของเชื้อ Human papillomavirus และการตรวจโปรตีนของโฮสต์คือ p16 และ Ki67 โดยวิธี immunocyto/histostaining สำหรับการแปลผลโปรตีน Human papillomavirus L1 (Cytoactive) ดังนี้ ถ้าหากมีการตรวจพบ L1 จะสัมพันธ์กับเซลล์ในระดับ LSIL/CIN1 และจะสัมพันธ์กับการมีอัตราการกำจัดเซลล์ผิดปกติให้หายไปได้สูงถึงร้อยละ 72 เรียกว่า ภาวะ spontaneous regression สำหรับการตรวจโปรตีน p16/Ki67 (CINtec PLUS kit, Roche) พบว่าโปรตีน p16 จะพบสูงขึ้นในกรณีมีการติดเชื้อ HR-HPV และ สำหรับโปรตีน Ki67 เป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การตรวจพบโปรตีน p16/Ki67 เป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะการมีเซลล์ผิดปกติและการพบเซลล์มะเร็ง แต่สองการทดสอบนี้ยังไม่มีการนำมาใช้ในงานประจำในประเทศไทย [32, 33]
6. นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาการตรวจตัวบ่งชี้ทางชีวภาพหรือ Biomarker ต่างๆว่าเซลล์ปากมดลูกมีความผิดปกติการตรวจ methylation ของ tumor suppressor genes เช่น *TSLC1*, *RASSF1A*, *CDH1, RARB*, $p16^{INK4a}$ *DAPK, CADM1* [34-36] ได้รับการพัฒนาโดยใช้เทคนิคทางอณูวิทยา เช่น methylation specific conventional PCR หรือ real time PCR, sequencing และ pyrsequencing เป็นต้น การตรวจความผิดปกติของโครโมโซม (aneuploidy หรือ polyploidy) เช่น การเพิ่มขึ้นของโครโมโซมเช่น 1p, 1q, 3q, 5p, 5q, 6p, 8q and 5p หรือ การลดลงของโครโมโซมเช่น 2q, 3p, 4p, 11p, 17p and 19p [37-39] วิธีทางอณูวิทยามีราคาที่สูงไม่เหมาะสมกับประเทศกำลังพัฒนา ที่จะต้องตรวจกรองหรือวินิจฉัยในกลุ่มประชากรกลุ่มเป้าหมายทั้งหมด

ดังนั้นจึงควรพัฒนาวิธีตรวจกรองที่มีทั้งความไวและความจำเพาะและเหมาะสมกับประเทศกำลังพัฒนา ในการตรวจกรองผู้หญิงที่มีความเสี่ยงเป็นมะเร็งปากมดลูกดังที่กล่าวข้างต้น วิธีการตรวจเมธิลเลชั่นที่เกิดขึ้นทั้งเซลล์ของโฮตส์ (global DNA methylation) มีการศึกษาในมะเร็งชนิดต่างๆและพบความสัมพันธ์ในการเกิด global DNA hypomethylation กับภาวะการเป็นมะเร็ง [20] โดยตรวจยีนในกลุ่ม repetitive sequences เช่น LINE1, Alu, Satellite-alpha และ Satellite-2 ใช้วิธีทางอณูโมกุล เช่น real time methylation specific PCR, bisulfite sequencing PCR, combined bisulfite restriction analysis (COBRA) และ pyrosequencing เป็นต้น แต่วิธีทางอณูโมเลกุลเป็นวิธีที่มีราคาแพง ยังไม่สามารถนำมาใช้ในประเทศกำลังพัฒนาที่ต้องตรวจในกลุ่มประชากรผู้หญิงจำนวนมาก วิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีการที่ถูกพัฒนาเพื่อใช้ตรวจภาวะ global DNA methylation ที่จะถูกนำมาใช้ในการศึกษานี้เพื่อทำการตรวจกรองขั้นต้นเพื่อคัดแยกกลุ่มผู้หญิงที่มีความเสี่ยงสูงกับความเสี่ยงต่ำในการจะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก ตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกจากกลุ่มผู้หญิงที่มีการเชื้อ HPV และให้ผลลบต่อเชื้อ HPV จะถูกตรวจ global DNA methylation ทั้งหมด พร้อมทั้งนี้จะทำการตรวจยีน LINE1 methylation

ผลการตรวจโดย global DNA methylation โดยวิธี ELISA จะถูกเปรียบเทียบกับผล LINE1 methylation โดยวิธี pyrosequencing เพื่อประเมินการนำการตรวจ global DNA methylation มาใช้ในการตรวจกรองผู้หญิงที่มีความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งปากมดลูก

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น ด้านวิชาการ ด้านนโยบาย ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ด้านสังคมและชุมชน รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีที่ราคาถูกกว่าวิธีทางอณูวิทยาและทำได้สะดวกในห้องปฏิบัติการทั่วไปเพื่อตรวจกรองผู้หญิงที่มีภาวะเสี่ยงในการเป็นมะเร็งปากมดลูก โดยใช้ผลควบคู่กับผลการตรวจทางเซลล์วิทยา (Pap smear)

2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and method)

2.1 การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

ทำการศึกษานี้ ณ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึก อปร ชั้น 15 เป็นการศึกษาในประชากรชาวไทย ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างเซลล์ขูดปากมดลูกที่เหลือจากงานวิจัยเรื่อง การตรวจแอนติเจนของไวรัสแปปิโลมาอย่างรวดเร็วสำหรับพยากรณ์การเป็นมะเร็งปากมดลูกโดยใช้อนุภาคนาโนทองคำ (COA No.242/2012, IRB No.095/55) ตัวอย่างถูกเก็บในช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2557 ตัวอย่างเซลล์ขูดปากมดลูกที่เหลือจากงานประจำของหน่วยไวรัสวิทยา ฝ่ายจุลชีววิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ตัวอย่างที่ถูกจำแนกตามลักษณะเซลล์ทางพยาธิวิทยาเป็น normal, cervical intraepithelial lesion 1 (CIN1), CIN2, CIN3 และ carcinoma in situ (CIS) หรือ squamous cell carcinoma (SCC) โดยโครงการนี้ผ่านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ COA No. 087/2016

2.2 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอโดยน้ำยา Roche และ QIAGEN

2.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ขูดปากมดลูกโดยน้ำยา Roche

ตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่เก็บในน้ำยา Sure Path จะถูกแบ่งมาสกัด DNA โดยใช้น้ำยา High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) โดยนำเซลล์ปากมดลูกที่ปั่นเก็บใน PBS ปริมาตร 200 µl ที่ แล้วเติม จำนวน Binding buffer ปริมาตร 200 µl และ Proteinase K ปริมาตร 40 µl ใช้ autopipette ดูดขึ้นดูดลงหรือผสมให้เข้ากันดี โดย pulse-vortexing เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปแช่อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) 70°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนเย็นแล้วเติม isopropanol ปริมาตร 100 µl ลงในหลอดตัวอย่างผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปปั่นเพื่อให้หยดน้ำที่เกาะบนฝาตกลงมาที่ก้นหลอด ดูดส่วนผสมจากหลอดตัวอย่าง ใส่ใน High pure filter tube ที่วางอยู่บน collection tube ขนาด 2 ml ปิดฝาแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ filter tube ไปวางบน collection tube อันใหม่แล้วเติม Inhibotor Removal Buffer ปริมาตร 500 µl ลงใน filter tube แล้วนำมา ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา

1 นาที นำ filter tube ไปวางบน collection tube อันใหม่แล้วเติม Wash Buffer ปริมาตร 500 µl ลงใน filter tube แล้วนำมา ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาทีนำ filter tube ไปวางบน collection tube อันใหม่แล้วเติม Wash Buffer ปริมาตร 500 µl ลงใน filter tube อีกครั้งแล้วนำมา ปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาทีหลังจากนั้นดูดส่วนน้ำ (flow through)ที่อยู่ใน collection tube ทิ้งแล้วนำ filter tube ไปวางบน collection tube อันเก่าแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อกำจัดน้ำยา Wash buffer ที่ตกค้างอยู่ หลังจากนั้นนำ filter tube ไปวางอยู่บนหลอดพลาสติกอันใหม่ขนาด 1.5 ml แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 50 µl ปิดฝาแล้ววางที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่ต้องการ นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเก็บที่ -20 หรือ -80°C.

2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ปากมดลูกโดยน้ำยา QIAGEN

ใช้น้ำยา AllprepDNA/RNA(QIAGEN) โดยเติม buffer RTL plus จำนวน 350 ul ใช้ autopipette ดูดขึ้นดูดลงจนเซลล์ละลายถูกย่อยหมด ทำการปั่น 3 นาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm แล้วดูดส่วน supernatant มาใส่ใน AllPrep DNA spin column ที่วางบน 2 ml collection tube แล้ว แล้วปิดฝา นำมาปั่น 30 วินาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm ส่วน flowthrough เป็นส่วนที่จะนำไปสกัด RNA ต่อ หลังจากนั้นเติม Buffer AW1 500 µl ใส่ใน AllPrep DNA spin column ที่วางบน 2 ml collection tube อันใหม่ แล้วปั่น 15 วินาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm ทิ้ง flowthrough แล้วเติม Buffer AW2 500 µl ใส่ใน AllPrep DNA spin column ที่วางบน 2 ml collection tube อันเก่า แล้วปั่น 2 นาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm แล้วนำ AllPrep DNA spin column ไปวางบนหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml อันใหม่แล้วเติม Buffer EB 100 ul แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาทีแล้วนำมาปั่น 1 นาที ที่รอบสูงสุด 10,000 rpm เพื่อล้างเอาดีเอ็นเอออกมาแล้วนำดีเอ็นเอไปเก็บที่ -20 °C หรือ -70°C

2.3 การตรวจ Global DNA methylation โดยวิธี Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

ผสมดีเอ็นเอ 100 ng กับ 5-Mc Coating buffer ให้ได้ปริมาตร 100 µl ในหลอดทดลองขนาด 200 µl แล้วนำมาทำให้ดีเอ็นสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยวโดยวางไว้ที่ 98°C เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่อง thermal cycler หลังจากนั้นวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที แล้วดูด denatured DNAs มาใส่ well strip ปิดด้วยแผ่น foil และนำไปวางที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม ขั้นตอนนี้เป็นการ coat denatured single stranded DNA ให้อยู่บนหลุมเพลท หลังจากนั้นดูด buffer ออกจากหลุม แล้วล้างด้วย 5-mC ELISA Buffer สามครั้ง ครั้งละ 200 µl หลังจากนั้นเติม 5-mC ELISA Buffer ปริมาตร 200 µl ในทุกหลุมแล้วปิดด้วย foil นำไปวางที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูด Buffer ออกจากทุกหลุม ทำการเตรียมแอนติบอดีสองชนิดผสมกัน คือ anti-5-Methylacytosine (1:2,000) และ secondary antibody (1:1,000) (ใส่ anti-5-Methylacytosine monoclonal antibody 1 µl และ HRP-conjugated secondary antibody 2 µl ใน 5-mC ELISA Buffer 2,000 µl) แล้วเติมแอนติบอดีที่ผสมแล้วทั้งสองชนิดปริมาตร 100 µl ในทุกหลุมแล้วปิดด้วย foil นำไปวางที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม หลังจากนั้นดูด Buffer ออกจากทุกหลุมแล้วล้างด้วย 5-mC ELISA Buffer สามครั้ง ครั้งละ 200 µl แล้วเติม HRP Developer ปริมาตร 100 µl ในทุกหลุม แล้วรอเวลาให้เกิดการเกิดสีประมาณ

40 นาที แล้วนำไปวัด OD ที่ 405 nm โดยใช้ ELISA plate reader ร้อยละของการเกิด methylation ถูกตรวจโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้สมการคือ

$$y = a \ln(x)+b$$

y=absorbance

a= slope

b=y-intercept

x= percentage of methylation

$$\% \text{ 5-mC}=e^{\left\{\frac{\text{Absorbance-y-intercept}}{\text{slope}}\right\}}$$

2.4 การตรวจ Global DNA methylation โดยวิธี Pyrosequencing

เป็นการตรวจ methylation ที่ได้ค่าเป็นร้อยละของ methylated CpG ตรงตำแหน่งที่ต้องการตรวจ ผู้ทำการทดสอบจะทำการตรวจยีน LINE1 methylation โดยวิธี Pyrosequencing

ทำการเปลี่ยนแปลงสภาพของ DNA โดยน้ำยา EZ DNA Methylation-Gold Kit มีหลักการดังนี้ เมื่อเติม sodium bisulfite ในกรณี unmehylated cytosine จะเปลี่ยนเป็น uracil ในขณะที่ methylated cytosine จะไม่เปลี่ยนแปลงยังคงสภาพเป็น cytosine นำ modified DNA ที่ได้ไปเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะใช้ ขั้นตอนการทำ polymerase chain reaction (PCR) โดยนำ modified DNA มาทำการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ไพร์เมอร์ที่ใช้มีดังนี้ forward และ reverse primers ได้แก่ FW: 5'- TTTTGAGTTAGGTGTGTGGGA TATA-3' และ RV: Biotin-5′- AAAATCAAAAAATTCCCTTTC-3' (150 bp) ตามลำดับ Sequencing primer และ sequence to analyze คือ 5′- AGTTAGGTGTGGGATATAGT-3 and TTYGTGGTGYGTYGTTTTTTAAGTYGGTTTGAAAAGYGTA ตามลำดับ [40] แล้วนำ amplified products ที่ได้มาทำ electrophoresis ที่ 1.5% agarose gel โดยหลังจากทำการเพิ่มจำนวนยีน LINE1 โดยวิธี PCR แล้วนำ biotinylated PCR products ปริมาตร 20 µl มาผสมกับ Streptavidin Sepharose beads 2 µl สาร binding buffer 40 µl และ น้ำ Milli-Q 18.2 MΩ·cm โดยผสมให้ได้ปริมาตรสุดท้ายคือ 80 µl ใน 96 wells plate ขนาด 200 µl แล้วนำมาเขย่าที่ 1,400 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำมาที่บริเวณ vacuum prep workstation เปิดสวิชต์ Vacuum pump ที่ต่อกับ filter probe นำ filter probe มาล้างใน high purity water แล้วนำมาดูด Biotinylated PCR products/Streptavidin-coated Sepharose beads ที่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 200 µl เพื่อให้ beads ถูกจับตรง filter เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปล้างใน 70% ethanol เป็นเวลา 5 วินาที แล้วนำไปล้างใน denaturation solution เป็นเวลา 5 วินาที แล้วนำไปล้างใน washing buffer เป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นยก filter probe ขึ้นแล้วจับในแนวมุมตั้งฉาก 90° เพื่อให้สารน้ำไหลออกให้หมด แล้วปิด vacuum pump แล้วนำ filter probe ไปผสมกับ annealing buffer 25 µl ที่มี sequencing primer เข้มข้น 0.4 µM บน 96 flat plate หลังจากนั้นนำ 96 flat plate ไป incubate ที่ 80°C เป็นเวลา 2 นาที และวางที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แล้วนำไปวางในเครื่อง PyroMark™ Q96 instrument ในขณะเดียวกันนำ

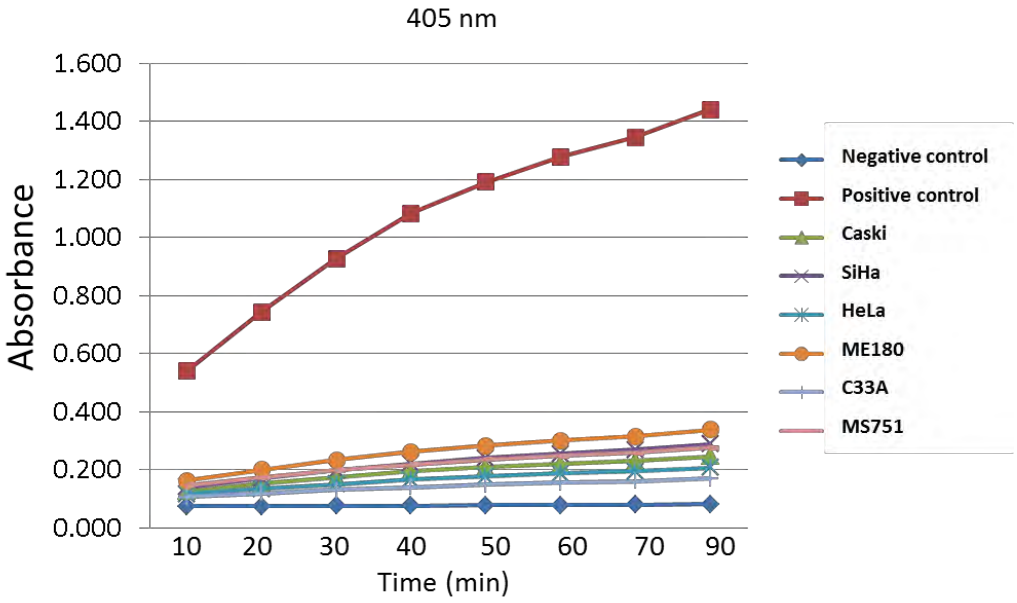
Cartridge ที่มี enzyme, substrate และ นิวคลีโอไทด์ A, T, C และ G ใส่เข้าไปในเครื่อง PyroMark™ Q96 instrument และกด Run หลังจากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม PyroMark™ Q96 Software

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้สถิติ

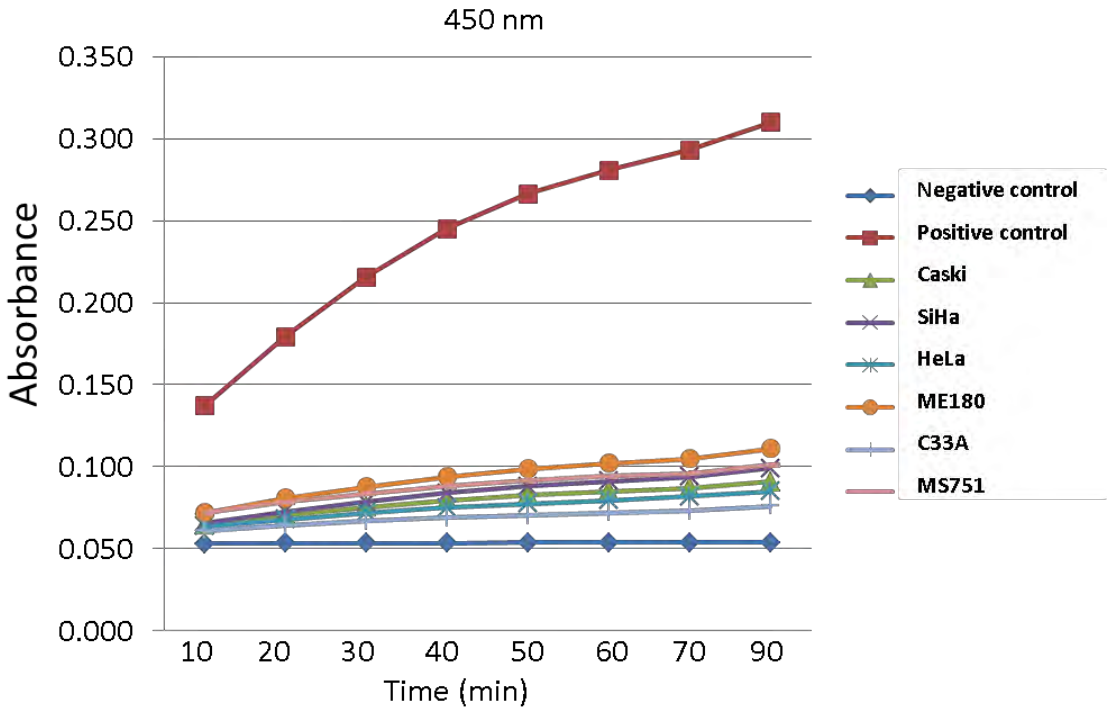
ใช้สถิติ Kruskal wallis test หรือ One way ANOVA ดูความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละของการเกิด global DNA methylation ที่พบในตัวอย่างที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 หาค่าความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจเป็นร้อยละของการเกิด global methylation ระหว่างวิธี ELISA และ pyrosequencing พร้อมทั้งหาค่าความไวและความจำเพาะจาก cut off ค่าต่างๆ ที่ได้จากทั้งสองวิธี โดยสถิติ receiver operating characteristic (ROC)

3. ผลการวิจัย (Results)

3.1 หาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งปากมดลูกชนิดต่างๆได้แก่ Caski(600 copies of HPV16), SiHa(1-2 copy of HPV16), HeLa (HPV18 positive), ME180(HPV39), MS751 (HPV45), C33A (HPV negative) และดีเอ็นเอที่สกัดจากเม็ดเลือดขาวคนปกติ พร้อมด้วยดีเอ็นเอควบคุมผลบวกที่มีภาวะ methylation ร้อยละ 100 และดีเอ็นเอควบคุมผลลบที่ไม่มีภาวะ methylation มาทำการตรวจภาวะ global methylation โดยวิธี ELISA โดยใช้ 5-mC DNA ELISA kit โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 405 nM และ 450 nM ที่เวลา 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 90 นาที ผลแสดงดังรูปที่ 1 และ 2 โดยรูปที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm และรูปที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า 450 nm และให้ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง positive control ที่มีการเกิด methylation ร้อยละ 100 อยู่ในช่วง 0.9-1.0 ที่เวลา 30-40 นาที และตัวอย่าง negative control ที่ไม่มีการเกิด methylation ก็มีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.1 ในทุกช่วงเวลา จึงทำการเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm และเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสง ณ เวลา 40 นาที

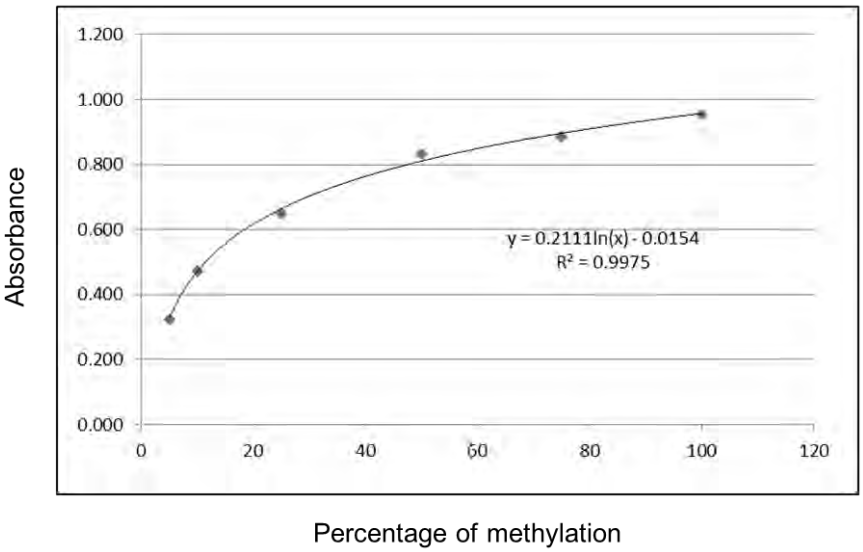


รูปที่ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm



รูปที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

3.2 การคำนวณหาร้อยละของ methylation จากกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการหาค่า global methylation โดยจะทำกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่มีการทดสอบทำ ELISA โดยใช้ความเข้มข้นของ methylation คือ ร้อยละ 0 ร้อยละ 5 ร้อยละ 10 ร้อยละ 25 ร้อยละ 50 ร้อยละ 75 ร้อยละ 100 พบว่า ค่า R-squared มีค่ามากกว่า 0.9 ในทุกครั้งที่ทำการทดสอบรูปที่ 3 เป็นตัวอย่างกราฟมาตรฐาน ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการหาค่าร้อยละของการเกิดภาวะ global methylation ในตัวอย่างได้ตามสมการที่กล่าวในวิธีทำ



รูปที่ 3 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานและสมการที่ใช้ในการคำนวณหาร้อยละการเกิดภาวะ methylation โดยวิธี ELISA

3.3 ภาวะ global methylation ในเซล์มะเร็งเพาะเลี้ยงตรวจโดยวิธี ELISA และ pyrosequencing

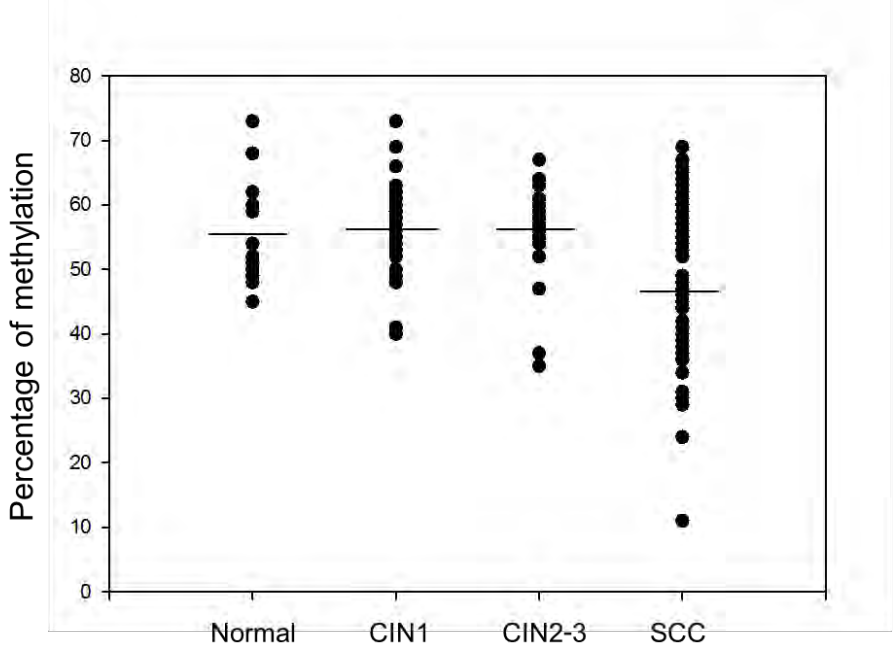
โดยวิธี ELISA พบค่า global methylation ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆได้ค่าร้อยละดังนี้ Caski คือ 3.72 SiHa คือ 1.74 HeLa คือ 2.42 ME180 คือ 4.79 MS751 คือ 5.09 และ C33A คือ 1.47 และจากเม็ดเลือดขาวจากคนปกติได้ค่าเฉลี่ย คือ 8.20 โดยวิธี ELISA

ผลการตรวจ global methylation ซึ่งตรวจยีน LINE1 โดยวิธี pyrosequencing ได้ค่าดังนี้ Caski ร้อยละ 45 SiHa ร้อยละ 35 และเม็ดเลือดขาวจากคนปกติได้ค่าคือ ร้อยละ 62

3.4 ผลการตรวจภาวะ global methylation ในตัวอย่างโดยวิธี ELISA และ pyrosequencing

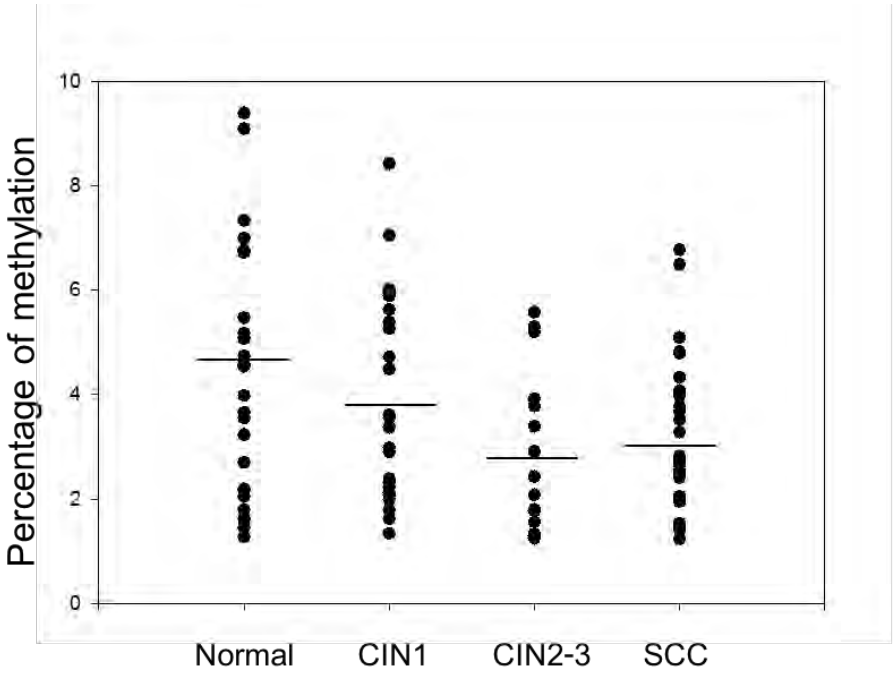
ตัวอย่างที่มีความผิดปกติระดับต่างๆ 280 ตัวอย่าง จำแนกตามลักษณะเซลล์ทางเซลล์วิทยาเป็น Normal 36 ตัวอย่าง และทางพยาธิวิทยาดังนี้ CIN 1 115 ตัวอย่าง, CIN 2-CIN 3 39 ตัวอย่าง และ CIS/SCC 90 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่นำมาทำ pyrosequencing ทั้งหมด 161 ตัวอย่างและมีตัวอย่างที่นำมาทำ ELISA ทั้งหมด 257 ตัวอย่างแต่ตัวอย่างที่ให้ผลการทำ ELISA มีค่าต่ำกว่า 0.100 จะไม่ถูกนำมาคำนวณ ดังนั้นจึงมีตัวอย่างที่มีคุณภาพสามารถนำมาคำนวณผล ELISA คือ 100 ตัวอย่าง

3.4.1 ผลการตรวจ global methylation โดยวิธี pyrosequencingในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูก 161 ตัอย่าง ที่มีผลการตรวจทางชิ้นเนื้อวิทยาที่ระดับความผิดปกติต่างๆได้ค่าดังนี้ Normal ร้อยละ 55.6 CIN1 ร้อยละ 56.8 CIN2-3 ร้อยละ 57.3 และ SCC ร้อยละ 48.8 ซึ่งจากการหาค่าทางสถิติพบว่าเฉลี่ยของมะเร็งมีความแตกต่างกับระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.001, Kruskal wallis) ดังรูปที่ 4



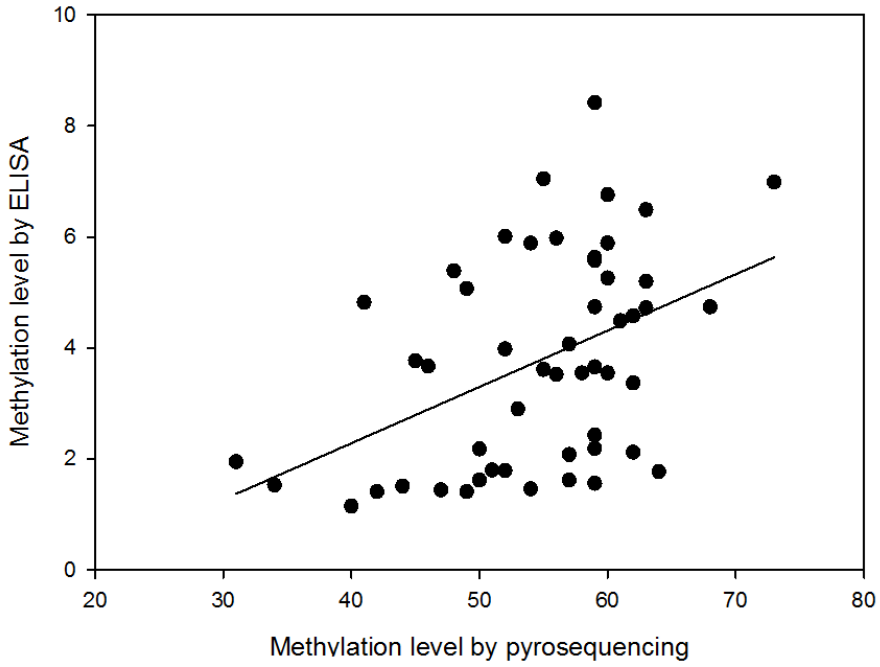
รูปที่ 4 ผลการตรวจ global methylation (LINE1) โดยวิธี pyrosequencing ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูก 161 ตัอย่าง ($p<0.05$ (Kruskal wallis))

3.4.2 ผลการตรวจ global methylation โดยวิธี ELISA ใน 257 ตัวอย่างพบตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่สามารถนำมาคำนวณผลได้ 100 ตัวอย่าง มีค่าร้อยละ ดังนี้ Normal คือ 4.50 (28 ตัวอย่าง) CIN1 คือ 3.83 (27 ตัวอย่าง) CIN2-3 คือ 2.83 (16 ตัวอย่าง) และ SCC คือ 3.03 (29 ตัวอย่าง) ซึ่งจากการหาค่าทางสถิติพบว่าเฉลี่ยของมะเร็งมีความแตกต่างกับระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.040$, Kruskal wallis) ดังรูปที่ 5



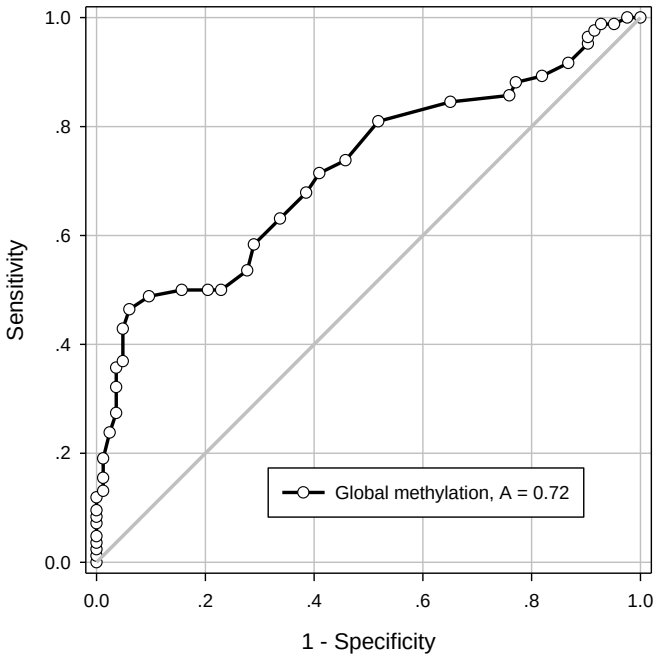
รูปที่ 5 ผลการตรวจ global methylation โดยวิธี ELISA ในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูก 100 ตัอย่าง ($p<0.05$, (Kruskal wallis))

3.5 การหาค่าความสัมพันธ์ของผลการตรวจ global methylation ระหว่างวิธี pyrosequencing กับวิธี ELISA พบว่าผลที่ได้จากทั้งสองวิธีมีค่าสัมพันธ์กันระดับปานกลางมีค่า R-square เท่ากับ 0.4402 ดังรูปที่ 6

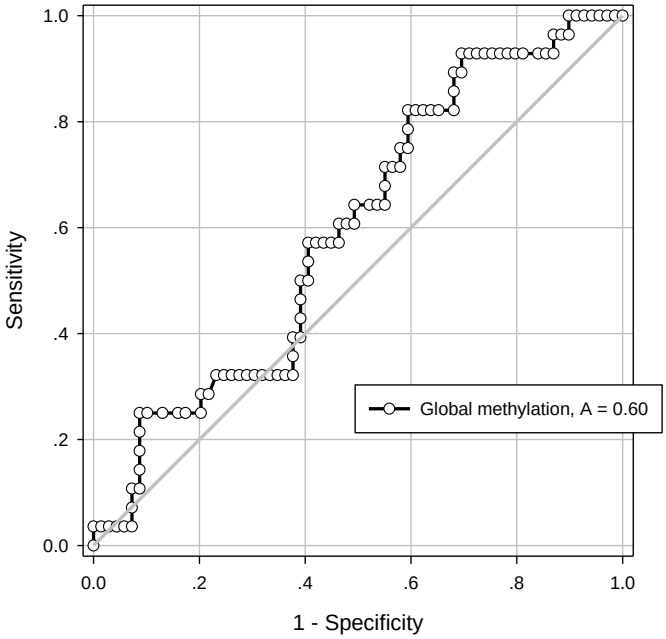


รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า global methylation ระหว่างวิธี pyrosequencing กับวิธี ELISA

3.6 หาค่าความไวและความจำเพาะในการใช้การตรวจ global DNA methylation เป็นตัวบ่งชี้วัดการมีเซลล์ผิดปกติระดับ CIN3+ พบว่าโดยวิธี pyrosequencing ที่ global DNA methylation ที่ cut off ที่ระดับร้อยละ 30-45 จะมีความจำเพาะที่สูงอยู่ในช่วงร้อยละ 95 ถึง 100 แต่มีความไวที่ต่ำ ดังแสดงตามตารางที่ 1 และมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 0.72 (รูปที่ 7) สำหรับวิธี ELISA พบว่าที่ cut off ที่ระดับ 1.5-2.0 จะมีความจำเพาะที่สูงอยู่ในช่วงร้อยละ 78 ถึง 91 แต่มีความไวที่ต่ำดังแสดงตามตารางที่ 2 และมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 0.60 (รูปที่ 8)



รูปที่ 7 กราฟ Receiver operating characteristic (ROC) แสดงค่าความไว ความจำเพาะและพื้นที่ใต้กราฟของการตรวจ global methylation โดยวิธี pyrosequencing



รูปที่ 8 กราฟ Receiver operating characteristic (ROC) แสดงค่าความไว ความจำเพาะและพื้นที่ใต้กราฟของการตรวจ global methylation โดยวิธี ELISA

ตารางที่ 1 แสดงค่าความไว ความจำเพาะของการตรวจ global methylation โดยวิธี pyrosequencing ที่ค่าต่างๆ กัน

Cut off	30%		35%		40%		45%	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
%	4.76	100	9.52	100	23.81	97.59	36.9	95.18
Cut off	50%		55%		60%		65%	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
%	50	79.52	67.86	61.45	85.71	24.1	96.43	9.63

ตารางที่ 2 แสดงค่าความไว ความจำเพาะของการตรวจ global methylation โดย วิธี ELISA ที่ค่าต่างๆ กัน

Cut off	1.5%		2.0%		2.5%		3.0%	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
%	17.86	91.3	28.57	78.26	42.86	60.87	57.14	56.62
Cut off	3.5%		4.0%		4.5%		5.0%	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
%	64.29	50.72	75.0	42.03	82.14	39.13	89.29	31.88

4. อภิปรายผลการวิจัย (Discussion)

การทดลองเป็นไปตามสมมติฐานที่พบภาวะ global DNA hypomethylation ในตัวอย่างมะเร็งส่วนมากเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ โดยแสดงผลทั้งการตรวจ LINE1 pyrosequencing และ ELISA การศึกษาของเราโดย LINE1 pyrosequencing ที่พบในมะเร็งปากมดลูกเฉลี่ยร้อยละ 49.5 และในเซลล์ปากมดลูกปกติเฉลี่ยร้อยละ 55.0 ซึ่งสอดคล้องกับผลการการศึกษาของ Stacey N. Akers และคณะ ศึกษา LINE1 methylation ในตัวอย่าง ovarian cancer โดยวิธี bisulfite pyrosequencing พบว่าในกลุ่ม epithelial ovarian cancer พบภาวะ hypomethylation เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal ovarian surface epithelia โดยค่าเฉลี่ย LINE1 methylation ใน ovarian cancer คือร้อยละ 57.1 และใน normal ovarian คือ 72.5 [41]

การศึกษาของ Omid Fotouhi และคณะ พบ LINE1 methylation ใน Small intestinal neuroendocrine tumors คือร้อยละ 65.0 และในเซลล์ปกติพบร้อยละ 75.0 และโดย ELISA ในมะเร็งพบค่า methylation index เฉลี่ยร้อยละ 1.1 และในเซลล์ลำไส้ปกติมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 1.2 ซึ่งพบเป็น hypomethylation ในเซลล์มะเร็งลำไส้ [42] การศึกษาของ Jean-Philippe Foy และคณะ พบว่าในมะเร็งชช่องปากมีภาวะ hypomethylation เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เป็นมะเร็งช่องปาก [43] การศึกษาในมะเร็ง bladder, colon, pancreas, prostate และ stomach cancers พบภาวะ hypomethylation ในยีน LINE1 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ[44] สำหรับการศึกษาในมะเร็งปากมดลูกโดยใช้เทคนิค high-performance capillary electrophoresis (HPCE) พบภาวะ hypomethylation ในเซลล์มะเร็งโดยพบในมะเร็งปากมดลูกเฉลี่ยร้อยละ 2.81 และพบในกลุ่ม normal, LSIL และ HSIL เท่ากับร้อยละ 3.26, 3.37 และ 3.22 ตามลำดับ [26]

5. สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาเทคนิค ELISA ปัญหาที่พบคือดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ปากมดลูกมีปริมาณน้อย ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทำ ELISA ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำน้อยกว่า 0.100 ในตัวอย่างจำนวนมาก และค่า global methylation ในตัวอย่างที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 0.100 ก็มีค่าที่น้อยกว่าค่าที่ได้จากการทำ bisulfite LINE1 pyrosequencing มาก ซึ่งเทคนิค ELISA เป็น non amplification assay ซึ่งมีความไวที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค bisulfite LINE1 pyrosequencing คาดว่าอาจเกิดจากมีสารใน elution buffer ที่ใช้ในการเก็บ DNA ที่มีผลต่อการจับของดีเอ็นเอบนพื้นผิว ELISA plate ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอควบคุมที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐานที่มากับชุดการทดสอบที่สามารถจับบนพื้นผิว ELISA plate ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยดูจากค่าการดูดกลืนแสง

สิ่งที่จะทำต่อไปในปีที่สอง คือหาวิธีการที่จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจับของดีเอ็นเอจากตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกกับพื้นผิวของ ELISA plate ให้เพิ่มขึ้นโดยใช้ elution buffer ที่ไม่มีผลยับยั้งการจับของดีเอ็นเอบนพื้นผิวและจะพัฒนาเทคนิค ELISA โดยใช้ระบบ signal amplification assay เช่น tyramide signal amplification system เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจเทคนิค ELISA ที่เป็น non amplification assay และจะพัฒนาการอ่านผลให้สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าโดยดูการเปลี่ยนแปลงสีเช่น จากสีเหลือง เป็นสีฟ้า โดยใช้เทคโนโลยี glod particle เพื่อความสะดวกและง่ายในการอ่านผลในพื้นที่ที่ไม่มีเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

References

1. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10.

2. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst. 1995 Jun 7;87(11):796-802.

3. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.

4. Gnanamony M, Peedicayil A, Abraham P. An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. Indian J Med Microbiol. 2007 Jan;25(1):10-7.

5. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. Kobe J Med Sci. 2004 Jan;50(1-2):9-19.

6. Sukasem C, Pairoj W, Saekang N, Pombubpha H, Srichunrasami C, Pongtippan A, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus genotype in women with high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer: Will a quadrivalent vaccine be necessary in Thailand? J Med Virol. 2011 Jan;83(1):119-26.

7. Chen CA, Liu CY, Chou HH, Chou CY, Ho CM, Twu NF, et al. The distribution and differential risks of human papillomavirus genotypes in cervical preinvasive lesions: A Taiwan Cooperative Oncologic Group Study. Int J Gynecol Cancer. 2006 Sep-Oct;16(5):1801-8.

8. Inoue M, Sakaguchi J, Sasagawa T, Tango M. The evaluation of human papillomavirus DNA testing in primary screening for cervical lesions in a large Japanese population. International Journal of Gynecological Cancer. 2006 May-Jun;16(3):1007-13.

9. Chan PK, Li WH, Chan MY, Ma WL, Cheung JL, Cheng AF. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Chinese women with cervical cancer and precancerous lesions. J Med Virol. 1999 Oct;59(2):232-8.

10. Hwang T. Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of Korean women. J Korean Med Sci. 1999 Dec;14(6):593-9.

11. Doeberitz MK, Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. Arch Med Res. 2009 Aug;40(6):435-42.

12. Bhattarakosol P, Poonnaniti A, Niruthisard S. Detection and typing of human papillomavirus in cervical cancer in the Thai. J Med Assoc Thai. 1996 Dec;79 Suppl 1:S56-64.

13. Bhattarakosol P, Lertworapreecha M, Kitkumthorn N, Triratanachai S, Niruthisard S. Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women. J Med Assoc Thai. 2002 Jun;85 Suppl 1:S360-5.

14. Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. Oncogene. 2001 Nov 26;20(54):7888-98.

15. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. Oncogene. 2001 Nov 26;20(54):7874-87.

16. Kabsch K, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. J Virol. 2002 Dec;76(23):12162-72.

17. Fehrmann F, Klumpp DJ, Laimins LA. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. J Virol. 2003 Mar;77(5):2819-31.

18. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nat Rev Cancer. 2007 Jan;7(1):11-22.

19. [cited 2008 1 December]; Available from: www.hpv-thailand.com

20. Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, et al. The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. PLoS One. 2014;9(9):e106290.

21. Wu HC, John EM, Ferris JS, Keegan TH, Chung WK, Andrulis I, et al. Global DNA methylation levels in girls with and without a family history of breast cancer. Epigenetics. 2011 Jan;6(1):29-33.

22. Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, et al. DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. Cancer Res. 2008 Nov 1;68(21):8954-67.

23. Choi SH, Worswick S, Byun HM, Shear T, Soussa JC, Wolff EM, et al. Changes in DNA methylation of tandem DNA repeats are different from interspersed repeats in cancer. Int J Cancer. 2009 Aug 1;125(3):723-9.

24. Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. Jpn J Clin Oncol. 2000 Jul;30(7):306-9.

25. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, San Jose-Eneriz E, et al. Repetitive DNA hypomethylation in the advanced phase of chronic myeloid leukemia. Leuk Res. 2008 Mar;32(3):487-90.

26. Missaoui N, Hmissa S, Dante R, Frappart L. Global DNA methylation in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. Asian Pac J Cancer Prev. 2010;11(6):1741-4.

27. Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. PLoS One. 2011;6(9):e24451.

28. Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, et al. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. Int J Cancer. 2013 May 1;132(9):2087-94.

29. Shuangshoti S, Hourpai N, Pumsuk U, Mutirangura A. Line-1 hypomethylation in multistage carcinogenesis of the uterine cervix. Asian Pac J Cancer Prev. 2007 Apr-Jun;8(2):307-9.

30. Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, et al. A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. Br J Cancer. 2000 Sep;83(5):561-5.

31. Ratnam S, Franco EL, Ferenczy A. Human papillomavirus testing for primary screening of cervical cancer precursors. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000 Sep;9(9):945-51.

32. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. Clin Cancer Res. 2012 Aug 1;18(15):4154-62.

33. Dona MG, Vocaturo A, Giuliani M, Ronchetti L, Rollo F, Pescarmona E, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. Gynecol Oncol. 2012 Aug;126(2):198-202.

34. Lai HC, Lin YW, Chang CC, Wang HC, Chu TW, Yu MH, et al. Hypermethylation of two consecutive tumor suppressor genes, BLU and RASSF1A, located at 3p21.3 in cervical neoplasias. Gynecol Oncol. 2007 Mar;104(3):629-35.

35. Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, Villella J, et al. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. Mol Cancer. 2003 May 13;2:24.

36. Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. Clin Cancer Res. 2001 Jul;7(7):1982-6.

37. Peter M, Stransky N, Couturier J, Hupe P, Barillot E, de Cremoux P, et al. Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. J Pathol. 2010 Jul;221(3):320-30.

38. Huang FY, Kwok YK, Lau ET, Tang MH, Ng TY, Ngan HY. Genetic abnormalities and HPV status in cervical and vulvar squamous cell carcinomas. Cancer Genet Cytogenet. 2005 Feb;157(1):42-8.

39. Dasgupta S, Chakraborty SB, Roy A, Roychowdhury S, Panda CK. Differential deletions of chromosome 3p are associated with the development of uterine cervical carcinoma in Indian patients. Mol Pathol. 2003 Oct;56(5):263-9.

40. Delaney C, Garg SK, Yung R. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. Methods Mol Biol. 2015;1343:249-64.

41. Akers SN, Moysich K, Zhang W, Collamat Lai G, Miller A, Lele S, et al. LINE1 and Alu repetitive element DNA methylation in tumors and white blood cells from epithelial ovarian cancer patients. Gynecol Oncol. 2014 Feb;132(2):462-7.

42. Fotouhi O, Adel Fahmideh M, Kjellman M, Sulaiman L, Hoog A, Zedenius J, et al. Global hypomethylation and promoter methylation in small intestinal neuroendocrine tumors: An in vivo and in vitro study. Epigenetics. 2014 Jul 1;9(7):987-97.

43. Foy JP, Pickering CR, Papadimitrakopoulou VA, Jelinek J, Lin SH, William WN, Jr., et al. New DNA methylation markers and global DNA hypomethylation are associated with oral cancer development. Cancer Prev Res (Phila). 2015 Nov;8(11):1027-35.

44. Nusgen N, Goering W, Dauksa A, Biswas A, Jamil MA, Dimitriou I, et al. Inter-locus as well as intra-locus heterogeneity in LINE-1 promoter methylation in common human cancers suggests selective demethylation pressure at specific CpGs. Clin Epigenetics. 2015;7:17.

ส่วน ค : ประวัติคณะผู้วิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นาย อาคม ไชยวงศ์คต

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Arkom Chaiwongkot

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3470800023286

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** นักวิจัย

   เงินเดือน (บาท) 35,452

   เวลาที่ใช้ทำวิจัย (32 ชั่วโมง : สัปดาห์)

4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์**

   หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ชั้น 16 ตึก อปร คณะแพทยศาสตร์

   จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถ.พระราม 4 ปทุมวัน กทม 10330

   0880263294 Fax 022525952

   อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) aeyoo20@yahoo.com, Arkom.Cha@chula.ac.th

5. **ประวัติการศึกษา**

   2546 ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

   2550 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
   คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

   2555 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
   คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การฝึกอบรม ดูงาน ปฏิบัติการวิจัย

พ.ศ. 2552-2554 ระหว่างศึกษาระดับปริญญาเอก ดูงานและปฏิบัติการวิจัย เรื่อง Human Papillomavirus induced cervical carcinogenesis ที่ Department of Applied Tumor Biology, Institute of Pathology, Faculty of Medicine, Heidelberg University, Heidelberg ประเทศเยอรมันนี ภายใต้การควบคุมโดย Prof. Magnus von Knebel Doeberitz และ Dr. Svetlana Vinokurova ได้รับทุนสนับสนุนจาก Prof. Magnus von Knebel Doeberitz

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**

   การพัฒนาวิธีการตรวจตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) ในการวินิจฉัยโรคมะเร็ง และ สาขาวิชาไวรัสวิทยา

7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย**

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย ไม่มี

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย ไม่มี

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

1. Aromseree S, Pientong C, Swangphon P, **Chaiwongkot A**, Patarapadungkit N, Kleebkaow P, Tungsiriwattana T, Kongyingyoes B, Vendrig T, Middeldorp JM, Ekalaksananan T. Possible contributing role of Epstein-Barr virus (EBV) as a cofactor in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. J Clin Virol. 2015 Dec;73:70-6.

2. Aromseree S, **Chaiwongkot A**, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Patarapadungkit N, Pientong C.The three most common human papillomavirus oncogenic types and their integration state in Thai women with cervical precancerous lesions and carcinomas.
J Med Virol. 2014 Nov;86(11):1911-9

3.**Chaiwongkot A**, Pientong C, Ekalaksananan T, Vinokurova S, Kongyingyoes B, Chumworathayi B, Patarapadungkit N, Siriaunkgul S, von Knebel Doeberitz M.
Detection of the human papillomavirus 58 physical state using the amplification of papillomavirus oncogene transcripts assay.*J Virol Methods*. 2013 May;189(2):290-8

4.Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, Chumworathayi B, Patarapadungkit N, Reuschenbach M, von Knebel Doeberitz M.
Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer*. 2013 May 1;132(9):2087-94.

5. Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingyoes B, **Chaiwongkot A,** Yuenyao P, Kleebkaow P, Kritpetcharat O, Evans MF. Combined p16INK4a and human papillomavirus testing improves the prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN II-III) in Thai patients with low-grade cytological abnormalities. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(7):1777-83.

6. Ekalaksananan T, Pientong C, Thinkhamrop J, Kongyingyoes B, Evans MF, **Chaiwongkot A**. Cervical cancer screening in north east Thailand using the visual inspection with acetic acid (VIA) test and its relationship to high-risk human papillomavirus (HR-HPV) status.
J Obstet Gynaecol Res. 2010 Oct;36(5):1037-43.

7. Chaiwongkot A, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Thinkhamrop J, Yuenyao P, Sriamporn S. Evaluation of primers and PCR performance on HPV DNA screening in normal and low grade abnormal cervical cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007 Apr-Jun;8(2):279-82.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของยีน L1 ของไวรัสแปปิโลมาทัยป์ 16 และความเป็นไปได้ในการเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อพยากรณ์การดำเนินโรคของมะเร็งปากมดลูก

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) HPV-16 L1 gene modification and their biomarker potential for prediction of cervical cancer progression

แหล่งทุน กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

สถานภาพ เป็นนักวิจัย ทำงานวิจัยลุล่วงไปแล้วร้อยละ 100 อยู่ในช่วงการส่งตีพิมพ์

ส่วน ค : ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ส่วน ค : ประวัติคณะผู้วิจัย

1. **ชื่อ (ภาษาไทย)** นางสาว ภาวพันธ์ ภัทรโกศล
   ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Miss Parvapan Bhattarakosol
2. **เลขหมายประจำตัวประชาชน** 3 1009 03215 20 2
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** รองศาสตราจารย์ระดับ 9
   เงินเดือน (บาท) 57,310
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย (ชั่วโมง : สัปดาห์) 5 ชั่วโมง/สัปดาห์
4. **หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร**
   ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330
   โทรศัพท์ 0-2256-4132 ต่อ 616 โทรสาร 0-2252-5952
   อีเล็กทรอนิกส์ (e-mail) parvapan@chula.ac.th
5. **ประวัติการศึกษา**

พ.ศ. 2524 ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับสอง
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

พ.ศ. 2527 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ

พ.ศ. 2533 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพ

การฝึกอบรม ดูงาน ปฏิบัติการวิจัย

พ.ศ. 2537 ประกาศนียบัตรอบรม International Training Course of Basic Procedure in Medical Virology ที่ School of Medicine Nagoya University ประเทศญี่ปุ่นจัดโดย International Cell Research Organization (an Affiliated organization of UNESCO) in collaboration with Nagoya University

พ.ศ. 2538 ดูงานและปฏิบัติการวิจัย เรื่อง Signal transduction by oncogene that encode tyrosine kinase ที่ Department of Molecular Pathogenesis, School of Medicine Nagoya

University ประเทศญี่ปุ่น ได้รับทุนสนับสนุนจาก Scientific Co-operation NRCT-JSPS Program

พ.ศ. 2540 ดูงานและปฏิบัติการวิจัย เรื่อง Tyrosine kinase protein prepared from Baculovirus expression system ที่ Department of Molecular Pathogenesis, School of Medicine Nagoya University ประเทศญี่ปุ่น ได้รับทุนสนับสนุนจาก Scientific Co-operation NRCT-JSPS Program

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

สาขาวิชาไวรัสวิทยา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวนการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย ไม่มี

7.2. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

พ.ศ. 2535 Detection of human papillomavirus types in invasive cervical carcinoma by means of polymerase chain reaction and hybridization
ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538 Detection and typing of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) gr I-III compared to normal cervical tissue
ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2541 Seroprevalence of anti-human herpesvirus-6 IgG antibody in children ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2542 Immunosuppression of T-lymphocytes induced by herpes simplex virus (HSV) ทุนมูลนิธิกระจกอาซาฮี ประเทศญี่ปุ่น

พ.ศ. 2543 โครงการพัฒนาการตรวจจุลชีพที่เจริญยากหรือช้าด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล การตรวจวิเคราะห์โรคติดเชื้อไซโตเมกาโลไวรัส เงินทุนเสริมรากฐานการวิจัย การพัฒนางานวิจัยเพื่อเป็นงานประจำ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2544 Screening for acyclovir-resistant herpes simplex virus (ACV^r HSV)
ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2545 Molecular epidemiology of herpes simplex virus by restriction fragment length polymorphism (RFLP)
ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2547 การจำแนกไทป์ของไซโตเมกาโลไวรัสจากยีนไกลโคโปรตีนบีในตัวอย่างส่งตรวจที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยวิธี PCR-RFLP

ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2547-8 Comparison of Herpes Simplex Virus (HSV) Replication and HveA Expression in T-lymphocytes from Healthy Individuals and HIV Infected Patients ทุนมูลนิธิกระจกอาซาฮี ประเทศญี่ปุ่น

พ.ศ. 2548-9 อัตราการติดต่อเชื้อไซโตเมกาโลไวรัสและไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กซ์จากมารดาสู่บุตรในหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อเอชไอวีเปรียบเทียบกับหญิงตั้งครรภ์ที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี ทุนงบประมาณแผ่นดิน

พ.ศ. 2549 การปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ติดเชื้อไวรัสแปปิโลมาจากคนในโมเดลสัตว์ทดลอง ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์

พ.ศ. 2550 การศึกษาความแตกต่างของยีน L1 ในเชื้อแปปิโลมาไวรัส ที่ต่างสายพันธุ์ และภายในสายพันธุ์เดียวกัน ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์

พ.ศ. 2550 ความแตกต่างของยีน Glycoprotein G ในเชื้อ Respiratory syncytial virus ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์

พ.ศ. 2550-2552 การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาการรักษาโรคมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธีภูมิคุ้มกันบำบัด ทุนงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2551-2552 การเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการเพื่อรับมือโรคมือเท้าและปาก กองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.)

พ.ศ. 2553 ความหลากหลายของยีนไกลโคโปรตีนดีในไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพล็กที่แยกได้จากตัวอย่างส่งตรวจ ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์

พ.ศ. 2553 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gene L1 ในเชื้อ Human Papillomavirus ที่แยกได้จากตัวอย่างต้อเนื้อ และตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกชนิด adenocarcinoma ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์

พ.ศ. 2553-2554 การสร้างไวรัสสายพันธุ์ cold-adapted vaccine master donor จากไวรัส Influenza A 2009 H1N1 ทุนสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช)

พ.ศ. 2553-2554 หัวหน้าโครงการย่อย การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ในชุดโครงการ“โครงการศึกษาภูมิคุ้มกันต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ในผู้ป่วยที่มีอาการ และอาสาสมัครที่ไม่มีอาการ: ข้อมูลสำคัญสำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่” กองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส)

พ.ศ. 2555-2556 Enhanced herpes simplex virus type 1 (HSV-1) production in phytohemagglutinin (PHA)-activated T lymphocytes caused by up-regulated E2F transcription factor 1 (E2F1) ทุนมูลนิธิกระจกอาซาฮี ประเทศญี่ปุ่น

พ.ศ. 2555-2556 Human papillomavirus types 16 E6 protein regulates COX-2 protein expression through PI3K/Akt signaling ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์

พ.ศ. 2555-2557 หัวหน้าโครงการย่อย เรื่อง การตรวจแอนติเจนของไวรัสแปปิโลมาอย่างรวดเร็วสำหรับพยากรณ์การเป็นมะเร็งปากมดลูกโดยใช้อนุภาคนาโนทองคำ ในชุดโครงการวิจัย การวิจัยเพื่อคิดค้นและพัฒนาเทคนิคใหม่ในการตรวจหาและรักษารอยโรคก่อมะเร็งปากมดลูก มะเร็งปากมดลูกระยะเริ่มต้นและโรคที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสแปปิโลมา ทุนสภาวิจัยแห่งชาติ (วช)

พ.ศ. 2557-2559 หัวหน้าโครงการย่อย เรื่อง การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของยีน E1 ของไวรัสแปปิโลมาทัยป์ 16 มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคของมะเร็งปากมดลูก โครงการยุทธศาสตร์การวิจัยเชิงลึก ในชุดโครงการวิจัย การศึกษากลไกวิทยาศาสตร์พื้นฐานในการเกิดและการดำเนินโรคของมะเร็ง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช คลัสเตอร์ Health Cluster จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.3. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

1. Yoosook C, Rimdusit P, Chantratita W, Leechanachai P, **Bhattarakosol P**. Evaluation of biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay for detection of genital herpes simplex virus infection. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 1989: 5; 143-8.
2. **Bhattarakosol P**, Yoosook C, Cross A. Intratypic variation of herpes simplex virus type 2 isolates detected by monoclonal antibodies against viral glycoproteins. *Arch Virol* 1990: 115; 89-100.
3. **Bhattarakosol P**, Yoosook C, Matangkasombat P. Intratypic variations in neutralizable epitopes among herpes simplex virus type 2 isolates. *Microbiol Immunol* 1991: 35(7); 525-3.
4. Werasakaumpai V, **Bhattarakosol P**, Punnarugsa V. Study on rotavirus group A electropherotypes by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). *Cu Med J* 1992: 36(10); 781-787. ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิสิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. **Bhattarakosol P**, Sakunkan Y, Pakdewongse S. Detection of anti-HSV IgM and IgG antibody in herpes patients. *Bull Cu Med Tech* 1993: 5(20); 1095-1103. (Thai) ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิสิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. **Bhattarakosol P**,Viboonchaicheap K, Mungmee V, Punnarugsa V. Evaluation of locally developed ELISA for determining anti-CMV IgG antibody by comparison with two commercial ELISA kits. *Chula Med J* 1994: 38; 91-5. ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิสิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
7. Yoosook C, **Bhattarakosol P**, Wilairat P, Sriurairatna S. Encapsidation defectiveness of herpes simplex viruus type 2 during replication at acid pH condition. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 1994: 12; 59-64.
8. **Bhattarakosol P**, Punnarugsa V, Weeragovit L, Mungmee V. Use of dried blood on whatman paper for detecting of anti-HSV IgG by ELISA. *J Med Tech Assoc Thailand* 1995: 23; 169-174. (Thai) ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิสิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
9. Pittayathikhun K, Korkij W, Punnarugsa V, **Bhattarakosol P**. Viral isolation in different stages of recurrent herpes labialis by shell vial centrifugation cell culture. *Chula Med J* 1995: 39; 593-9.
10. Wirachsilp P, **Bhattarakosol P**, Mungmee V, Punnarugsa V. Comparative study on the results of rotavirus detection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). *Chula Med J* 1995: 39; 823-831. ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิสิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
11. Poonnaniti A, **Bhattarakosol P**. Improvement of PCR detection of HPV-DNA using Enhanced Chemiluminescence system and dot hybridization. *J Med Asso Thai* 1996: 79(Suppl 1); s96-s103. ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
12. **Bhattarakosol P**, Poonnaniti A, Niruthisard S. Detection and typing of human papillomavirus in cervical cancer in Thai women. *J Med Asso Thai* 1996: 79 (Suppl 1); s56-s64. ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
13. Charoenwongse P, Kangwanshiratada O, Chatsuwan T, Boonnam R, Tumwasorn S, **Bhattarakosol P.** The studies of HLA class II (HLA-DR) system by PCR-SSO typing and the relationship with serological method. *J Med Asso Thai* 1996: 79 (Suppl 1); s22-s32.
14. **Bhattarakosol P**, Chantarabul S, Pittayathikhun K, Mungmee V, Punnarugsa V. Seroepidemiological study of anti-VZV IgG in undergraduate students. *Asian Pacific*

Journal of Allergy and Immunology 1996: 14; 129-131. ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิสิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

15. Mungmee V, **Bhattarakosol P,** Punnarugsa V, Bhattarakosol P. Comparative study of SPHIT, Indirect ELISA and Capture ELISA methods in determining specific anti-rubella IgM antibody. *Bull Cu Med Tech* 1997: 10; 1635-42. (Thai)
16. Lertworapreecha M, **Bhattarakosol P**, Niruthisard S. Detection and typing of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia grade III in Thai women. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998: 29; 507-11. ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
17. Pancharoen C, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998: 29; 269-72.
18. **Bhattarakosol P**, Sithidajporn M, Bhattarakosol P. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in Thai adults detecting by ELISA. *Chula Med J* 1998: 42; 935-43. ทุนสนับสนุนจากโครงการสร้างเสริมประสบการณ์การวิจัยนิสิตระดับปริญญาตรี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
19. Puncharoen C, Chansongsakul T, **Bhattarakosol P**. Causes of fever in children with first febrile seizures: How common are human herpesvirus-6 and dengue virus infections?. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000: 31; 521-3.
20. Limpaiboon T, Pooart J**, Bhattarakosol P**, Niruthisard S, Chantratita W, Lulitanond V. p53 status and human papillomavirus infection in Thai women with cervical carcinoma. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000: 31; 66-71.
21. Pancharoen C, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Infectious mononucleosis and seroprevalence of Ebstein-Barr virus infection in Chiladren. *Thai J Pediatrics* 2000: 39; 115-9.
22. **Bhattarakosol P**, Punnarugsa V, Mungmee V. Evaluation of an in-house ELISA for detecting herpes simplex virus antigen in comparison to conventional cell culture, shell vial vell culture and a commercial ELISA kit. *Chula Med J* 2001: 45; 11-9.
23. Mungmee V, Thammaborvorn R, Semboonlor L, Punnarugsa V, **Bhattarakosol P**. Situation of viral infectious diseases in King Chulalongkorn Memorial Hospital during 1993-1997. *Chula Med J* 2001: 45; 3-9.
24. **Bhattarakosol P**, Puncharoen C, Mekmullica J, Bhattarakosol P. Seroprevalence of anti-human herpesvirus–6 IgG antibody in children of Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001: 32(1); 143-7. ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

25. Puncharoen C, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Seroprevalence of Ebstein-Barr virus infection in Thai children. *J Med Assoc Thai* 2001: 84(6); 850-4.
26. Kowitdamrong E, Thammaborvorn R, Semboonlor L, Mungmee V, **Bhattarakosol P**. Detection of Dengue HI and IgM antibody: Is it diagnostically useful? When and how ? *J Med Assoc Thai* 2001: 84 (Suppl 1); s148-53.
27. Vilaichone R, Mahachai V, Eiam-Ong S, Kullavanijaya P, Wisedopas N, **Bhattarakosol P**. Necritinizing ileitis caused by cytomegalovirus in patient with systemic lupus erythematosus: case report. *J Med Assoc Thai* 2001: 84 (Suppl 1); s469-73.
28. Pancharoen C, Mekmullica J, Chinratanapisit S, **Bhattarakosol P**, Thisyakorn U. Seroprevalence of Ebstein-Barr virus antibody among children in various age groups in Bangkok, Thailand. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2001: 19; 135-7.
29. **Bhattarakosol P**, Chirathaworn C, Chimma P. Replication of herpes simplex virus in T lymphocytes. *J Med Assoc Thai* 2002: 85(Suppl 1); s399-406. ทุนมูลนิธิกระจกอาซาฮี ประเทศญี่ปุ่น
30. **Bhattarakosol P**, Lertworapreecha M, Kitkumthorn N, Triratana chai S, Niruthisard S. Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women. *J Med Assoc Thai* 2002: 85(Suppl 1); s360-5. ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
31. **Bhattarakosol P,**Wiwanitkit V,Boonchalermvichian C,Nuchprayoon I. Human herpes virus 6 antibodies in beta-thalassemia/hemoglobin E pediatric patients. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002;33 Suppl 3:149-51.
32. Noppornpanth S, Haagmans BL, **Bhattarakosol P**, Ratanakorn P, Niesters HGM, Osterhaus ADME, Poovorawan Y. Molecular epidemiology of gibbon hepatitis B virus transmission. *J Gen Virol* 2003: 84; 147-55.
33. Tulvatana W, **Bhattarakosol P**, Sansopha L, Sipivarak W, Kowitdamrong E, Paisuntornsug T, Karnsawai S. Risk factors for conjunctival squamous cell neoplasia: a matched case-control study. *Br J Ophthalmol*. 2003 Apr;87(4):396-8.
34. Khongphatthanayothin A, Suesaowalak M, Muangmingsook S, **Bhattarakosol P**, Pancharoen C. Hemodynamic profiles of patients with dengue hemorrhagic fever during toxic stage: an echocardiographic study. *Intensive Care Med*. 2003 Apr;29(4):570-4.

35. Sakulwira K, Vanapongtipagorn P, Theamboonlers A, **Bhattarakosol P**, Wananukul S, Poovorawan Y. Deatection and differentiation of human herpesviruses 1-5 by consensus primer PCR and RFLP. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2003; 21:55-61.

36. Likitnukul S, **Bhattarakosol P**, Poovorawan Y. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in children born to HIV-1 infected women. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2003 Jun;21(2):127-30.

37. Sridulyakul P, Chakraphan D, **Bhattarakosol P**, Patumraj S. Endothelial nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary circulation of streptozotocin induced diabetic rats: comparison using image analysis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003;29(3-4):423-8.

38. **Bhattarakosol P**, Pancharoen C, Kowitdamrong E, Thammaborvorn R, Mungmee V. Prevalence of parvovirus B19 infection in Thai young adults. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003; 34:585-8.

39. **Bhattarakosol P**, Pancharoen C, Mungmee V, Thammaborvorn R, Semboonlor L. Seroprevalence of anti-RSV IgG in Thai children aged 6 months to 5 years. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2003; 21:269-71.

40. Pancharoen C, Likitnukul S, Chongsrisawat V, Vivatvekin B, **Bhattarakosol P**, Suwangool P, Thisayakorn U. Rectal prolapse associated with cytomegalovirus pseudomembranous colitis in a child infected by human immunodeficiency virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34(3): 583-4.

41. Chimma P, Chirathaworn C, **Bhattarakosol P.** Increased susceptibility of HSV-1 growth in PHA activated T-lymphocyte caused by upregulating of HveA mRNA expression. *Intervirology* 2004; 47: 14-8. ทุนทบวงมหาวิทยาลัยเพื่อสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา

42. Sakulwira K, Theamboonlers A, Oraveerakul K, Chaiyabutr N, **Bhattarakosol P**, Poovorawan Y. Orangutan herpesvirus. *J Med Primatol* 2004:33:1-5.

43. Hansasuta P, Incomserb P, Buranapraditkul S, **Bhattarakosol P**. Establishment of cytotoxic T lymphocytes specific for autologous Epstein-Barr virus in HIV-infected patients: The feasibility study of EBV-specific immunotherapy for patients with EBV-associated lymphoma. *J Med Assoc Thai* 2004: 87 (Suppl 2) :S146-51.

44. Pongpanich A, **Bhattarakosol P**, Chirathaworn C. Induction of apoptosis by herpes simplex virus in Jurkat cells is partly through caspase-3, -8, and -9 activation. . *J Med Assoc Thai* 2004: 87 (Suppl 2):S140-5.

45. Tuksinvaracharn R, Tanayapong P, Pongrattanaman S, Hansasuta P, **Bhattarakosol P**, Siriyasatien P. Prevalence of dengue virus in Aedes mosquitoes during dry season by semi-nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (semi-nestedRT-PCR). *J Med Assoc Thai*. 2004 Sep;87 Suppl 2:S129-33.

46. Visaprom S, Chindamporn A, Chantratita A, **Bhattarakosol P**. Intratypic variations among Thai herpes simplex virus (HSV) isolates determined by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Submitted to *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005; 36(4): 910-6. ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

47. Yoysungnoen P, Wirachwong P, **Bhattarakosol P**, Niimi H, Patumraj S. Antiangiogenic activity of curcumin in hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. *Clinical Hemorheology Micro*, 2005; 33(2):127-35.

48. **Bhattarakosol P**, Visaprom S, Sangdara A, Mungmee V. Increase of Genital HSV-1 And Mixed HSV-1 and HSV-2 Infection in Bangkok, Thailand. *J Med Assoc Thai*, 2005;.88(4): S300-4. ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

49. Incomserb P, **Bhattarakosol P**, Kulwichit W, Chatratita W, Hansasuta P. Establishment of real-time polymerase chain reaction-based assay for quantitation of Epstein-Barr virus DNA in healthy donors and in patients with EBV associated lymphoma. *J Med Assoc Thai*, 2005;.88(4): S280-6.

50. Kovitdamrong E, Pancharoen C, Thammaborvorn R, **Bhattarakosol P**. The prevalence of varicella-zoster virus infection in normal healthy individuals aged above 6 months. *J Med Assoc Thai*, 2005;88(4):.S7-11.

51. Boonyod D, Poovorawan Y, **Bhattarakosol P**, Chirathaworn C. Lip32, an outer membrane protein of Leptospira, as an antigen in dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2005; 23:133-141.

52. Yoysungnoen P, Wirachwong P, **Bhattarakosol P**, Niimi H, Patumraj S. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;34(1-2):109-15.

53. Chutinimitkul S, **Bhattarakosol P**, Srisuratanon S, Eiamudomkan A, Kongsomboon K, Damrongwatanapokin S, Chaisingh A, Suwannakarn K, Chieochansin T, Theamboonlers A, Poovorawan Y. H5N1 influenza A virus and infected human plasma. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jun;12(6):1041-3.

54. Chantaraarphonkun S, **Bhattarakosol P**. Intra and Intergenotypic Variations among Human Cytomegalovirus (HCMV) gB Genotypes in Clinical Samples. *Intervirology*. 2007:50:78-84. ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ทุนทบวงมหาวิทยาลัยเพื่อสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา

55. Thammabovorn T, Mungmee V, Thammachotruja L, Kowitdamrong E, **Bhattarakosol, P**. Prevalence of viral infections in clinical specimens at Virology Laboratory Unit during the year 1998 to 2004. *Chula Med J* 2007; 51: 229-39.

56. **Bhattarakosol P**, chantaraarphonkun S. Prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) gB genotypes in Thai patients. *Southeast Asian J Trop Med Public He*alth 2007: 38: 835-40. ทุนโครงการชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

57. Duansak N, Yoysungnoen P, Somchaichana J, **Bhattarakosol P**, Wirachwong P, Patumraj S. Correlation between hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor expression under tumor neovascularization in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Asian Biomedicine* 2007, 1 (4) ;399-406.

58. Putcharoen O, Krajiw S, Nilratanakul V, Rojnuckarin P, **Bhattarakosol P**, Nisalak A, Pancharoen C, Thisayakorn U, Kulwichit W. O58 Presence of dengue virus genome in the bone marrow of asymptomatic adults in a dengue-hyperendemic country: implication for complicated dengue pathogenesis. *Int J Antimicrobial agents* 2007;29. DOI:10.1016/S0924-8579(07)70047-X

59. Sangdara A, **Bhattarakosol P**. Acyclovir susceptibility of herpes simplex virus isolates at King Chulalongkorn Hospital, Bangkok. *J Med Assoc Thai* 2008 91(6):908-12. ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

60. Lertworapreecha M, Thammachotruja L, **Bhattarakosol, P**. Prevalence and distribution of HPV type in Thai women. *Chula Med J* 2008; 52:161-7. ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

61. Theamboonlers A, **Bhattarakosol P**, Chongsrisawat V, Sungkapalee T, Wutthirattanakowit N, Poovorawan Y. Molecular characterization of group A human rotaviruses in Bangkok and Buriram, Thailand during 2004-2006 reveals the predominance of G1P[8], G9P[8] and a rare G3P[19] strain. *Virus Genes* 2008;36:289-98.

62. Lertworapreecha M, Patumraj S, Niruthisard S, Hansasuta P, **Bhattarakosol P**. Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. *Indian J Exp Biol* 2009;47:327-32. ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ และทุนงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

63. Muangsub T, Khemachaithanyarot N, Mungmee V, Ammaranond P, **Bhattarakosol P**. Stability of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) during Specimen Collection and Transport. *J Med Tech Assoc Thailand* 2009; 32(2):2819-26. (Thai)
64. Boonyasuppayakorn S, Kowitdamrong E, **Bhattarakosol P**. Molecular and demographic analysis of respiratory syncytial virus infection in patients admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand, 2007. *Influenza and Other respiratory Viruses* 2010; 4: 313-323. ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
65. Kuncharin Y, Sangpetch N, Kueanjinda P, **Bhatarakosol P**, Palaga T. MAML1 regulates cell viability via the NF-ΚB pathway in cervical 3 cancer cell lines. Exp Cell Res 2011;317(13):1830-40.
66. **Bhattarakosol P**, Kovitdamrong E, Prisuwanna P. HIV infection may not increase the intrauterine transmission rate of CMV and HSV in patients with co-infection. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* 2011; 6: 103-110. ทุนงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
67. Yamsuwan T, Chirathaworn C, Hansasuta P, **Bhattarakosol P**. HIV-1 replication in HIV-infected individuals is significantly reduced when peripheral blood mononuclear cells are superinfected with HSV-1. *ScientificWorld J* 2012; 2012:102843. ทุนมูลนิธิกระจกอาซาฮี ประเทศญี่ปุ่น
68. Mahasiripanth T, Hokputsa S, Niruthisard S, **Bhattarakosol P**, Patumraj S. Effects of Acanthus ebracteatus. Vahl on tumor angiogenesis and on tumor growth in nude mice implanted with cervical cancer. *Cancer Manag Res* 2012; 4: 269-79.
69. Lertworapreecha M, Patumraj S, Niruthisard S, Hansasuta P, **Bhattarakosol P.** Cytotoxic function of gamma delta (γ/δ) T cells against pamidronate-treated cervical cancer cells. *Indian J Exp Biol* 2013; 51:597-605. ทุนงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
70. Yoysungnoen-Chintana P, **Bhattarakosol P**, Patumraj S. Antitumor and antiangiogenic activities of curcumin in cervical cancer xenografts in nude mice. BioMed Research International, 2014; 2014:817972. doi: 10.1155/2014/817972. Epub 2014 Apr 16.
71. Wongeakin N, **Bhattarakosol P**, Patumraj S. Molecular mechanisms of curcumin in diabetes-induced endothelial dysfunctions: Txnip, ICAM-1 and NOX2 expressions. Biomed Res Int. 2014;2014:161346. doi: 10.1155/2014/161346. Epub 2014 Jun 26.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

ชื่อเรื่อง	แหล่งทุน	วิจัยลุล่วงร้อยละ	หมายเหตุ
การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของยีน E1 ของไวรัสแปปิโลมาทัยป์ 16 มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคของมะเร็งปากมดลูก โครงการยุทธศาสตร์การวิจัยเชิงลึก	กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช คลัสเตอร์ Health Cluster จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	10	เริ่มดำเนินการเมื่อ1 กค. 57

ส่วน ค : ประวัติคณะผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย สมชัย นิรุตติศาสน์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Somchai Niruthisard

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3101300012041

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ นายแพทย์

เงินเดือน (บาท) (เป็นอาจารย์พิเศษ)

เวลาที่ใช้ทำวิจัย (5 ชั่วโมง : สัปดาห์)

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์

ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระราม 4 กทม. 10330

เบอร์โทรศัพท์ 0813382332 Fax 02-254-9292

อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) ndsomchai@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

2521 พ.บ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

2525 วุฒิบัตร สาขาสูติศาสตร์ -นรีเวชวิทยา แพทยสภา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Precancerous lesion of lower genital tract, HPV related lesions of female genital tract, Screening and management of precancerous lesion of lower genital tract, Prevention of HPV related lesions**.**

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

1. Lertworapreecha M, Patumraj S, **Niruthisard S**, Hansasuta P, Bhattarakosol P. Cytotoxic function of gamma delta (gamma/delta) T cells against pamidronate-treated cervical cancer cells. *Indian J Exp Biol*. 2013 Aug;51(8):597-605.

2. Nilyanimit P, Wanlapakorn N, **Niruthisard S**, Pohthipornthawat N, Karalak A, Laowahutanont P, Phanuphak N, Gemma N, Poovorawan Y. Detection of human papillomavirus in male and female urine by electrochemical DNA chip and PCR sequencing. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(9):5519-25.

3. Mahasiripanth T, Hokputsa S, **Niruthisard S**, Bhattarakosol P, Patumraj S. Effects of Acanthus ebracteatus Vahl on tumor angiogenesis and on tumor growth in nude mice implanted with cervical cancer. *Cancer Manag Res*. 2012;4:269-79.. Epub 2012 Aug 23.

4. Chinchai T, Chansaenroj J, Junyangdikul P, Swangvaree S, Karalak A, **Niruthisard S**, Poovorawan Y. Comparison between direct sequencing and INNO-LiPA methods for HPV detection and genotyping in Thai Women. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(4):989-94.

5. Lurchachaiwong W, Junyangdikul P, Payungporn S, Sampatanukul P, Chansaenroj J, Tresukosol D, Termrungruanglert W, **Niruthisard S**, Poovorawan Y. Human papillomavirus genotypes among infected Thai women with different cytological findings by analysis of E1 genes. *New Microbiol.* 2011 Apr;34(2):147-56. Epub 2011 Apr 30.

6. Chansaenroj J, Lurchachaiwong W, Termrungruanglert W, Tresukosol D, **Niruthisard S**, Trivijitsilp P, Sampatanukul P, Poovorawan Y. Prevalence and genotypes of human papillomavirus among Thai women. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2010;11(1):117-22.

7. Lurchachaiwong W, Junyangdikul P, Termrungruanglert W, Payungporn S, Sampatanukul P, Tresukosol D, **Niruthisard S**, Trivijitsilp P, Karalak A, Swangvaree S, Poovorawan Y. Whole-genome sequence analysis of human papillomavirus type 18 from infected Thai women. *Intervirology.* 2010;53(3):161-6. Epub 2010 Jan 13.

8. Lertworapreecha M, Patumraj S, **Niruthisard S**, Hansasuta P, Bhattarakosol P. Mouse acquired HPV tumor using dorsal skin-fold window chamber. *Indian J Exp Biol*. 2009 May;47(5):327-32.

9. Tantbirojn P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, **Niruthisard S**. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in borderline ovarian tumors: an immunohistochemical study.*J Med Assoc Thai*. 2009 Mar;92(3):308-14.

10. Tantbirojn P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, **Niruthisard S**. Comparison between adenocarcinoma in both endocervical and endometrial specimens from fractional curettage and pathologic findings in subsequent hysterectomy specimens.*J Med Assoc Thai*. 2008 Sep;91(9):1313-7.

11. Tantbirojn P, Triratanachat S, Trivijitsilp P, **Niruthisard S**. Detection of PTEN immunoreactivity in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *J Med Assoc Thai*. 2008 Aug;91(8):1161-5.

12. Sirayapiwat P, Suwajanakorn S, Triratanachat S, **Niruthisard S**. The effects of GnRH antagonist on the endometrium of normally menstruating women. *J Assist Reprod Genet.* 2007 Dec;24(12):579-86. Epub 2007 Nov 30.

13. Manchana T, Sirisabya N, Triratanachat S, **Niruthisard S**, Tannirandorn Y. Pyomyoma in a perimenopausal woman with intrauterine device. *Gynecol Obstet Invest*. 2007;63(3):170-2. Epub 2006 Nov 23.

14. Kitkumthorn N, Yanatatsanajit P, Kiatpongsan S, Phokaew C, Triratanachat S, Trivijitsilp P, Termrungruanglert W, Tresukosol D, **Niruthisard S**, Mutirangura A. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. *BMC Cancer*. 2006 Mar 8;6:55..

15. Bhattarakosol P, Lertworapreecha M, Kitkumthorn N, Triratanachai S, **Niruthisard S**. Survey of human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia in Thai women.*J Med Assoc Thai*. 2002 Jun;85 Suppl 1:S360-5.

16. Tantbirojn P ; Chantranuwat C ; Triratanachat S ; Trivijitsilp P ; **Niruthisard S.** "Expression of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian cancers : a study of 101 cases with high proportion of non-serous carcinoma." *Chula Med J.* 2007.51, 4 (Apr) : 203-206.

17. Sirayapiwat P ; Suwajanakorn S; Triratanachat S ; **Niruthisard S**. "The effects of GnRH antagonist on the endometrium of normally menstruating women." *J Assist Reprod Genet.* 2007. 30 (Nov).

18. Patou Tantbirojn; Chavit Chantranuwat; Surang Triratanachat ; Prasert Trivijitsilp; **Somchai Niruthisard**. "Expression of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian cancers : A study of 101 cases with high proportion of non-serous carcinoma." *Chula Med J***.** 2007. 51, 4 (Apr) : 203-216.

19. Kiatpongsan S ; **Niruthisard S** ; Mutirangura A ; Trivijitsilp P ; Vasuratna A. "Role of human papillomavirus DNA testing in management of women with atypical squamous cells of undetermined significance." *Int J Gynecol Cancer***.** 2006.16, 1 (Jan-Feb) : 262-265.

20. Triratanachat S; **Niruthisard S;** Trivijitsilp P; Tresukosol D; Jarurak N. "Angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and early-staged uterine cervical squamous cell carcinoma: clinical significance." *Int J Gynecol Cancer***.** 2006. 16, 2 (Mar-Apr) : 575-580.

21. Surang Triratanachat; **Somchai Niruthisard** ; Prasert Trivijitsilp. "Granulosa cell tumor and ovarian hepatoid carcinoma as a collision tumor." *Chula Med J.* 2004.48, 2 (Feb) : 101-109.

22. Yotwimonwat T; Lertkhachonsuk R; Triratanachat S ; Tresukosol D ; Niruthisard S. "Prevalence of abnormal cervical cytology according to the Bethesda system, at King Chulalongkorn Memorial Hospital." *Thai J Obstet Gynaecol*. 2002.14, 4 (Dec) : 277-283. (in Thai)

23. Pornthanakasem W ; Shotelersuk K ; Termrungruanglert W; Voravud N ; **Niruthisard S,** et al. "Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer." *BMC Cancer***.** 2001.1, 1: 2.

24. Triratanachat S, Vasuratna A, Trivijitsilp P, **Niruthisard S**. "Ovarian metastatic human chorionic gonadotropin producing gastric carcinoma presenting as a primary ovarian tumor : a case report." *Chulalongkorn Medical Journal* . 2000. 44, 12 (Dec) : 939-948.

25. Limpaiboon T ; Pooart J ; Bhattarakosol P ; **Niruthisard S** ; Chantratita W. "p53 status and human papillomavirus infection in Thai women with cervical carcinoma." *Southeast Asian J Trop Med Public Health***.** 2000. 31, 1 (Mar) : 66-71.

26. **Niruthisard S** ; Nunthapisud P; Sukcharoen N ; Taechagaichana N. "Chlamydia trachomatis infection in Thai female sex workers." *Chulalongkorn Medical Journal.* 2000. 35, 8: 507-512.

27. Reinprayoon D; Taneepanichskul S ; **Niruthisard S**; Suwanjanakorn S. "Taneepanichskul S, Niruthisard S, Suwanjanakorn S. Uterine histopathologic changes after Cu-fix intrauterine device insertion." *Contraception*. 1999. 59: 63-65.

28. Termrungruanglert W; Tresukosol D ; Sakdikul S ; Sirisabya N ; Sittisomwong, T, **Niruthisard S**, et al. "Telomerase activity in bulky cervical cancer stage IB and IIA treated with neoadjuvant chemotherapy. Proceeding of the American Society of Clinical Oncology. Conference: 35; Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO)." *American Society of Clinical Oncology (ASCO):* 1999.15-18.

29. Triratanachat S ; Trivijitsilp P ; **Niruthisard S**; Tantayaporn K. "Pathological viewpoints in ovarian surface epithelial-stromal tumor." *Chula Med J.* 1999.43, 4 (Apr) : 193-204.

30. Trivijitsilp P; Triratanachat S; **Niruthisard S**; Niruthisard S. "The frequency of primary ovarian neoplasms at King Chulalongkorn Memorial Hosptial during 1990-1997." *Chula Med J.* 1999.43, 4: 213-224.

31. Triratanachat S ; Trivijitsilp P; **Niruthisard S;** Tantayaporn K. "Mullerian adenosarcoma of the endocervix." *Chula Med J***.** 1999. 43, 4 (Apr) : 243-251.

32. Trivijitsilp P ; Triratanachat S ; Tantayaporn K ; **Niruthisard S**. "Papanicolaou classification to the (1991) Bethesda system1999." 1999. 43, 4: 253-265.

33. Trivijitsilp P ; Triratanachat S ; Sirisabya N ; **Niruthisard S**. "Sclerosing stromal tumor of the ovary : a case report." *Chula Med J*. 1999. 43, 3 (Mar) : 169-75.

34. Charuruks N ; Voravud N ; Termrungruanglert W; Lertsanguansinchai P ; Tresukosol D, **Niruthisard S,** Sirisabya N.. "13-cis-Retinoi acid and interferon-alpha2a therapy in locally advanced squamous cell carcinoma of the cervix : p53 alteration, proliferating cell nuclear antigen expression and angiogenesis response ." *J Obstet Gynecol Res***.** 1998.24, 5 (Oct) : 335-41.

35. Van Damme L ; **Niruthisard S**; Atisook R; Boer K ; Dally L, et al. 1998. "Safety evaluation of nonoxynol-9 gel in women at low risk of HIV infection." *AIDS* 512, 4 (Mar) : 433-7. (in Thai)

36. Mutirangura A ; Sriuranpong V; Termrungraunglert W ; Tresukosol D ; Lertsanguansinchai P. Voravud N, **Niruthisard S.** "Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions." *Br J Cancer***.** 1998. 87, 7: 933-9.

37. Lertworapreecha M, Bhattarakosol P, **Niruthisard S.** "Detection and typing of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia grade III in Thai women." *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1998.29, 3 (Sep) : 507-511.

38. Tresukosol D ; Termrungruanglert W; Sittisomwong T; **Niruthisard S**; Sirisabya N. Role of primary chemotherapy for inoperable advanced epithelial ovarian carcinoma.. "*International Journal of Gynecologic Cancer. Sixth Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS)*. 1997:63.

39. Kitkumthorn N ; Yanatatsanajit P; Kiatpongsan S ; Phokaew C ; Triratanachat S, Trivijitsilp P, Termrungruanglert W, Tresukosol D, **Niruthisard S**, Mutirangura A. "Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer." *BMC Cancer*. 1996.6, 55: Mar.

40. Boonkasemsanti W ; Reinprayoon D ; Pruksananonda K ; **Niruthisard S;** Triratanachat S, et al. "The effect of transdermal oestradiol on bleeding pattern, hormonal profiles and sex steroid receptor distribution in the endometrium of Norplant users." *Human Reproduction*. 1996. 11, Suppl 2: 115-23.

41. Bhattarakosol P ; Poonnaniti A ; **Niruthisard S**. "Detection and typing of human papillomavirus in cervical cancer in the Thai." *J Med Assoc Thai.* 1996.79, Suppl 1 (Dec) : S56-S64.

42. Termrungruanglert W ; Wisawasukmongchol W; Limpaphayom K ; Vasuratna A ; Sittisomwong T, et al. "Loop Electrosurgical Excision Procedure (LEEP) and cervical intraepithelial neoplasia : a preliminary report." *Chula Med J.* 1994.38, 11: 653-658.

43. **Niruthisard S**; Nunthapisud P; Sukcharoen N; Taechakraichana N ; Reinprayoon D. "ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อคลาไมเดียของปากมดลูกและวิธีการคุมกำเนิดรายงาน *Chulalongkorn University Press*. 1992.

44. **Niruthisard S** ; Roddy RE; Chutivongse S. "Use of nonoxynol-9 and reduction in rate of gonococcal and chlamydial cervical infections." *Lancet***.** 1992.6339, 8806 (Jun) : 1371-5.

45. Hemachudha T; **Niruthisard S**; Sirivichayakul S ; Wilde H ; Chomchey P. "HTLV-1 has reached Thailand via a heterosexual route." *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 1992. 86, 4 (Jul-Aug) : 434.

46. **Niruthisard S.** "Common epithelial cancers of the ovary at Chulalongkorn Hospital (1985-1989)." *Chula Med J.* 1991.35, 11 (Nov) : 735-743.

47. **Niruthisard S** ; Roddy RE ; Chutivongse S. " The effects of frequent nonoxynol-9 use on the vaginal and cervical mucosa." *Sex Transm Dis, Sexually Transmitted Diseases*. 1991. 18, 3 (Jul-Sep) : 176-9.

48. **Niruthisard S** ; Tresukosul D. " Male sexual behavior as risk factor in cervical cancer." *J Med Assoc Thai***.** 1991.74, 11 (Nov) : 507-12.

49. Limpaphayom K ; **Niruthisard S** ; Roebach FN. "Faculty perceptions of ideal teacher and curriculum in health care professions." *Thai J Obstet Gynaecol***.** 1990. 2, 1 (Jan-Jun) : 43-58.

50. **Niruthisard S**; Witoonpanich P; Wajanavisit W ; Siriwanta S. "Colposcopic diagnosis of cervical neoplasia : a preliminary report." *Chula Med J.* 1987.31, 7: 549-553.