

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *KIF1B* กับความเสี่ยงต่อการเกิด
มะเร็งตับของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศไทย

นายวาทัญญ โสภิพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ASSOCIATION OF SUSCEPTIBILITY SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM
IN *KIF1B* GENE FOR HBV RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA PATIENTS
IN THAI POPULATIONS

Mr. Watanyoo Sopipong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

วทัญญู โสภิพงษ์ : ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *KIF1B* กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศไทย (ASSOCIATION OF SUSCEPTIBILITY SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN *KIF1B* GENE FOR HBV RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA PATIENTS IN THAI POPULATIONS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ , อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, 87 หน้า

มะเร็งตับ เป็นสาเหตุของการตายด้วยโรคมะเร็งอันดับสามของโลก และเป็นมะเร็งชนิดที่พบได้บ่อยที่สุดในชายไทย โดยสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งตับในประเทศไทยคือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีรายงานว่าปัจจัยทางพันธุกรรมที่เรียกว่า single nucleotide polymorphism ตำแหน่ง rs17401966 ซึ่งอยู่บนยีน *KIF1B* มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในจีน แต่ในประเทศไทยยังไม่มีผู้ศึกษาถึงการกระจายตัวและความถี่ของ rs17401966 ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในไทยที่ตรวจพบ HBsAg จำนวน 398 คน ซึ่งถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มเป้าหมาย (ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับ) จำนวน 202 คน และกลุ่มควบคุม (ผู้ป่วยไม่มีประวัติการเป็นมะเร็งตับ) จำนวน 196 คน โดยได้ทำการตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมตำแหน่ง rs17401966 รวมถึงพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TaqMan probe real-time PCR และพบว่าผู้ป่วยกลุ่มเป้าหมายเป็นผู้ที่มี homozygous major genotype (AA) ร้อยละ 49.5 heterozygous ร้อยละ 40.1 และ homozygous minor genotype (GG) ร้อยละ 10.4 และในกลุ่มควบคุมมีผู้ที่มี homozygous major genotype, heterozygous และ homozygous minor genotype ร้อยละ 49.5, 42.3 และ 8.2 ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า rs17401966 ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในไทยอย่างมีนัยสำคัญ (p -value = 0.998, OR = 1.00 และ 95% CI = 0.68-1.48) ซึ่งอาจเป็นผลจากปัจจัยร่วมอื่นๆในการเกิดโรคมะเร็งตับ

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชา.....ชีวเคมีทางการแพทย์.....ลายมือชื่อ.....ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.....2555.....ลายมือชื่อ.....ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5374654330: MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: *KIF1B*, rs17401966, CHRONIC HEPATITIS B INFECTION (HBV),
HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC)/ SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS

WATANYOO SOPIPONG: ASSOCIATION OF SUSCEPTIBILITY SINGLE
NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN *KIF1B* GENE FOR HBV RELATED
HEPATOCELLULAR CARCINOMA PATIENTS IN THAI POPULATIONS.

ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., CO - ADVISOR: PROF. PISIT
TANGKIJVANICH, M.D., 87 pp.

Hepatitis B virus (HBV) infection can become chronic, and if left untreated, it can progress to Hepatocellular Carcinoma (HCC). Thailand is endemic for HBV and HCC is one of the top five cancer causing deaths among Thai HBV-infected males. A single nucleotide polymorphism (SNP) at the *KIF1B* gene locus, rs17401966, has been shown to be strongly associated with the development of HBV-related HCC. Thai HBV patients seropositive for HBsAg (n=398) were divided into two groups: Case group (chronic HBV with HCC; n=202) and Control group (HBV carriers without HCC; n=196). rs17401966 was analyzed by direct nucleotide sequencing. The genotypic distribution of rs17401966 for homozygous major genotype (AA), heterozygous minor genotype (AG) and homozygous minor genotype (GG) in the case group was 49.5% (n=100), 40.1% (n=81) and 10.4% (n=21), respectively. As for the control group, the genotypic distribution of rs17401966 was 49.5% (n=97), 42.3% (n=83) and 8.2% (n=16) for the homozygous major genotype, heterozygous minor genotype, and homozygous minor genotype, respectively. Binary logistic regression was used to assess the association between rs17401966 and the risk of developing HCC. rs17401966 was not statistically associated with the risk of HCC development in Thai chronic HBV patients (p -value = 0.998, OR = 1.00 and 95% CI = 0.68-1.48) indicating that there must be other mechanisms or pathways involved in the development of HCC.

Department: Biochemistry..... Student's Signature.....

Field of Study: Medical Biochemistry..... Advisor's Signature.....

Academic Year: 2012..... Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ ที่ให้โอกาสและสนับสนุนการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของทั้งวิทยานิพนธ์และร่างผลงานวิจัยที่จะตีพิมพ์ในวารสารและความช่วยเหลืออื่นๆตลอดการวิจัย และอบรมสั่งสอนวิชาความรู้ทั้งหมดที่เกิดขึ้นตลอดช่วงเวลาทำการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมสำหรับการวิจัยในครั้งนี้ที่กรุณาแนะนำ ให้ความรู้ และอำนวยความสะดวกในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดที่ใช้ในงานวิจัยทั้งหมด รวมไปถึงช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของทั้งวิทยานิพนธ์และร่างผลงานที่จะตีพิมพ์ในวารสารจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัตยุชัย พยุงภร ที่กรุณาช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในงานวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านเทคนิคต่างๆในการวิจัยรวมถึงกรุณาช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องของทั้งวิทยานิพนธ์และร่างผลงานวิจัยที่จะตีพิมพ์ในวารสาร

ขอขอบพระคุณคณะจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้อบรมสั่งสอน และประสาทวิชาความรู้ จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยตลอดจนการให้ความช่วยเหลือในกรณีต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพี่ๆ ในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาทางคลินิกและภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านให้ความกรุณาช่วยเหลือ แนะนำ และอำนวยความสะดวกนานาประการตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือและให้คำแนะนำตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาทั้งหมดที่ผ่านมาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณคุณกรจริม นิลยนิมิต และเพื่อนสนิทที่คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจตลอดมา สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่สนับสนุนและให้โอกาสทางการศึกษา และให้กำลังใจด้วยความรักอย่างหาที่สุดมิได้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
สารบัญแผนภาพ	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามของการวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐาน.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
คำสำคัญ.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7
โรคมะเร็งตับ.....	7
ความถี่.....	7
เชื้อชาติ.....	8
เพศ.....	8
อายุ.....	10
การตาย.....	10
ลักษณะทางคลินิก.....	11

	หน้า
การวินิจฉัย.....	12
การแบ่งระยะของมะเร็งตับ.....	13
การรักษา.....	14
ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งตับ.....	16
ขั้นตอนและกลไกการเกิดมะเร็งตับ.....	19
ไวรัสตับอักเสบ.....	22
ไวรัสตับอักเสบบี.....	23
ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี.....	23
การเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี.....	26
ยีน <i>KIF1B</i>	28
Single nucleotide polymorphism.....	30
rs17401966.....	31
Locked nucleic acid (LNA)	32
Molecular discrimination using real-time PCR.....	33
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	36
รูปแบบการวิจัย.....	36
ประชากรศึกษา.....	36
เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	37
การเก็บตัวอย่าง.....	40
การสกัดดีเอ็นเอ.....	40
การออกแบบไพรเมอร์.....	41
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR.....	42
การทำโคลนนิ่ง.....	43
การตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม.....	44
การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ.....	46
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล.....	48
ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR.....	48
ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing.....	49

	หน้า
ผลวิเคราะห์ทางสถิติ.....	50
ผลการตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม rs17401966	
ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR.....	54
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	63
รายการอ้างอิง	65
ภาคผนวก	74
ภาคผนวก ก.....	75
ภาคผนวก ข.....	79
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	87

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแบ่งระยะของมะเร็งตับตามเกณฑ์ของ BCLC.....	13
2	แสดงชนิดของกรดอะมิโนในแต่ละ serotype.....	24
3	แสดงสารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการทำ PCR ต่อ 1 ปฏิกริยา.....	42
4	แสดงรอบปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ PCR.....	42
5	แสดงไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์.....	42
6	แสดงสารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการทำ real-time PCR.....	45
7	แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ Real-time PCR.....	45
8	แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำ TaqMan probe Real-time PCR	46
9	แสดงลำดับเบสของ probe ที่ใช้ในการทำ TaqMan probe Real-time PCR.....	46
10	แสดงข้อมูลสถิติของกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุม.....	52
11	แสดงค่าความถี่ของ genotype ของ rs17401966 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเป้าหมาย และกลุ่มควบคุม.....	53
12	แสดงค่าความถี่ allele ของ rs17401966 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเป้าหมายและกลุ่ม ควบคุม.....	54
13	แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ genotype ของ rs17401966 ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธี direct sequencing ในกลุ่มตัวอย่าง 53 คน.....	60
14	เปรียบเทียบผลการศึกษาการกระจายตัวของ genotype ความถี่ allele ของ rs17401966 และ ความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในแต่ละกลุ่มประชากร.....	64

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับทั่วโลก	8
2 อัตราส่วนการเกิดโรคมะเร็งตับระหว่างเพศชายและเพศหญิงในแต่ละภูมิภาค.....	9
3 แสดงช่วงอายุของผู้ป่วยมะเร็งตับ HCC ในประเทศไทย	10
4 แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของ aflatoxin B1	18
5 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตับปกติกับตับที่ถูกทำลาย	20
6 แสดงกลไกในการเกิดมะเร็งตับ	22
7 แสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี.....	25
8 การกระจายตัวของไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ต่างๆทั่วโลก	27
9 การกระจายตัวของไวรัสตับอักเสบบีแต่ละสายพันธุ์ในประเทศไทย	28
10 แสดงตำแหน่งของ rs17401966	31
11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ LNA.....	32
12 ขั้นตอนในการทำงานของเทคนิค TaqMan probe real-time PCR.....	34
13 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ rs17401966	48
14 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ยีน KIF1B ในช่วงที่ครอบคลุม rs17401966 กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงในฐานข้อมูลของ GenBank	49
15 รูปแบบการแสดงผล chromatogram ของ rs17401966 ในยีน KIF1B ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยจะแสดงถึงลักษณะทางพันธุกรรมแบบต่างๆ.....	50
16 แสดงความถี่ของแต่ละ genotype และความถี่ของ allele ในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ.....	51-52
17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่ม Tm major.....	55
18 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่ม Tm minor.....	56
19 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่มปริมาณเกลือ MgCl ₂ ทำให้ไม่สามารถแยกสัญญาณของ (AA) และ heterozygous ออกจาก (GG).....	57
20 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่ม Tm minor ทำให้สามารถแยกสัญญาณของ (GG) และ heterozygous ออกจาก (AA).....	58
21 แสดงผลจากการทำ serial dilution เพื่อหาค่าความไวของเทคนิค TaqMan probe real-time PCR.....	59

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวความคิดของการวิจัย	4

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
μl	Microliter
μM	Micromolar
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>p</i> – value	Probability Value
NaOAc	Sodium acetate
NCBI	The National Center for Biotechnology Information

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะเร็งตับปฐมภูมิสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทได้แก่ มะเร็งของเซลล์ตับ hepatocellular carcinoma (HCC) และมะเร็งของท่อน้ำดีในตับ หรือ intrahepatic cholangiocarcinoma [1] โดยส่วนมากของมะเร็งตับปฐมภูมินั้นจะเป็นมะเร็งตับชนิด HCC ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 85 ถึง 90 ของมะเร็งตับปฐมภูมิ [2] และในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงเฉพาะมะเร็งตับชนิด HCC มะเร็งตับเป็นสาเหตุการตายด้วยโรคมะเร็งเป็นอันดับสี่ของโลก [Age-standardized incidence rate (ASR) = 9.9/100,000] มักพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง และมีโอกาสพบได้สูงมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยในประเทศจีนประเทศเดียวมีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับสูงคิดเป็นครึ่งหนึ่งของทั่วทั้งโลก ในประเทศไทยโรคมะเร็งตับพบได้บ่อยที่สุดในเพศชาย (ASR = 40.6/100,000) แต่ในเพศหญิงมักจะพบรองจากมะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูก (ASR=19.9/100,000) [3] และสาเหตุหลักของมะเร็งตับที่พบในประเทศไทยคือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยกว่าร้อยละ 65 ของผู้ป่วยมะเร็งตับมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี [4] การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนั่นส่งผลให้ผู้ป่วยติดเชื้อมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งตับเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เท่าเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ [5] การตรวจวินิจฉัยมะเร็งตับอาจทำได้หลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้ในการตรวจกรองนั้นจะใช้วิธีอัลตราซาวด์ควบคู่กับการเจาะเลือดเพื่อตรวจหาสารบ่งชี้มะเร็งเช่น alpha-fetoprotein (AFP) [1,6] การรักษามะเร็งตับทำได้หลายวิธีด้วยกันไม่ว่าจะเป็นการผ่าตัดตับ การผ่าตัดเปลี่ยนตับ การรักษาด้วยวิธี tumor ablation และ Molecular targeted therapies ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะของโรค ในผู้ป่วยระยะที่มะเร็งยังมีขนาดเล็ก ไม่ลุกลาม และไม่เป็นตับแข็งร่วมด้วยอาจใช้การรักษาโดยการผ่าตัดตับเนื่องจากมีข้อดีคือมีโอกาสหายขาดได้ หรือการรักษาด้วยวิธี tumor ablation ซึ่งจะรักษาดับส่วนที่ไม่ได้เป็นมะเร็งไว้ได้ดี แต่ในผู้ป่วยที่มีก้อนมะเร็งตับมีขนาดใหญ่ไม่สามารถตัดได้หมดหรือกระทั่งมีการแพร่กระจายทางเส้นเลือดแล้วการรักษาด้วยวิธีข้างต้นอาจให้ผลได้ไม่ได้ผลดีเท่ากับผู้ป่วยในระยะที่ไม่มีการลุกลามของมะเร็ง และอาจทำการรักษาประคับประคองเช่น transarterial chemoembolization (TACE) แทน [1,7] การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยมี

ความสำคัญและให้ผลต่อการรักษาเป็นอย่างมาก หากผู้ป่วยได้รับการรักษาในขณะที่ก้อนมะเร็งตัวยังมีขนาดเล็กและไม่แพร่กระจายผู้ป่วยจะมีโอกาสหายมากขึ้นและมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงขึ้น [8] แต่การตรวจวินิจฉัยแต่ละครั้งนั้นก็มิใช่ค่าใช้จ่าย ดังนั้นการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งตับในผู้ที่มีความเสี่ยงนั้นจึงเป็นเรื่องสำคัญ ในการประเมินความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งตับนั้น อาศัยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆที่อาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และซี ร่วมกับการติดเชื้อเอชไอวี ภาวะไขมันสะสมในตับ การดื่มแอลกอฮอล์ การได้รับสารอะฟลาทอกซิน รวมไปถึงปัจจัยทางพันธุกรรม [9]

มีผู้ศึกษา Genome wide association study (GWAS) ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศจีนพบว่า single nucleotide polymorphism (SNP) ที่มีชื่อว่า rs17401966 มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับชนิด HCC ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [10] SNP rs17401966 นี้อยู่ใน intron ที่ 24 ของยีน *kinesin family member 1 B (KIF1B)* บนโครโมโซมที่ 1p36.22 มีการรายงานถึงความสามารถในการเป็นยีนต้านมะเร็ง หรือ tumor suppressor gene เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าเกิดการขาดหายไปของยีน *KIF1B* ในมะเร็งหลายๆชนิดรวมไปถึงมะเร็งตับด้วย [11] อย่างไรก็ตามมีผู้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง rs17401966 กับ การพัฒนาของโรคมะเร็งตับที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มประชากรเกาหลี ญี่ปุ่น ฮองกง และชาวคูไดราเบียแล้วพบว่าrs17401966 นั้นไม่มีความสัมพันธ์ต่อการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [12,13] ความสัมพันธ์ระหว่าง rs17401966 กับ การพัฒนาของโรคมะเร็งตับจึงอาจขึ้นกับความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละเชื้อชาติ

ยังไม่มีผู้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs17401966 กับ การพัฒนาการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศไทย และหากมีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรดังกล่าว จะสามารถนำมาเป็นประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงร่วมกับปัจจัยอื่นๆเพื่อเฝ้าระวังและติดตามผลการรักษาโรคมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังต่อไปในอนาคต ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของ rs17401966 รวมไปถึงความสัมพันธ์ต่อการพัฒนาการเกิดโรคมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชาวไทย

คำถามของการวิจัย (Research Question)

1. ความถี่ของรูปแบบความหลากหลายพันธุกรรม (SNPs) rs17401966 ในกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับกับและกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่มีประวัติการตรวจพบมะเร็งตับมีความแตกต่างกันหรือไม่
2. ความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNPs) rs17401966 มีความสัมพันธ์กับโอกาสการเกิดโรคมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรังหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาความถี่ของรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNPs) rs17401966 ในกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่เป็นและไม่เป็นมะเร็งตับ
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNPs) rs17401966 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง
3. พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ SNP rs17401966 ด้วยวิธี Taqman probe Real-time PCR

สมมติฐาน

1. ความถี่ของรูปแบบความหลากหลายพันธุกรรม (SNPs) rs17401966 ในกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับกับและกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่มีประวัติการตรวจพบมะเร็งตับ มีความแตกต่างกัน
2. ความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNPs) rs17401966 มีความสัมพันธ์กับโอกาสการเกิดโรคมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรัง

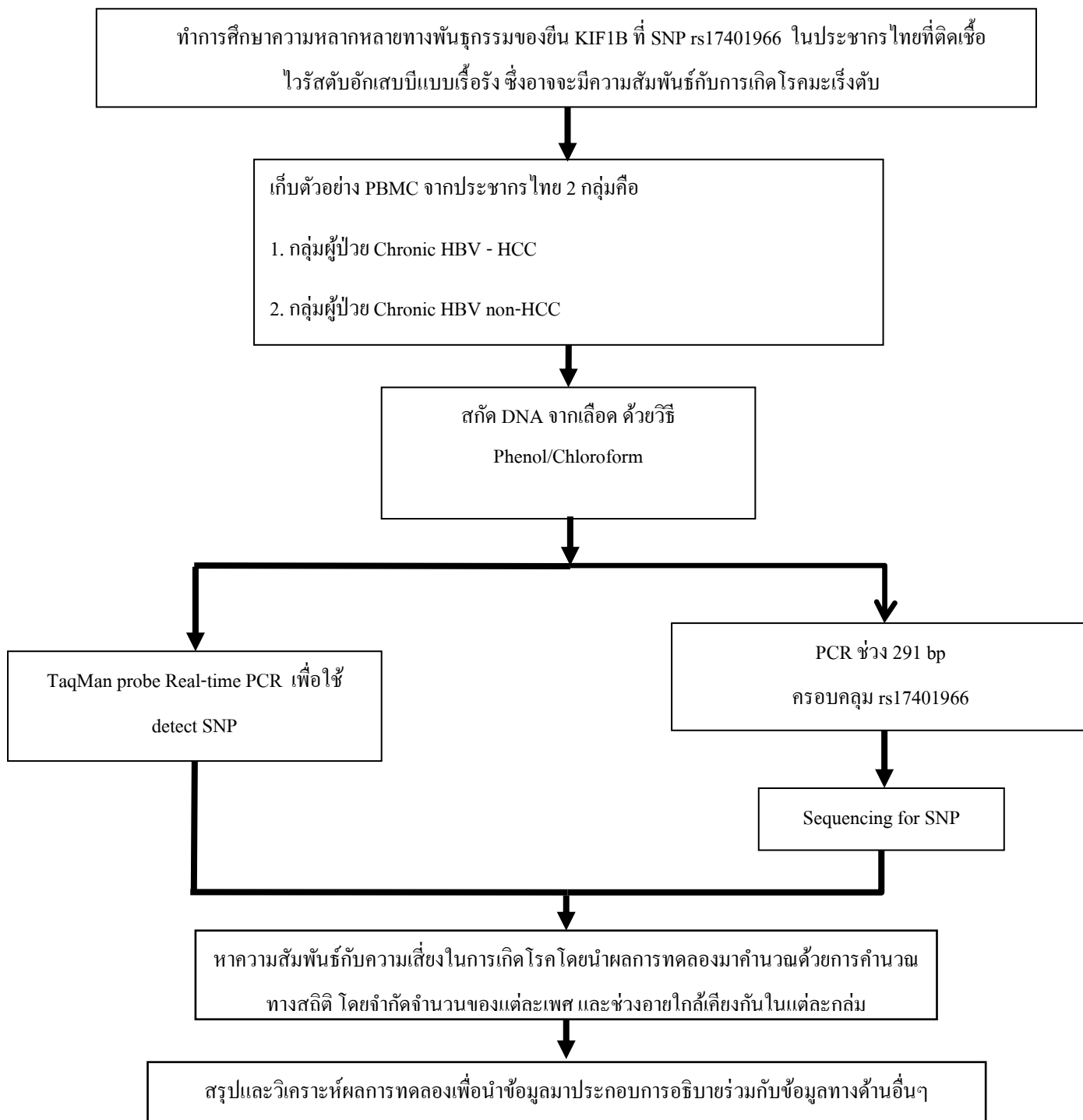
ข้อจำกัดในการวิจัย

ในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสทำให้ปริมาณ DNA ของไวรัสในเลือดมีปริมาณลดต่ำลงมากทำให้ไม่สามารถรวบรวมข้อมูลส่วนนี้จากกลุ่มประชากรตัวอย่างได้

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย

ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง หมายถึง บุคคลผู้มี HBsAg ในกระแสเลือดและสามารถตรวจพบได้

กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



รูปแบบการวิจัย (Research Design)

รูปแบบการวิจัยที่ใช้ในการศึกษาแบบ Analytical case-control study

คำสำคัญ

Hepatocellular carcinoma (HCC)

chronic hepatitis B infection (CHB)

KIF1B

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

rs17401966

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNPs) ในตำแหน่ง rs17401966 กับโอกาสการเกิดโรคมะเร็งตับในประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรังซึ่งสามารถนำไปใช้ในการประเมินความเสี่ยงของผู้ป่วยเพื่อจัดการการรักษาให้เหมาะสมได้ในอนาคต

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (case) คือกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับที่ได้เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

1.2 กลุ่มควบคุม (control) คือ กลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่มีประวัติการตรวจพบมะเร็งตับและได้เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

2. สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol-Chloroform extraction

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)
4. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก PCR ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis
5. ตรวจสอบวิเคราะห์ความหลากหลายพันธุกรรมตำแหน่ง rs17401966 ด้วยวิธีการตรวจหาลำดับเบส
6. พัฒนาวิธีการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมตำแหน่ง rs17401966 ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR
7. รวบรวมและวิเคราะห์ผล

บทที่ 2

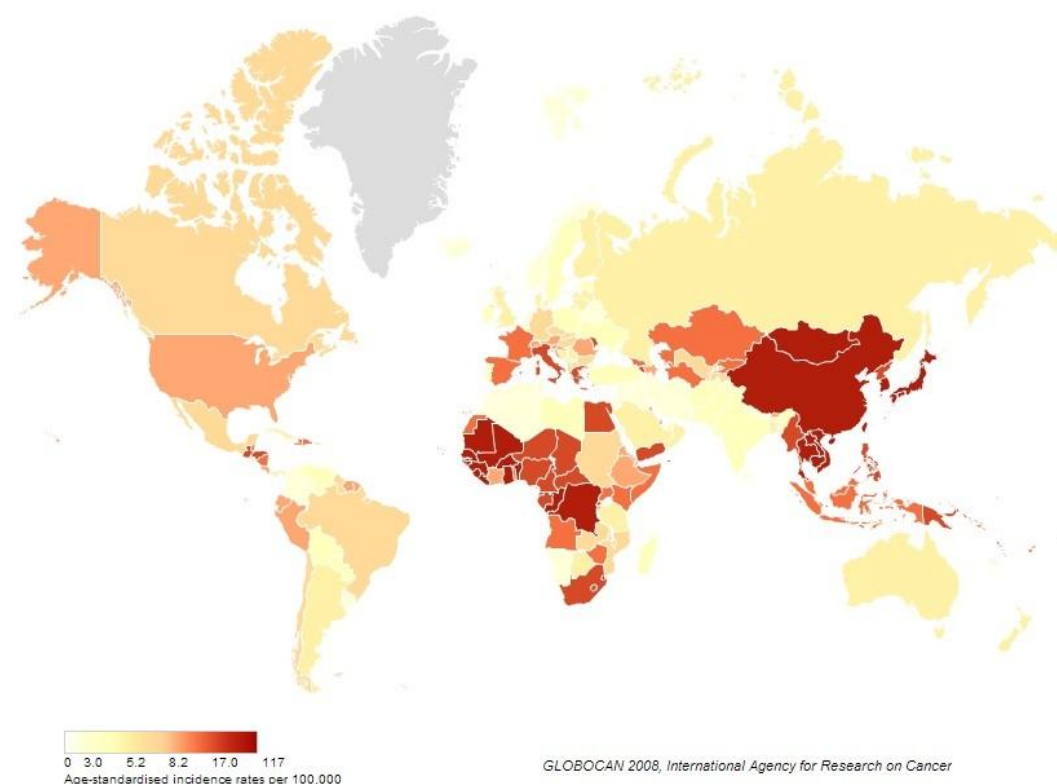
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma; HCC)

มะเร็งตับปฐมภูมิคือมะเร็งที่ถือกำเนิดจากตับเป็นที่แรกโดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดด้วยกันคือ มะเร็งของเซลล์ตับที่เรียกว่า Hepatocellular carcinoma (HCC) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 85 ถึง 90 ของมะเร็งตับปฐมภูมิ [2] มะเร็งตับปฐมภูมิอีกชนิดคือมะเร็งของท่อน้ำดีในตับหรือ intrahepatic cholangiocarcinoma ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่พบได้บ่อยมากในจังหวัดขอนแก่นของประเทศไทย เนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) [14] มะเร็งตับชนิดที่จะพูดถึงต่อไปในการวิจัยนี้คือมะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma

1.ความถี่

โรคมะเร็งตับมักพบได้บ่อยมากในประเทศกำลังพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแอฟริกาและประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ASR = 24.0/100,000) รวมถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ASR = 14.8/100,000) และประเทศที่มีการพบมะเร็งตับสูงที่สุดในโลกหรือคิดเป็นครึ่งหนึ่งของการเกิดมะเร็งตับทั่วโลกคือประเทศจีนเนื่องจากจีนเป็นประเทศที่มีประชากรเป็นจำนวนมาก (402,208 คน, ASR = 25.7/100,00) (ภาพที่ 1) ในชายไทย มะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุด (ASR = 40.6/100,00 คน) แต่ในเพศหญิงมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดคือมะเร็งเต้านมและมะเร็งปากมดลูกตามมาด้วยมะเร็งตับ (ASR = 19.9/100,000) [3]



ภาพที่ 1 แสดงอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งดับทั่วโลก [3]

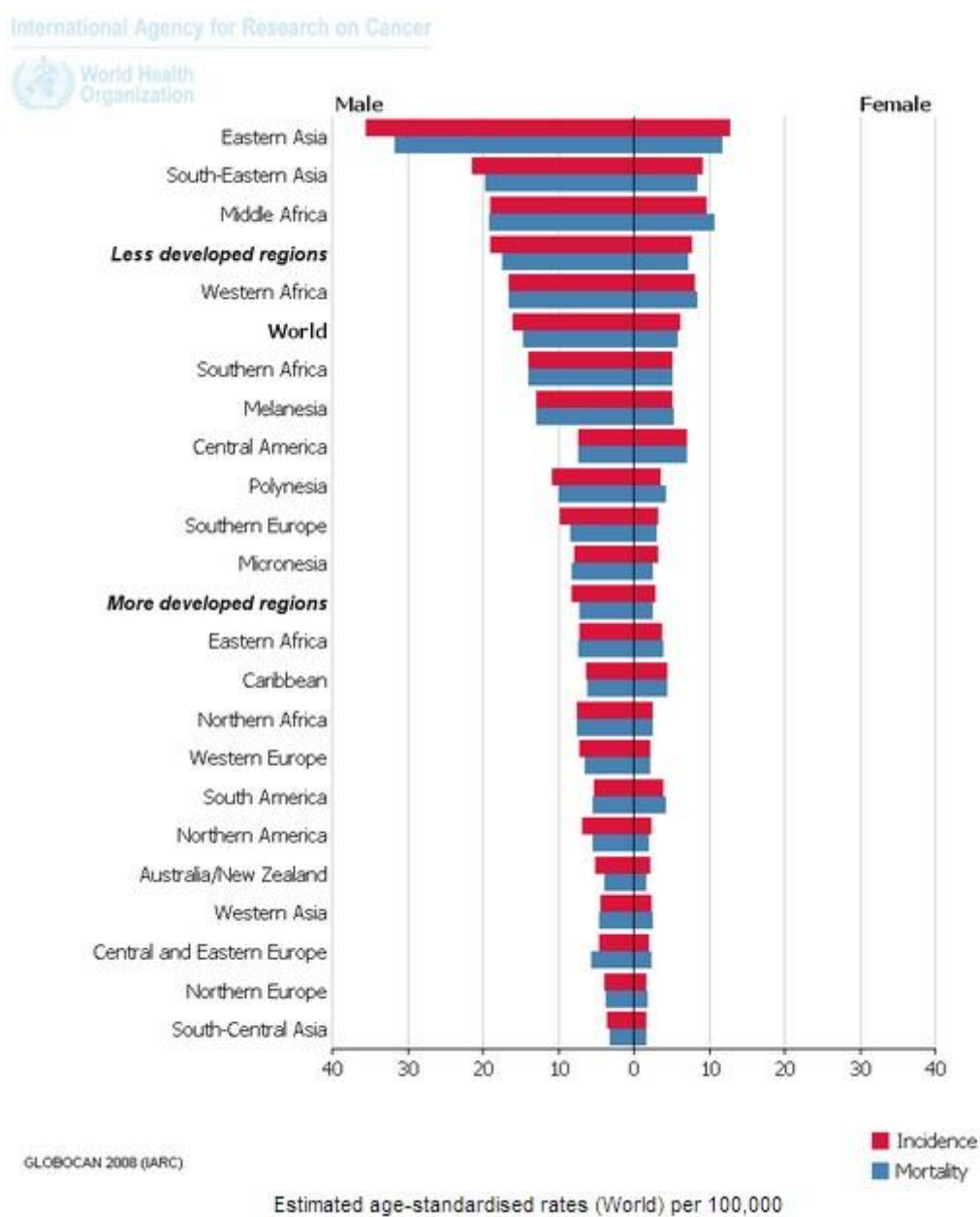
2. เชื้อชาติ

อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งดับมีความแตกต่างกันอย่างมากในหลายเชื้อชาติ ในประเทศสิงคโปร์ที่มีประชากรหลากหลายเชื้อชาติ เช่น จีน อินเดีย และมาเลเซีย อัตราการเกิดมะเร็งดับของประชากรชายที่มีเชื้อชาติจีนนั้นอยู่ที่ 21.21/100,000 คน ในขณะที่ประชากรชายเชื้อชาติอินเดียนั้นมีอัตราการเกิดอยู่ที่ 7.86/100,000 คน [15] และในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าประชากรที่มีเชื้อสายเป็นชาวเอเชียมีอัตราการเกิดมะเร็งดับมากกว่าชาวอเมริกันเชื้อสายแอฟริกา [2]

3. เพศ

มะเร็งดับเป็นโรคที่มักพบในเพศชายได้บ่อยกว่าเพศหญิงโดยเฉลี่ย 2-4 เท่า (ภาพที่ 2) แต่ในยุโรปหลายประเทศพบว่าอัตราการเกิดในเพศชายต่อเพศหญิงเกิน 4.1:1 เท่าเช่นใน สวิตเซอร์แลนด์ (4.1:1) อิตาลี (5.1:1) และฝรั่งเศส (>5.1:1) แต่ในประเทศที่มีความเสี่ยงสูงอย่างประเทศจีนกลับมีอัตราส่วนของอัตราการเกิดโรคมะเร็งดับในเพศชายต่อเพศหญิงอยู่ที่ 3.2:1 เท่า

และในญี่ปุ่นมีอัตราส่วน 3.7:1 เท่า ส่วนในประเทศที่มีการรายงานว่าอัตราส่วนของการเกิดมะเร็ง
 ตับในเพศชายต่อเพศหญิงน้อยที่สุดคือกลุ่มประชากรในอเมริกาใต้ เช่น โคลัมเบีย (1.2:1) และ
 คอสตาริกา (1.6:1) [15] อัตราส่วนการเกิดมะเร็งตับระหว่างเพศชายต่อเพศหญิงในประเทศไทยนั้น
 อยู่ที่ประมาณ 4-5 เท่า [4]



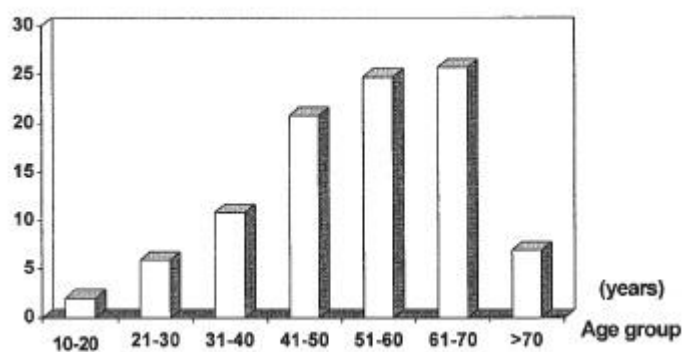
ภาพที่ 2 อัตราส่วนการเกิดโรคมะเร็งตับระหว่างเพศชายและเพศหญิงในแต่ละภูมิภาค [3]

สาเหตุของการมีอัตราส่วนการเกิดมะเร็งที่มากกว่าในเพศชายอาจมาจากการที่เพศชายมีโอกาสได้รับปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับได้มากกว่าเพศหญิง เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในเพศชายมากกว่าเพศหญิง [16,17] การดื่มแอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าปริมาณของ testosterone ในกระแสเลือดยังมีความสัมพันธ์ต่อการก่อให้เกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอีกด้วย [18,19]

4.อายุ

โรคมะเร็งตับนั้นมักจะเกิดในผู้สูงอายุโดยในกลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงต่ำ เช่น ประเทศต่างๆในอเมริกาเหนือผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับมักจะมีอายุ 75 ปีขึ้นไป แต่ในประชากรชาวแอฟริกาที่มีความเสี่ยงสูงจะพบว่ามีความโน้มที่จะพบผู้ป่วยมะเร็งตับได้สูงตั้งแต่ช่วงอายุ 60-65 ปีในเพศชาย และ 65-70 ปีในเพศหญิง [2] ในประเทศไทยมีความโน้มสูงที่จะพบผู้ป่วยมะเร็งตับในช่วงอายุตั้งแต่ 41 ปีขึ้นไปจนถึง 70 ปีและลดลงในผู้ป่วยอายุที่มากกว่า 70 ปีขึ้นไปดังแสดงในภาพที่ 3 ทั้งนี้เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งตับมักจะมาพบแพทย์เมื่อมีอาการของโรครุนแรงแล้วทำให้ไม่อาจให้การรักษาได้ทันทั่วทั้งที่ [1,4]

Percentage of total number of patients (101)



ภาพที่ 3 แสดงช่วงอายุของผู้ป่วยมะเร็งตับ HCC ในประเทศไทย [4]

5.การตาย

ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับมีอัตราการตายที่ค่อนข้างสูงมากเมื่อเทียบกับอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับจากภาพที่ 2 โดยคนไข้มักมีระยะเวลาของการอยู่รอดเฉลี่ย 8-9 เดือนโดยประมาณและยังไปกว่า

นั้นในรายที่แสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงแล้วนั้นระยะเวลาการอยู่รอดเฉลี่ยจะลดลงเหลือเพียง 1 เดือน [20] และจากการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ 102 คน พบว่าหากผู้ป่วยไม่สามารถทำการรักษาได้ด้วยการผ่าตัดตับ การปลูกถ่ายตับ หรือ ethanol injection เนื่องจากอยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมหรือผู้ป่วยอยู่ในระยะ end-stage แล้วจะมีอัตราการรอดชีวิตในช่วง 1,2 และ 3 ปีเป็นร้อยละ 54, 40 และ 28 ตามลำดับ [21]

6. ลักษณะทางคลินิก

ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับมักไม่แสดงอาการอะไรในระยะแรกของโรค ทำให้ผู้ป่วยไม่ได้ตระหนักถึงโรคจนกระทั่งโรคได้พัฒนาไปสู่ระยะท้ายแล้ว และอาการที่มักพบได้บ่อยในผู้ป่วยคือมีอาการปวดแน่นท้อง และจะปวดมากขึ้นเรื่อยๆตามระยะของโรค ในผู้ป่วยบางรายอาจน้ำหนักลดลง มีอาการอ่อนแรง รู้สึกแน่นท้องหลังมีอาหารหรือมีภาวะ anorexia หรือมีอาการท้องมาน คลื่นไส้ อาเจียน ท้องผูก

ในระยะแรกของโรค อาจมีอาการตับโตเล็กน้อยและจะมากขึ้นจนกระทั่งผู้ป่วยสังเกตพบก็เมื่อโรคดำเนินมาถึงระยะที่เป็นมากแล้ว (advance stage) อาการตับโตนั้นอาจเกิดขึ้นได้ในตับซีกซ้ายหรือซีกขวา หรืออาจเกิดทั้งสองซีกพร้อมกันและที่ผิวของตับจะมีอาการผิปกดหรือเป็นปุ่มขึ้นมา อาการกดเจ็บบริเวณตับมักพบได้บ่อยและอาจรุนแรงในบางราย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อผู้ป่วยมีอาการเลือดออกในช่องท้องหรือมีการ necrosis ของก้อนมะเร็ง ในผู้ป่วยร้อยละ 20-50 ที่เข้ารับการรักษามักพบว่ามีอาการท้องมาน (Ascites) ซึ่งมักจะสังเกตได้ชัดเจนตามระยะของโรค แต่ในผู้ป่วยที่มีอาการตับแข็งร่วมด้วยจะสามารถสังเกตอาการท้องมานได้ชัดเจน แม้ผู้ป่วยจะเป็นมะเร็งตับในระยะแรก และอาการท้องมานนี้อาจเกิดได้ทั้งจากภาวะ portal hypertension หรือเกิดจากการลุกลามของมะเร็งไปยังเยื่อช่องท้อง หรือ ไปยังเส้นเลือด portal veins หรือ hepatic veins ในผู้ป่วยบางราย (ร้อยละ 28-48) อาจมีอาการม้ามโตซึ่งเป็นผลมาจากภาวะ portal hypertension และอาจคลำตรวจไม่พบเนื่องจากมีอาการท้องมานและตับที่ขยายโตขึ้นมาก ผู้ป่วยมักมีอาการตัวเหลืองเพียงเล็กน้อยถึงปานกลางแต่จะมีอาการตัวเหลืองมากขึ้นตามระยะของโรค เมื่อพบผู้ป่วยมีอาการตัวเหลืองมักสันนิษฐานว่าเป็น cholangiocarcinoma แต่อย่างไรก็ตามอาการตัวเหลืองอาจเกิดได้จากการลุกลามของมะเร็งตับไปยัง intrahepatic biliary system หรืออาจเกิดจากการตีบตันของท่อน้ำดี

เนื่องจากการขยายตัวของก้อนมะเร็ง ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการไข้ (ร้อยละ 6-54) ซึ่งอาการไข้มักมีไข้ต่ำถึงปานกลางเป็นพักๆ ในผู้ป่วยที่มีสภาวะตับแข็งมาก่อนแล้วจึงเป็นมะเร็งตับมักจะแยกแยะอาการของโรคมะเร็งกับสภาวะตับแข็งได้ยาก จุดสังเกตหนึ่งที่เป็นสัญญาณเตือนถึงโรคมะเร็งตับในผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็งหรือภาวะที่มีเหล็กสะสมในอวัยวะต่างๆจนเป็นพิษ (hemochromatosis) คือการทรุดหนักลงอย่างทันทีทันใดโดยผู้ป่วยอาจมีอาการปวดในช่องท้อง หรือน้ำหนักลด ท้องมาน ตับโตอย่างเด่นชัดทันทีทันใดหรือกระทั่งมีอาการตับวายได้ [22]

7.การวินิจฉัย

การตรวจกรองมะเร็งตับในเบื้องต้นนั้นจะใช้ผลตรวจอัลตราซาวด์ของตับกับการตรวจวัดระดับ Alpha-fetoprotein (AFP) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ตับและ yolk sac ของทารกในช่วง 12-16 สัปดาห์และลดต่ำลงจนไม่แสดงออกอีกในภาวะปกติ แต่จะมีการตรวจพบโปรตีนชนิดนี้ขึ้นได้อีกในระยะที่มีการสร้างเซลล์ตับใหม่เนื่องจากการถูกทำร้ายหรือการผ่าตัด และยังพบได้ในผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรัง ตับแข็ง และมะเร็งบางชนิดรวมไปถึงมะเร็งตับ เกณฑ์ของระดับ AFP ที่ใช้ในการวินิจฉัยนั้นมีตั้งแต่ค่า 20 ng/ml ไปจนถึง 400 ng/ml ซึ่งแต่ละเกณฑ์จะให้ค่าความไวและความจำเพาะแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับแพทย์ผู้ตรวจที่จะใช้เกณฑ์ใด แต่ถ้าผู้ป่วยมีระดับ AFP สูงกว่าปกติและสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ควรสงสัยได้ว่าผู้ป่วยอาจเป็นมะเร็งตับ

การวินิจฉัยมะเร็งตับจะอาศัยผลจากการตรวจกรองในขั้นต้นหากพบว่ามีสัญญาณการเป็นมะเร็งตับ (ระดับ AFP สูงผิดปกติ / ผลอัลตราซาวด์ตรวจพบเนื้องอก) จะต้องทำการตรวจทางรังสีวิทยาด้วยวิธี triple-phase helical CT scan และ / หรือ triple-phase dynamic contrast enhanced MRI ร่วมด้วย หากตรวจด้วยวิธีทั้งสองแล้วพบว่ามีลักษณะ arterial enhancement ตามด้วย delayed hypointensity ใน portal venous จะสามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นมะเร็งตับ แต่ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจพบทั้งสองลักษณะนี้ได้เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งตับร้อยละ 30 จะไม่มีลักษณะดังกล่าว จะต้องใช้การตรวจชิ้นเนื้อตับ (liver biopsy) เพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย ทั้งนี้หากทำการตรวจชิ้นเนื้อตับแล้วให้ผลลบก็ควรตรวจติดตามต่อไปทุก 3-6 เดือนจนกว่าจะพบเนื้องอกหายไป หรือพบว่าเนื้องอกมีขนาดใหญ่หรือมีลักษณะข้างต้น [1]

การตรวจกรองและวินิจฉัยมะเร็งตับในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงนั้นมีความสำคัญมาก เพราะหากสามารถตรวจพบมะเร็งตับได้เร็ว มะเร็งตับยังอยู่ในระยะแรกจะทำให้มีโอกาสรักษาหายขาดได้มากขึ้นและทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น [8] ดังนั้นการประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับด้วยปัจจัยต่างๆไม่ว่าจะเป็นความเสี่ยงจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบชนิดต่างๆ ประวัติครอบครัว การใช้จ่าย รวมไปถึงปัจจัยทางพันธุกรรมจึงเป็นเกณฑ์ที่น่าจะช่วยให้การประเมินความเสี่ยงในผู้ป่วยทำได้ละเอียดมากขึ้น

8.การแบ่งระยะของมะเร็งตับ (Staging of HCC)

การแบ่งระยะของมะเร็งตับนั้นอาจแบ่งได้หลายวิธีเช่น Okuda staging, The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) และ Barcelona-Clinic Liver Cancer (BCLC) ซึ่งทั้งสามวิธีใช้เกณฑ์ต่างกันไป แต่วิธี BCLC เป็นวิธีที่กำลังได้รับความนิยม [1] โดยมีการจัดแบ่งผู้ป่วยตามเกณฑ์ดังตารางที่ 1

ตารางที่1 การแบ่งระยะของมะเร็งตับตามเกณฑ์ของ BCLC [1]

BCLC Staging					
Stage	Classification	PST	Tumor Stage	PHT	Bilirubin
0	Very early	0	Single	No	Normal
A	Early	0	Single	Yes	Normal
		0	Single	Yes	Altered
		0	3x <3 cm	Yes	Altered
B	Intermediate	0	>5 cm or multinodular		
C	Advanced	1-2	Vascular invasion		
D	Terminal	3-4	Any stage		

PST = Performance status; PHT = Portal hypertension

ซึ่งการแบ่งระยะของมะเร็งตับตามเกณฑ์ของ BCLC นี้สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดรูปแบบการรักษาผู้ป่วยได้อย่างเหมาะสม โดยผู้ป่วยในระยะ very early stage และ early stage การรักษาโดยการผ่าตัดตัดตับ (resection) หรือการผ่าตัดเปลี่ยนตับ (liver transplantation) หรือการ

รักษาแบบ tumor ablation อาจสามารถรักษาให้หายขาดได้ ผู้ป่วยที่อยู่ใน Intermediate stage หรือ advance stage อาจจะต้องรักษาแบบประคับประคอง หรือ palliative treatments เพื่อช่วยให้ผู้ป่วยมีชีวิตยืนยาวขึ้น แต่สำหรับผู้ป่วยในระยะ terminal stage อาจทำได้เพียงการรักษาตามอาการ (symptomatic treatment) [1,23]

9. การรักษา

การรักษามะเร็งตับมีหลายวิธีโดยอาจแบ่งได้ดังนี้ การรักษาแบบ radical treatments เป็นการรักษาที่มีโอกาสทำให้หายขาดได้เช่น การผ่าตัดตับ การผ่าตัดเปลี่ยนตับ การทำ tumor ablation บางชนิด และการรักษาแบบประคับประคอง (palliative treatments) ที่เป็นการรักษาที่จะใช้เพื่อให้ผู้ป่วยมีชีวิตยืนยาวขึ้น เนื่องจากผู้ป่วยอยู่ในระยะท้ายๆของโรคแล้ว เช่น TACE

9.1. การผ่าตัดตับ

การผ่าตัดตับเป็นการรักษาที่ทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสหายขาดได้ ทั้งนี้การเลือกใช้วิธีการรักษานี้ควรคำนึงถึงขนาดและจำนวนของมะเร็งตับเพราะหากมะเร็งตับมีขนาดใหญ่หรือมีจำนวนมากจะมีโอกาสสูงที่มะเร็งนั้นจะลุกลามเข้าสู่กระแสเลือดแล้วซึ่งทำให้มีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำ (recurrence) ในตับที่เหลืออยู่ได้อีก นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงสภาวะการทำงานของตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีสภาวะตับแข็งร่วมด้วยเนื่องจากอาจเกิดภาวะตับวายได้ภายหลังการผ่าตัด ดังนั้นวิธีการผ่าตัดจึงเหมาะกับผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ early (BCLC stages 0, A) ที่มีสภาวะการทำงานของตับดีไม่มีสภาวะ portal hypertension (PHT) [1,24]

9.2. การผ่าตัดเปลี่ยนตับ

การผ่าตัดเปลี่ยนตับนั้นนับว่าเป็นการรักษาที่ดีที่สุดในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคตับอื่นๆ ร่วมกับโรคมะเร็งตับเพราะนอกจากจะรักษาโรคมะเร็งตับแล้วยังเป็นการรักษาโรคตับอื่นๆที่เป็นร่วมอยู่ด้วย การรักษาด้วยวิธีนี้ช่วยลดโอกาสกลับมาเป็นซ้ำได้ดีกว่าวิธีการผ่าตัดตับ และควรทำในผู้ป่วยที่มีมะเร็งขนาดน้อยกว่า 5 cm หรือมีมะเร็งไม่เกินสามตำแหน่งแต่ละตำแหน่งมีขนาดไม่เกิน 3 cm และอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่จะทำการผ่าตัดตับ (อาจจะมีการทำงานของตับที่ไม่ดี หรือ

อาจมีภาวะตับแข็ง) [24] ทั้งนี้ถ้าผู้ป่วยมีมะเร็งขนาดใหญ่หรือมีหลายตำแหน่งอาจจะมีการลุกลามของมะเร็งไปยังระบบหมุนเวียนเลือดแล้วซึ่งจะทำให้มีโอกาสกลับมาเป็นซ้ำสูง

9.3. Tumor ablation

เป็นการรักษาที่สามารถทำได้หลายครั้งและหลีกเลี่ยงการทำลายเนื้อตับโดยไม่จำเป็นได้ซึ่งเหมาะสำหรับผู้ป่วยระยะแรกที่มีมะเร็งขนาดเล็กและมีจำนวนน้อยและสถานะไม่เหมาะสมกับการผ่าตัดตับหรือการผ่าตัดเปลี่ยนตับ และวิธีที่เป็นที่นิยมมากคือ Percutaneous ethanol injection (PEI) และ Radiofrequency ablation (RFA)

Percutaneous ethanol injection (PEI)

เป็นการรักษาโดยการฉีดเอทานอลบริสุทธิ์ใส่มะเร็งโดยตรง การรักษาดังวิธีนี้จะใช้การอัลตราซาวด์เป็นการบอกตำแหน่ง และสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (tumor necrosis) ได้มากถึงร้อยละ 70-80 ในกรณีที่มะเร็งมีขนาดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 cm และเกือบจะทำลายเซลล์มะเร็งได้ทั้งหมดในกรณีที่มะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 2 cm การรักษาดังวิธีนี้เป็น การรักษาที่ทำได้ง่าย ผลข้างเคียงต่ำ ให้ผลของการรักษาใกล้เคียงกับการผ่าตัดตับเนื่องจากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาดังวิธีนี้มีอัตราการรอดชีวิตและโอกาสการเกิดมะเร็งซ้ำไม่ต่างจากวิธีการรักษาด้วยการผ่าตัดตับ [1,7]

Radiofrequency ablation (RFA)

RFA เป็นการรักษามะเร็งตับโดยการใช้คลื่นวิทยุที่มีความถี่ประมาณ 480-500 kHz ไปเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสไฟฟ้าและเปลี่ยนเป็นความร้อนเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรงทำให้เกิดการตายของเซลล์ในรัศมี 2-5 cm ในกรณีที่มะเร็งมีขนาดเล็กกว่า 2 cm การรักษาดังวิธีนี้ให้ผลการรักษาไม่ต่างจาก PEI แต่ในกรณีที่มะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 2 cm การรักษาดังวิธี RFA ให้ผลดีกว่า PEI [25] ทำให้ไม่จำเป็นต้องทำการรักษาซ้ำเหมือน PEI ด้วยข้อได้เปรียบของวิธีนี้ทำให้วิธี RFA มีความนิยมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆแทนที่วิธี PEI [1]

9.4. Transarterial chemoembolization (TACE)

การรักษาด้วยวิธีนี้เป็นการรักษาโดยใช้ยาเคมีบำบัดและสารเคมีที่ก่อให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือดโดยฉีดเข้าทางเส้นเลือดแดงของตับ เพื่อให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือดแดงที่ไปเลี้ยงมะเร็งเนื่องจากกว่าร้อยละ 85 ของเลือดที่ไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งเป็นเลือดที่มาจากเส้นเลือดแดง ซึ่งการรักษาด้วยวิธีนี้ให้ผลตอบสนองเพียงร้อยละ 15-55 เท่านั้นและยังอาจส่งผลข้างเคียงที่ทำให้การทำงานของตับลดประสิทธิภาพลงได้ และผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยคือ post-embolization syndrome ซึ่งผู้ป่วยจะมีไข้ ปวดท้อง และระดับของเอนไซม์ Alanine transaminase (ALT) เพิ่มขึ้นชั่วคราว จึงเหมาะสำหรับผู้ป่วยที่มีการทำงานของตับค่อนข้างดี หรือผู้ป่วยที่ไม่สามารถทำการรักษาได้ด้วยการผ่าตัดตับ หรือ RFA แม้ว่า การรักษาด้วยวิธี TACE นี้ อาจมีโอกาสรักษาให้หายขาดได้ต่ำ แต่สามารถทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตรอดยืนยาวขึ้น โดยมีอัตราการรอดชีวิตที่ 1, 2, 3 และ 5 ปีอยู่ที่ร้อยละ 82, 47, 26, 16 ตามลำดับ [1,24]

10. ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งตับ

ผู้ป่วยมะเร็งตับกว่าร้อยละ 80 มีประวัติการเกิดสภาวะตับแข็งซึ่งมักจะพบว่ามีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง หรือสภาวะไขมันสะสมในตับ (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) หรือการดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำ ซึ่งสาเหตุหลักในไทยนั้นคือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

10.1. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังนั้นพบได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งตับในไทย (ประมาณร้อยละ 65) [4] และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและผู้ที่ไม่ติดเชื้อ พบว่าผู้ติดเชื้อมีความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับมากกว่าถึง 20 เท่า [5] โดยมีระยะการดำเนินของโรคตั้งแต่การติดเชื้อจนเป็นมะเร็งตับเฉลี่ยอยู่ที่ 30-40 ปี [1] ซึ่งกลไกในการดำเนินไปสู่โรคมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนี้จะพูดถึงในหัวข้อถัดไป

10.2. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีพบได้ในผู้ป่วยมะเร็งตับในไทยร้อยละ 10-20 [4] และก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับมากกว่าผู้ที่ไม่ติดเชื้อประมาณ 8 เท่าและจะพบมะเร็งตับได้บ่อยในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีที่มีอายุประมาณ 40-49 ปี [26] และการติดเชื้อร่วมกับไวรัสตับอักเสบบีส่งผลให้ผู้ติดเชื้อมีความเสี่ยงต่อการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับประมาณ 26 เท่า ซึ่งใกล้เคียงกับผลรวมของความเสี่ยงจากการติดเชื้อแต่ละชนิด แต่บางรายงานพบว่าการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับแบบออกฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect) [27]

10.3. แอลกอฮอล์

ในผู้ที่ดื่มแอลกอฮอล์ปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง (มากกว่า 80 กรัมต่อวัน เป็นเวลากว่า 10 ปี) จะมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่าและความเสี่ยงนี้จะไม่ลดลงแม้ว่าจะงดเว้นจากการดื่มแอลกอฮอล์แล้วก็ตาม โดยที่ความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับนี้อาจไม่จำเป็นต้องเกิดผ่านภาวะตับแข็งก่อนก็ได้ ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีการดื่มแอลกอฮอล์จะทวีคูณความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับเมื่อเทียบกับผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีที่ไม่ดื่มแอลกอฮอล์ อีกทั้งยังทำให้การดำเนินของโรคไปสู่มะเร็งตับได้เร็วขึ้นและอาการรุนแรงขึ้นอีกด้วย ในสหรัฐอเมริกาการดื่มแอลกอฮอล์ปริมาณมากจัดเป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งตับ (ร้อยละ 32-45 ของผู้ป่วยมะเร็งตับ) [28] และมีการศึกษาพบว่า การได้รับโฟเลต (folate) ในปริมาณมากอาจมีส่วนช่วยในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งตับที่สัมพันธ์กับการดื่มแอลกอฮอล์ [29] และกลไกอย่างหนึ่งของการเกิดมะเร็งคือเมื่อแอลกอฮอล์ถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 จะได้ acetaldehyde ซึ่งเป็นสารที่ไม่เสถียรและจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งเป็นพิษสูง และอันตรายต่อชีวโมเลกุลต่างๆในเซลล์เช่น ดีเอ็นเอ เป็นต้น [1,30]

10.4. ภาวะไขมันสะสมในตับ

ภาวะไขมันสะสมในตับก่อให้เกิดการอักเสบของตับหรือที่เรียกว่า non-alcoholic steatohepatitis (NASH) ซึ่งหากเกิดการอักเสบของตับแบบเรื้อรังจะส่งผลให้มีการสร้างเซลล์ตับใหม่ขึ้นมาทดแทนแต่กระบวนการนี้ก่อให้เกิดการสร้าง extracellular matrix ขึ้นมาด้วยจนกลายเป็น

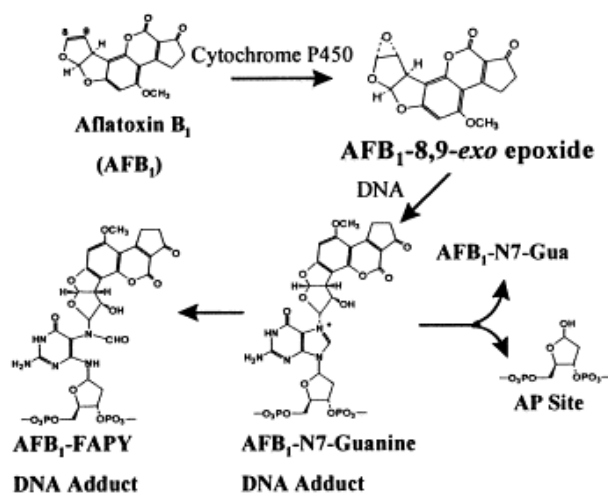
พังผืดส่งผลให้ตับด้อยประสิทธิภาพในการทำงานลงและเมื่อถึงระยะที่ไม่สามารถสลาย extracellular matrix ได้จะเกิดภาวะตับแข็งขึ้นซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนากลายเป็นมะเร็งตับในที่สุด

10.5. ตับแข็งจากสาเหตุอื่น

ภาวะตับแข็งอาจเกิดได้จากโรคที่ก่อให้เกิดการอักเสบของตับแบบเรื้อรังต่างๆ นอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นตัวอย่างเช่น hemochromatosis, autoimmune hepatitis และ primary biliary cirrhosis เป็นต้น

10.6. สารอะฟลาทอกซิน (aflatoxin)

สารชนิดนี้ถูกสร้างจากเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus flavus* ที่มักจะปนเปื้อนในอาหารประเภทถั่ว กระจงเห็ด พริกแห้งและข้าวโพด สารอะฟลาทอกซิน ถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งในคน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อะฟลาทอกซินบี 1 (AFB₁) เมื่อเข้าสู่ร่างกายเอนไซม์ในตับออกซิไดซ์เป็น AFB₁-exo-8,9-epoxide ซึ่งมีความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอได้เป็น AFB₁-N7-guanine DNA adduct [31] ดังภาพที่ 4 ซึ่งจะก่อให้เกิดการเข้าคู่กันผิดพลาดแบบ transversions นำไปสู่การกลายพันธุ์ในระดับ DNA ในเบสตำแหน่งที่ 3 ของ codon ที่ 249 ของยีน p53 จาก AGG ไปเป็น AGT ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากอาร์จินีน (Arginine, Arg, R) ไปเป็นเซอรีน (Serine, Ser, S) [32,33]



ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของ aflatoxin B1 [31]

และมีรายงานว่า การกลายพันธุ์ R249S ในยีน *p53* นี้เกิดขึ้นในเซลล์ตับปกติของผู้ป่วยมะเร็งตับในประเทศที่มีการปนเปื้อนของ AFB1 สูง [34,35] และในผู้ที่ตรวจพบ AFB1 adduct ในปัสสาวะจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งสูงขึ้น 9 เท่า และในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความเสี่ยงสูงขึ้น 7 เท่า แต่ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและตรวจพบ AFB1 adduct จะมีความเสี่ยงเพิ่มสูงขึ้นถึง 60 เท่าซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ (multiplicative model) [36] แต่ก็มีการศึกษาอื่นพบว่าผลที่ได้เป็นแบบผลรวมของทั้งสองปัจจัย [37]

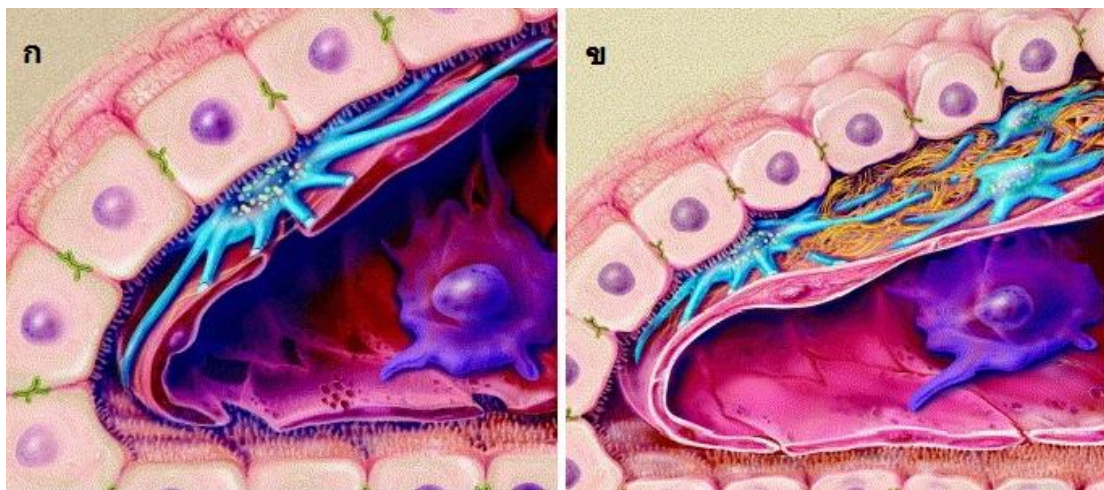
11. ขั้นตอนและกลไกการเกิดมะเร็งตับ

การเกิดมะเร็งตับนั้นมีความซับซ้อนมีหลายขั้นตอนและอาศัยปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน เช่น ปัจจัยต่างๆที่กล่าวถึงในขั้นต้น ปัจจัยทางพันธุกรรม และสภาพแวดล้อมต่างๆ โดยผู้ป่วยมักจะเกิดสภาวะตับแข็งก่อนแล้วจึงพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับ และมีผู้ป่วยเพียงส่วนน้อยที่เกิดมะเร็งตับได้โดยไม่ผ่านการเกิดสภาวะตับแข็ง

11.1. กระบวนการการเกิดตับแข็ง

เมื่อเซลล์ตับถูกทำลายจะมีการสร้างเซลล์ตับใหม่มาทดแทน ซึ่งกระบวนการในการสร้างเซลล์ทดแทนและกระบวนการของการถูกทำลายซ้ำไปมานี้จะกระตุ้นให้ hepatic stellate cells (HSC) ซึ่งปกติจะอยู่ในสภาวะสงบ ทำหน้าที่สะสมวิตามินเอและเป็น antigen-presenting cell ในเนื้อเยื่อตับ [38] ให้อยู่ในรูป active ซึ่งจะสร้าง extracellular matrix (ECM) ขึ้นมาทำให้เกิดเป็นพังผืดในตับ (fibrosis) และจะมี matrix metalloproteinases (MMPs) ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณ ECM ย่อยสลาย collagen [39] แต่ถ้ามีการอักเสบหรือการถูกทำลายซ้ำอย่างต่อเนื่องจน ณ จุดๆหนึ่ง MMPs จะไม่สามารถขจัด ECM ได้ต่อไปเกิดเป็นสภาวะตับแข็ง (cirrhosis) อีกทั้งเซลล์ตับที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ยังสูญเสีย microvilli และขนาดของ space of Disse ที่เล็กลง ทั้งหมดนี้ส่งผลให้ตับสูญเสียการทำงานปกติไป (ภาพที่ 5) โดยอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่มีสภาวะตับแข็งนั้นมีความหลากหลายมากตั้งแต่ไม่มีอาการใดๆทั้งสิ้น ไปจนถึงภาวะตับวาย และร้อยละ 40 ของผู้ป่วยตับแข็งมักจะไม่มีอาการอะไรนานนับสิบปี แต่ถ้าโรคดำเนินไปจนมีภาวะแทรกซ้อนแล้วการรักษาจะยิ่งยุ่งยากขึ้น [40] และในกระบวนการอักเสบซ้ำๆและการเร่งให้เกิดการแบ่งเซลล์ยังเพิ่มโอกาสผิดพลาดในการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอและระยะเวลาในการตรวจสอบและซ่อมแซมความ

ผิดปกติของดีเอ็นเอลดลงและการที่ดีเอ็นเอต้องเพิ่มจำนวนจำเป็นต้องแยกจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวทำให้มีโอกาสสัมผัสกับปัจจัยก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) ต่างๆรวมถึงสารอนุมูลอิสระที่สามารถทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆรวมถึงดีเอ็นเอได้มากขึ้นความผิดปกติทางพันธุกรรมเหล่านี้หากสะสมไปเรื่อยๆจะทำให้เซลล์กลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างดับปกติกับดับที่ถูกทำลาย (ก) เป็นโครงสร้างของดับปกติซึ่ง stellate cell และจะมี extracellular matrix เพียงเล็กน้อย (ข) เมื่อดับถูกทำลาย cytokine จากกระบวนการอักเสบจะกระตุ้นให้ stellate cell เพิ่มจำนวนและเปลี่ยนไปอยู่ในสถานะ active [40]

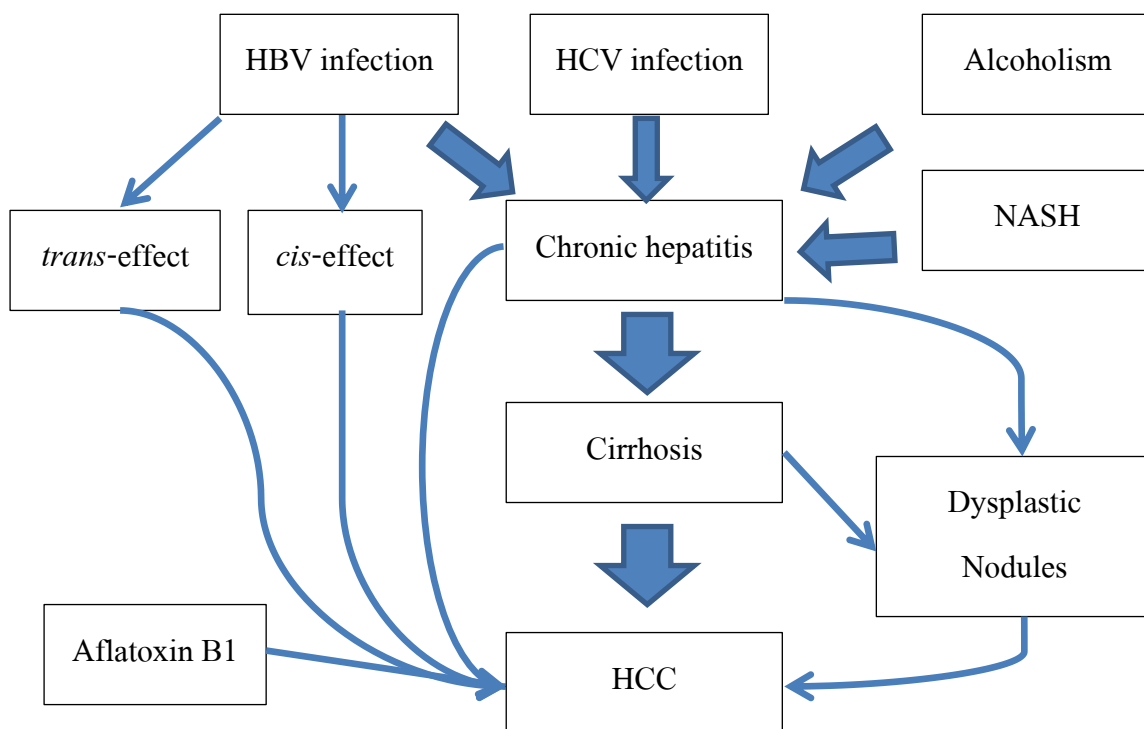
11.2. กระบวนการเกิดมะเร็งตับโดยไม่เกี่ยวกับภาวะตับแข็ง

แม้ว่าร้อยละ 80-90 ของผู้ป่วยมะเร็งตับจะมีภาวะตับแข็ง แต่ผู้ป่วยมะเร็งตับบางส่วนอาจไม่มีภาวะตับแข็งเลยก็ได้ ส่วนในผู้ที่มิตับเป็นปกติไม่มีการอักเสบหรือการทำงานผิดปกติหรือพังผืดตับเลยนั้นมีโอกาสเกิดมะเร็งตับได้น้อยมาก และไม่ว่าผู้ป่วยจะมีภาวะตับแข็งหรือไม่ แต่ถ้าผู้ป่วยมีความผิดปกติในการทำงานของตับและเป็นโรคตับเรื้อรังแล้ว มักจะเกิดการพัฒนากลายเป็นมะเร็งตับได้ในที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ซึ่งมีกลไกในส่วนของไวรัสในการกระตุ้นให้เกิดการกลายเป็นมะเร็ง [41] โดยกลไกแรกคือการแทรกจีโนมของไวรัสลงบนโครโมโซมของเซลล์ตับซึ่งจัดเป็น *cis-effect* การแทรกตัวของ regulatory sequence ของไวรัสลงในบริเวณใกล้เคียงกับ oncogenes หรือ tumor-suppressor genes ซึ่งอาจทำให้การแสดงออกของยีนเหล่านี้ผิดปกติไปจากเดิมส่งผลกระทบถึงการทำหน้าที่ของยีนนั้นๆ

[42] มีรายงานว่าชิ้นส่วนที่ถอดรหัสให้ปลายอะมิโน (N-terminal) ของยีน *cyclin A* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ที่สำคัญถูกแทนที่ด้วยดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีช่วง PreS/S และ promoter ส่งผลให้โปรตีนที่ถูกถอดรหัสขึ้นนี้ไม่สามารถสลายได้ [43] และส่งผลให้เกิด transformation ได้ [44] นอกจากนี้ จีโนมของไวรัสตับอักเสบบียังมีการแทรกตัวลงบนโครโมโซม 17p บริเวณใกล้เคียงกับยีน *p53* ซึ่งเป็นบริเวณที่มักจะมีการสูญหายไป หรือพบว่าการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมส่วนนี้ในเซลล์มะเร็งตับ [45,46] นอกจากนี้ยังมียีนที่สำคัญต่อการควบคุมวัฏจักรเซลล์อีกหลายยีนที่ถูกรบกวนด้วยการแทรกตัวของจีโนมของไวรัส และไม่เพียงแต่กลไกที่เป็น *cis-effects* ของไวรัสตับอักเสบบีเท่านั้น แต่ *trans-effects* ยังส่งผลต่อการรบกวนการควบคุมวัฏจักรเซลล์จนนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้อีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น PreS2 activators ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จาก surface gene ORF ของไวรัสตับอักเสบบีประกอบไปด้วยส่วน PreS1, PreS2 และ S การถอดรหัสของยีนนี้ให้โปรตีนออกมาหลายรูปแบบแต่มีเพียง Large hepatitis B surface protein (LHBs) และ truncated middle size hepatitis B surface protein (MHBs) เท่านั้นที่แสดงสมบัติการเป็น trans activator [47,48] โดย การไปกระตุ้น AP-1 และ NF- κ B ซึ่งเป็น transcription factor ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการ apoptosis และการส่งสัญญาณภายในเซลล์ [49,50] จึงทำให้ PreS2 activators มีสมบัติในการเพิ่มอัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์ตับได้ [47] อีกตัวอย่างของ trans-effect จากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีคือ Hepatitis B virus X protein (HBx, HBxAg) มีการศึกษาพบการสะสมของ HBx ในมะเร็งตับ [51] และในการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการแสดงออกของ HBx มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ [52] และมีผลต่อกลไกการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย [53] และ HBx ยังสามารถจับกับโปรตีน p53 ส่งผลยับยั้งความสามารถในการเข้าจับกับดีเอ็นเออย่างจำเพาะของ p53 [54] แต่มีการศึกษาที่ให้ผลแย้งกันพบว่าการจับกันของ HBx และ p53 ไม่ได้ส่งผลให้ความสามารถในการเข้าจับกับดีเอ็นเอของ p53 ลดลงหากแต่ HBx ที่จับอยู่กับ p53 ไปขัดขวางกลไกในการถอดรหัสที่ p53 มีบทบาท [55] และ HBx ยังสามารถเปลี่ยนการส่งสัญญาณของ Transforming Growth Factor (TGF)- β ทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งได้ [56]

11.3. การบวนการเกิด dysplastic nodules

ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง หรือผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็งมีโอกาสที่จะเกิด liver cell dysplasia (LCD) ได้ ซึ่ง LCD นี้แบ่งได้เป็นขนาดใหญ่และขนาดเล็ก และมีโอกาสพบได้ (ร้อยละ 30 และ 25) จากการตรวจชิ้นเนื้อตับในคนไข้ที่เป็นโรคตับเรื้อรังจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและไวรัสตับอักเสบซี [57] ในผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็งนั้นมักจะพบการเกิด dysplastic nodules ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างจากเนื้อเยื่อพื้นของตับทั่วไปทั้งขนาด สี รูปร่าง และผิวหน้าตัด dysplastic nodules นี้แบ่งได้เป็น low grade (LGDN) และ high grade (HGDN) และ HGDN นี้มีลักษณะใกล้เคียงกับมะเร็งตับคือมีการขยายขนาด อยู่เป็นกลุ่ม มีนิวเคลียสที่ผิดปกติ แต่ยังไม่เพียงพอที่จะจำแนกว่าเป็นมะเร็งได้ [58]



ภาพที่ 6 แสดงกลไกในการเกิดมะเร็งตับ (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 1)

ด้วยขั้นตอนและกลไกที่กล่าวมาจะเห็นถึงความซับซ้อนของขั้นตอนและปัจจัยในการเกิดมะเร็งตับ ซึ่งอาจสรุปได้ดังภาพที่ 6

ไวรัสตับอักเสบ (hepatitis virus)

โรคตับอักเสบ (hepatitis) ซึ่งเป็นภาวะที่เซลล์ตับถูกทำลายและแบ่งตามระยะเวลาของการดำเนินโรคได้ 2 แบบคือ ภาวะตับอักเสบเฉียบพลัน (acute hepatitis) และภาวะตับอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis) โดยสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคตับอักเสบนั้นคือการติดเชื้อไวรัส ซึ่งสามารถแบ่งตามความจำเพาะของการติดเชื้อได้ 2 ประเภทคือ กลุ่มของไวรัสที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของระบบต่างๆ (systemic infection) แต่มีการติดเชื้อที่ตับร่วมด้วย เช่น herpes simplex virus, Epstein-Barr virus และ ไวรัสไข้เลือดออก (dengue virus) และกลุ่มของไวรัสที่จำเพาะต่อการติดเชื้อที่ตับ (hepatic tropism) ซึ่งได้แก่ ไวรัสตับอักเสบ เอ บี ซี ดี อี และ จี รวมไปถึง ไวรัสทีที (TT virus; TTV) และ ไวรัสเซน (SEN virus)

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus; HBV)

ไวรัสตับอักเสบบีตรวจพบครั้งแรกจากตัวอย่างเลือดของชนเผ่าอะบอริจินโดยบังเอิญโดย Professor Baruch Blumberg ในปีพ.ศ. 2508 และไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในมนุษย์เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น DNA ถูกจัดอยู่ในตระกูล (Family) Hepadnaviridae จีนัส (Genus) Orthohepadnavirus โดยสามารถแบ่งอนุภาคของไวรัสเป็น 3 ประเภท ได้แก่ อนุภาครูปทรงกลม (spherical particle) รูปแท่ง (filamentous particle) และอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (Dane particle or complete viral particle) และเฉพาะ Dane particle เท่านั้นที่มีความสามารถในการแพร่เชื้อได้ เนื่องจากมีสารพันธุกรรมของไวรัสบรรจุอยู่ภายใน

ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี

สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็น DNA สายคู่แบบวงกลมไม่สมบูรณ์และเป็น relaxed-circular DNA (rcDNA) ที่มีสายบวก (plus strand) ซึ่งมีความยาวร้อยละ 20-80 ของสายลบ และสายลบมีความยาวประมาณ 3215 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นกับจีโนมไทป์และประกอบไปด้วย 4 open reading frames (ORFs) ที่เหลื่อมซ้อนกันอยู่ (ดังภาพที่ 7) ได้แก่

1. preS/S ORF

เป็นส่วนของโครงสร้างพันธุกรรมที่ประกอบไปด้วยส่วน preS1/preS2/S ซึ่งจะมี start codon ทั้งหมด 3 ตำแหน่งด้วยกันจึงสามารถถอดรหัสออกมาได้โปรตีน 3 รูปแบบคือ small surface protein, middle surface protein และ large surface protein ซึ่งทั้งสามรูปแบบจะมีปริมาณต่าง ๆ กัน โดย small protein จะมีปริมาณมากที่สุดประมาณร้อยละ 90 และ middle protein มีประมาณร้อยละ 10 และ large protein ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดแต่ปริมาณน้อยที่สุดคือประมาณร้อยละ 1-2 โดยสัดส่วนของโปรตีนแต่ละชนิดก็จะไม่เท่ากันในอนุภาคไวรัสแต่ละประเภท โดยในอนุภาคไวรัสที่ไม่สมบูรณ์มักจะพบเฉพาะ small protein เป็นส่วนใหญ่ และมี middle protein เป็นส่วนประกอบเล็กน้อยแต่จะไม่พบ large protein โดยอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์จะมี small protein เป็น 4 เท่าของ middle protein และ large protein

Small hepatitis B surface protein (SHBs)

เป็นโปรตีนรูปแบบที่พบได้มากที่สุดที่ได้จากส่วนของ S gene มีกรดอะมิโนทั้งสิ้น 226 ตำแหน่งและขนาดของโปรตีนก่อนทำการเติมหมู่ น้ำตาลมีขนาด 24 kDa และหลังเติม น้ำตาลมีขนาด 27 kDa และมีบริเวณที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีตามการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ (serotype) โดยในกรดอะมิโนช่วงตำแหน่งที่ 121-149 ที่เรียกว่า a determinant จะมี disulphide bond อยู่สองตำแหน่งระหว่างตำแหน่งที่ 124 กับ 137 และระหว่างตำแหน่งที่ 139 กับ 147 และยังสามารถแบ่งเป็น sub-determinant ได้ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของกรดอะมิโนในแต่ละ serotype

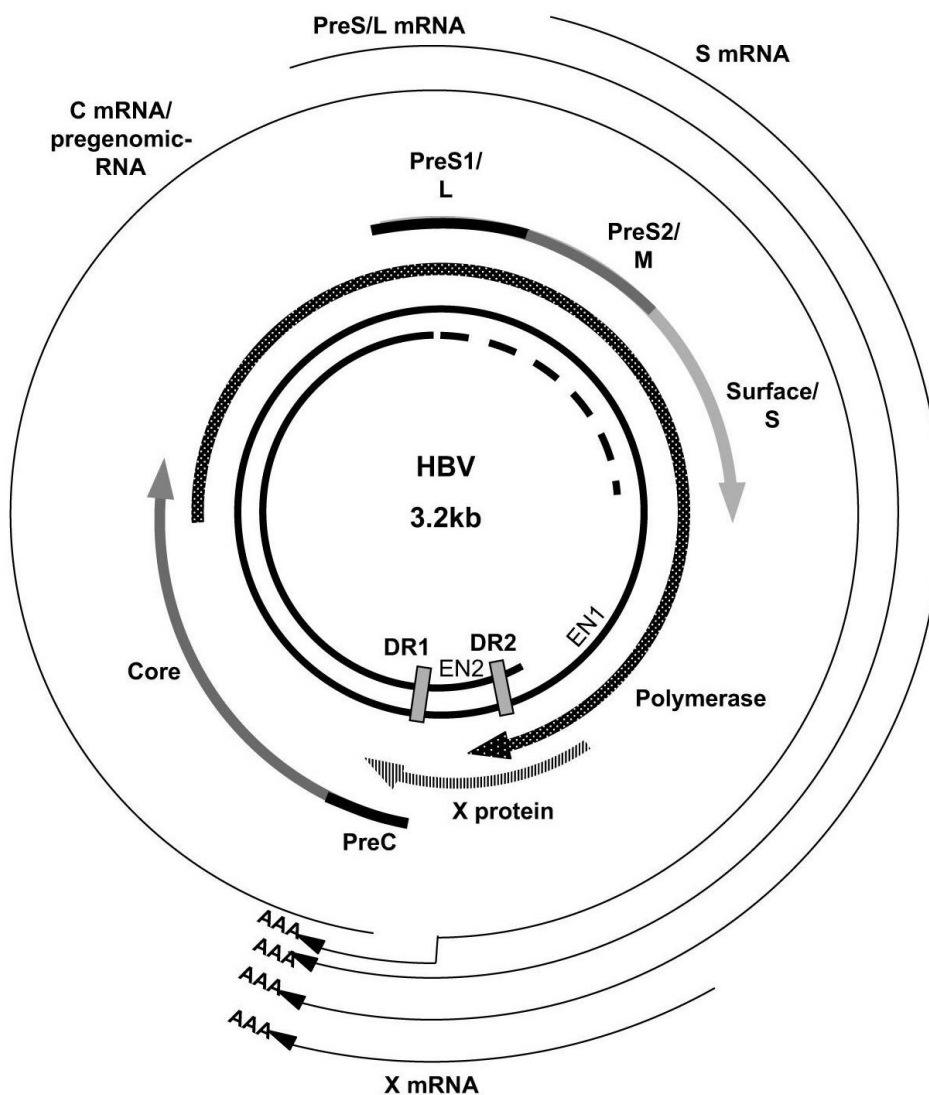
determinant	residue	amino acid
a	121-149	-
d	122	K (Lysine)
y	122	R (Arginine)
w	160	K (Lysine)
r	160	R (Arginine)

Middle hepatitis B surface protein (MHBs)

เป็นโปรตีนที่สร้างจากส่วนของ preS2 และ S gene มีทั้งสิ้น 281 residue ขนาดประมาณ 30 kDa

Large hepatitis B surface protein (LHBs)

สร้างจาก preS1, preS2 และ S gene มีขนาดใหญ่ที่สุดในรูปแบบทั้งหมดมี 389-400 residue ซึ่งขึ้นกับสายพันธุ์ของไวรัส และเป็นรูปแบบเดียวที่พบบนอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ และมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของ transcription factors บางชนิดได้ [48]



ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี [42]

2. C ORF

เป็นส่วนของรหัสพันธุกรรมที่ถอดรหัสได้โปรตีนสองชนิดคือ core protein และ HBeAg โดย ช่วง precore/core gene และมีปลายทางด้าน 5' และ 3' ซ้อนเหลื่อมกับปลายของ X ORF และ P ORF ตามลำดับ ในส่วนของ core protein หรือ HBcAg นั้นมีหลายขนาดประมาณ 21 kDa มีกรดอะมิโนตั้งแต่ 183, 185 และ 195 residue เมื่อรวมกับสารพันธุกรรมของไวรัสจะเรียกว่า nucleocapsid ซึ่งจะทำให้สารพันธุกรรมของไวรัสไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ ส่วน HBeAg พบว่าเริ่มถูกสร้างตั้งแต่ช่วง precore มีกรดอะมิโน 149 หรือ 151 residue ขึ้นกับสายพันธุ์ น้ำหนัก 15-18 kDa สันนิษฐานกันว่ามีผลทำให้ไวรัสทนทานต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ปัจจุบัน HBeAg ถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ระยะของไวรัส [1]

3. P ORF

เป็นส่วนที่ถอดรหัสให้เอนไซม์ polymerase มีขนาดประมาณ 90 kDa และประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 800 residue เป็น ORF ที่ขนาดใหญ่ที่สุด และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส มีการศึกษาพบว่า reverse transcriptase ที่ถูกสร้างขึ้นมีบริเวณที่สัมพันธ์กับการดื้อยา lamivudine ของไวรัส [1]

4. X ORF

X ORF สามารถถอดรหัสให้ HBx ซึ่งมีขนาด 17 kDa และมีกรดอะมิโน 154 residue ปัจจุบันมีการศึกษาถึงสมบัติต่างๆ ของ HBx นี้ต่อการเกิดพยาธิสภาพและกลไกในการเกิดมะเร็งตับ ดังที่กล่าวมาในหัวข้อข้างต้น

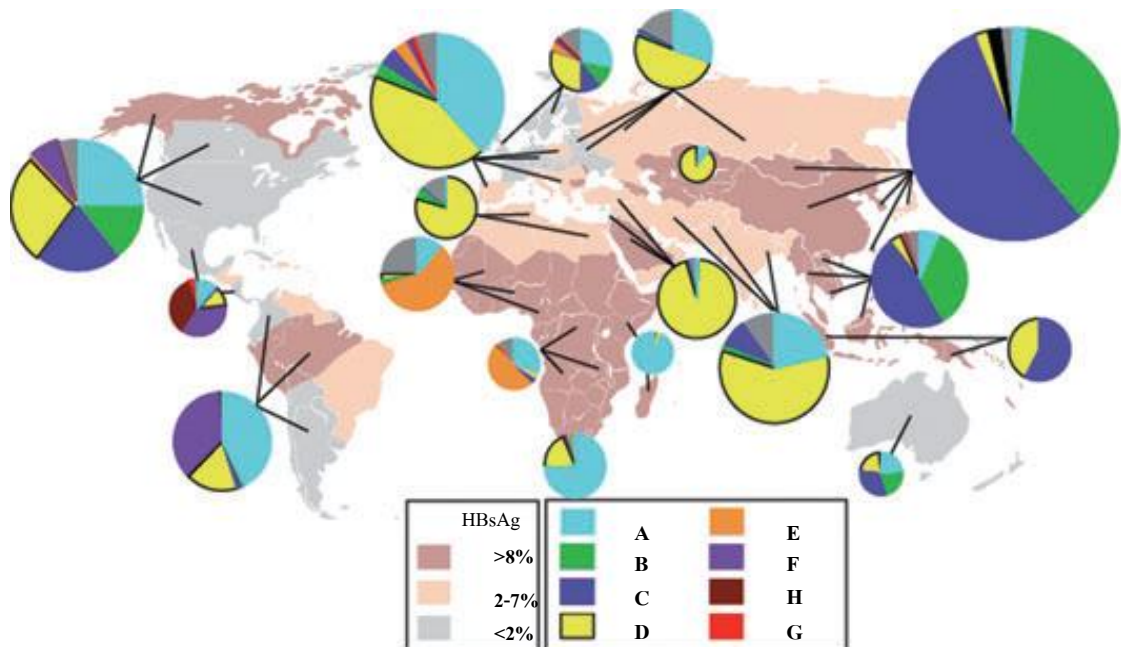
การเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบี

การเข้าสู่เซลล์ของไวรัสตับอักเสบบีจะอาศัย receptor บนเซลล์ตับเป็นตัวช่วย โดยเมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์และจีโนมของไวรัสเข้าสู่นิวเคลียสแล้วจะมีการสร้างสายดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (เต็มสายบวกให้เต็มสาย) มีลักษณะเป็น supercoiled DNA ที่เรียกว่า covalently closely circular DNA (cccDNA) ซึ่งจะประกอบด้วย histone protein และ โปรตีนอื่นๆ ได้โครงสร้างที่เรียกว่า

minichromosome ซึ่งจะใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง mRNA ของไวรัสต่อไป โดยเอนไซม์ RNA polymerase II ของเซลล์ตับจะทำการถอดรหัส ได้ pregenomic RNA (pgRNA) ซึ่งจะกลายเป็นต้นแบบในการสร้างดีเอ็นเอสายลบโดย RNA-dependent DNA polymerase จากนั้น pgRNA จะถูกย่อยด้วย ribonuclease H เมื่อได้ดีเอ็นเอสายลบมาเป็นต้นแบบจะมีการสร้างดีเอ็นเอสายบวกที่มีความยาวประมาณครึ่งหนึ่งของสายลบ แล้วรวมกับ core protein ได้ nucleocapsid ซึ่งจะถูกส่งต่อไปยัง endoplasmic reticulum (ER) เพื่อทำการประกอบกับ HBsAg ทั้งสามรูปแบบจนได้อนุภาคไวรัสแบบสมบูรณ์ ในหนึ่งวันจะมีการสร้างอนุภาคไวรัสประมาณ 10^{11} อนุภาค [1]

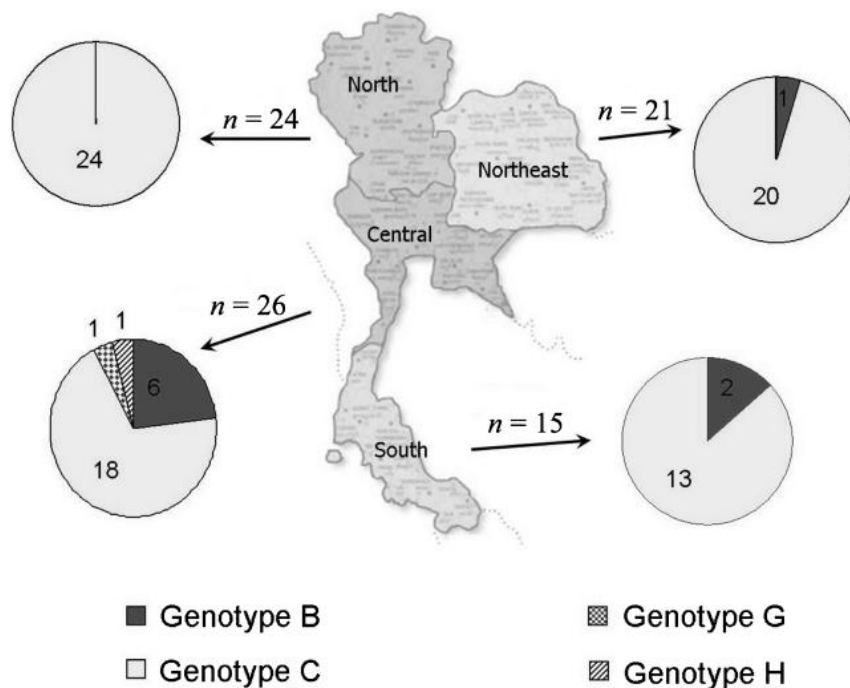
การจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบีถูกจำแนกตามความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ 8 genotypes ตั้งแต่ A – H โดยจะจัดเป็นสายพันธุ์ใหม่ก็ต่อเมื่อมีความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งจีโนมมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 8 โดยมีการกระจายตัวของแต่ละสายพันธุ์ทั่วโลกดังแสดงในภาพที่ 8 โดยในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มักจะพบสายพันธุ์ B และ C ในแอฟริกา มักจะพบ A และ E ในตะวันออกกลางและยุโรปมักพบสายพันธุ์ G [59]



ภาพที่ 8 การกระจายตัวของไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ต่างๆทั่วโลก [59]

และได้มีผู้ทำการศึกษาสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทยพบว่าประมาณร้อยละ 87 เป็นสายพันธุ์ C และร้อยละ 10 เป็นสายพันธุ์ B ดังภาพที่ 9 [60]



ภาพที่ 9 การกระจายตัวของไวรัสตับอักเสบบีแต่ละสายพันธุ์ในประเทศไทย [60]

ยีน *KIF1B*

ยีน *Kinesin family member 1B (KIF1B)* อยู่บนโครโมโซมที่ 1p36.2 มีความยาวประมาณ 1.65 Mb [61] และจัดอยู่ในกลุ่ม kinesin superfamily proteins (KIFs) ซึ่งมีบทบาทในการขนส่งอแกเนลล์ภายในเซลล์อย่างจำเพาะโดยอาศัยไมโครทิวบูล (microtubule) และมีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อแต่จะมีการแสดงออกอย่างมากในเซลล์ประสาท [62] การจัดกลุ่มโปรตีนด้วยการเปรียบเทียบโครงสร้างปฐมภูมิ *KIF1B* จัดอยู่ในกลุ่ม subfamily KIF1 ซึ่งประกอบไปด้วย *KIF1A*, *KIF1B*, *KIF1C*, *KIF1D* [63,64] โปรตีนในกลุ่ม KIF1 นี้จะมีบริเวณปลายด้านอะมิโน (N-terminal) ที่คล้ายกันและจะมีหน้าที่เป็น motor domain ในขณะที่ปลายคาร์บอกซี (C-terminal) ซึ่งจะมีความหลากหลายมากกว่า และมีหน้าที่ไปยึดติดกับอแกเนลล์ ที่จะขนส่ง บริเวณนี้จะเรียกว่าเป็น cargo-binding region [62,65] ยีน *KIF1B* มีขนาดประมาณ 170 kbp ประกอบไปด้วย 48 exon มีสองไอโซฟอร์มหลัก คือ *KIF1B α* และ *KIF1B β* สำหรับ *KIF1B α* ซึ่งสามารถถอดรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด

ประมาณ 130 kDa ประกอบด้วย 1150 กรดอะมิโน และทำหน้าที่ขนส่งไมโทคอนเดรียในเซลล์ประสาท ส่วน KIF1B β จะถอดรหัสได้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 200 kDa ประกอบด้วย 1770 กรดอะมิโน และมีส่วนต้นภายใน 660 residue แรกด้านปลายอะมิโน เหมือนกันกับ KIF1B α แต่ปลายคาร์บอกซีคาร์บอนนั้นแตกต่างกัน และมีการรายงานที่ KIF1B β มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการขนส่ง synaptic transport vesicle ในเซลล์ประสาท [66] อีกทั้งการกลายพันธุ์ของ KIF1B β ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค Charcot-Marie-Tooth เช่นการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 98 จากกรดอะมิโนกลูตามีน (Q) ไปเป็นกรดอะมิโนลิวซีน (L) ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการขนส่งออกแกนเนลล์ของ KIF1B β และการเพิ่มการแสดงออกของ KIF1B β ที่กลายพันธุ์จะไปส่งผลให้เกิดการสะสมของ KIF1B β ในบริเวณรอบนิวเคลียส [65,66] มีการศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์ประสาทพบว่า KIF1B β ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มหนึ่งของ KIF1B β เกี่ยวข้องกับการขนส่งไลโซโซมจากบริเวณรอบนิวเคลียสไปยังรอบนอกของเซลล์[67] นอกจากนี้ KIF1B β ยังมีความสามารถในการเป็น tumor suppressor โดย KIF1B β สามารถยับยั้งการเจริญของ human neuroblastoma (NB1) และ NMuMG mouse epithelial cells และ KIF1B β สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis) ใน NB1 ได้ แต่การแสดงออกของ KIF1B β จากเพียง allele เดียวไม่เพียงพอที่จะทำหน้าที่เป็น tumor suppressor [68] มีการศึกษา พบว่าความสามารถในการเป็น tumor suppressor ของ KIF1B β โดยเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis นั้นไม่ต้องอาศัย p53 และ KIF1B β จะทำงานในช่วงหลังการทำงานของ Egln3 ซึ่งเป็น hydroxylase โดยความสามารถในการ hydroxylase ของ Egln3 ไม่ได้ส่งผลต่อการแสดงออกของ KIF1B β แต่ทำให้เกิดการสะสมของโปรตีน KIF1B β และเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในที่สุด นอกจากนี้ความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของ KIF1B β นั้นไม่ต้องการโปรตีนในบริเวณปลายอะมิโนช่วง 600 กรดอะมิโนแรกซึ่งเป็น kinesin motor [69] ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ของ KIF1B β ไม่เกี่ยวข้องกับการขนส่งออกแกนเนลล์

Single nucleotide polymorphism (SNP)

SNP ความหลากหลายทางพันธุกรรมอีกรูปแบบหนึ่งที่มีความแตกต่างกันภายในกลุ่มประชากรเดียวกัน ซึ่งอาจส่งผลหรือไม่ส่งผลต่อลักษณะการแสดงออกของสิ่งมีชีวิตนั้นๆก็ได้ โดยอย่างน้อยต้องมีความถี่ของความหลากหลายนั้นๆ ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 1 และไม่ใช้การกลายพันธุ์ที่เป็นผลมาจากการเกิดโรค และ SNP อาจอยู่ได้ทั้งในส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory unit) หรืออยู่ในส่วนที่แสดงออกของยีน (coding region) ก็ได้ ในหลายการศึกษาพบว่า SNP เหล่านี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหรือพยาธิสภาพต่างๆซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุของลักษณะนั้นๆโดยตรง หรืออาจเป็นเพียงตัวบ่งบอกลักษณะนั้นๆ โดยแบ่งได้ดังนี้

Linked SNPs (indicative SNPs)

เป็น SNP ที่ไม่ได้อยู่บนยีนใดๆ และไม่ส่งผลกระทบต่อการแสดงออกและหน้าที่ของโปรตีนนั้นๆ แต่ส่งผลกระทบต่อลักษณะที่แสดงออกในสิ่งมีชีวิตนั้นๆเช่น ส่งผลกระทบต่อลักษณะการตอบสนองต่อยา หรือโอกาสในการเกิดโรคต่างๆ

Causative SNPs

เป็น SNP ที่ส่งผลกระทบต่อหน้าที่และการแสดงออกของโปรตีนนั้นๆโดยตรง และสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคหรือส่งผลกระทบต่อการรักษาซึ่ง SNP ประเภทนี้อาจแบ่งได้เป็นสองประเภท ดังนี้

Coding SNPs

SNP อยู่บนส่วนที่แสดงออกของยีนและมีผลต่อการถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีนทำให้มีลำดับกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปอาจทำให้โปรตีนสูญเสียโครงสร้างเดิมและทำให้เสียความสามารถในการทำงานไป

Non-coding SNPs

SNP อยู่บนส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (regulatory unit) ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบนโปรตีนแต่อาจส่งผลกระทบต่อระดับของ mRNA และ โปรตีน

หรืออาจอาจอยู่บน splice site ซึ่งส่งผลต่อการ splicing ของ mRNA ทำให้ได้รูปแบบของโปรตีนที่ต่างออกไป [70]

SNP rs17401966

SNP ตำแหน่ง rs17401966 นี้อยู่บน intron ที่ 24 ของยีน *KIF1B* บน โครโมโซม 1p36 ซึ่งมักจะเกิด deletion ในมะเร็งหลายชนิดรวมไปถึง HCC [11] และ rs17401966 อยู่ใน *KIF1B β* isoform ที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการเป็น tumor suppressor gene [68]



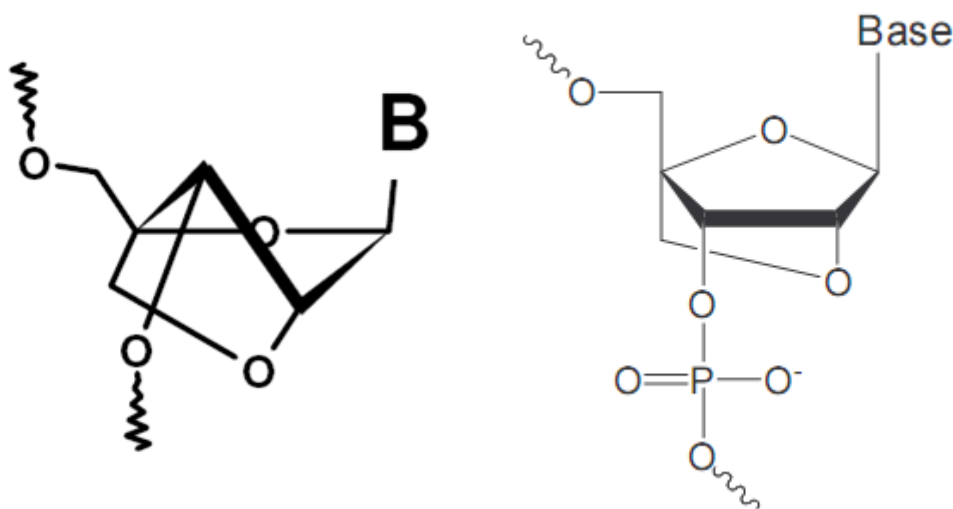
ภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งของ rs17401966 บนยีน *KIF1B* ประกอบไปด้วย *KIF1B β* isoform (กรอบบน) และ *KIF1B α* isoform (กรอบล่าง) [71]

จากการศึกษา Genome wide association study (GWAS) ในประชากรจีนพบว่า rs17401966 มี major allele เป็น A และ minor allele เป็น G และ minor allele frequency เท่ากับ ร้อยละ 29 และมีความสัมพันธ์ต่อการเกิด HCC ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประเทศจีน โดยมี minor allele (G) เป็น Protective allele ต่อการเกิด HCC และ minor allele มีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อการแสดงออกของ *KIF1B β* isoform แต่ไม่พบว่ามีผลต่อการแสดงออกของ *KIF1B α* isoform [10] และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs17401966 กับการแสดงออกของ *KIF1B β* isoform นี้ยังทำในกลุ่มตัวอย่างที่น้อยเกินไป และไม่ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของเซลล์มะเร็งระดับกับเซลล์ปกติ อีกทั้งการสร้างเซลล์ที่ knock out ยีน *KIF1B* เพื่อศึกษาบทบาทของยีนต่อการ

เกิดโรคยังไม่สามารถทำได้ในปัจจุบัน [72] มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง rs17401966 กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประเทศซาอุดีอาระเบียและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เกาหลี ญี่ปุ่น และ ฮองกง พบว่า rs17401966 ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประเทศอื่นๆ [12,13] และมีรายงานว่า rs17401966 หรือ SNP อื่นในบริเวณใกล้เคียงไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการพัฒนาไปเป็นมะเร็งตับของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประเทศจีน [73]

Locked nucleic acid (LNA)

LNA เป็น nucleic acid analog ชนิดหนึ่งซึ่งมี backbones ลักษณะเป็น bicyclic nucleic acid โดยมีหมู่ methyl ต่อระหว่าง 2'-oxygen กับ 4'-carbon ดังภาพที่ 11 และ LNA มีสมบัติในการเข้าจับ



ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ LNA (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง 74)

กับ single-stranded DNA (ssDNA) และ ssRNA ด้วยความจำเพาะสูงซึ่งสามารถนำมาออกแบบ LNA-DNA / LNA-RNA chimera เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในงานต่างๆ เช่น การนำมาใช้เป็น probe สำหรับการทำ real-time PCR ด้วยเทคนิค TaqMan probe เนื่องจากความสามารถในการ stabilize

เบสคู่สมไม่ว่าจะเป็น LNA-DNA หรือ LNA-RNA ทำให้การเข้าคู่ของเบสคู่สมเสถียรขึ้นส่งผลให้ค่า melting temperature (T_m) ของ oligonucleotide นั้นๆสูงขึ้น และเมื่อมี LNA เป็นองค์ประกอบทำให้ probe เพิ่มความสามารถในการเข้าจับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบได้ดีขึ้น โดยสามารถใช้หลักการในการออกแบบ probe ได้ดังนี้

1. ควรวางตำแหน่ง LNA ให้เป็นตำแหน่งที่ต้องการความสามารถในการแยกแยะเช่นการออกแบบ LNA-DNA / LNA-RNA probe เพื่อตรวจวิเคราะห์ SNP ณ ตำแหน่งใดๆ ควรออกแบบให้ LNA อยู่ตรงตำแหน่งที่เป็น SNP เนื่องจากความสามารถในการ stabilize โครงสร้างของ nucleotide duplex ทำให้ LNA มีอำนาจในการจำแนกเบสคู่สมได้สูงกว่า DNA หรือ RNA ทั่วไป

2. หาก probe ที่ใช้มีขนาดเล็ก ควรหลีกเลี่ยงการใช้ LNA ที่อยู่ติดกันเนื่องจาก LNA จะ hybridize ได้แน่นมากเมื่อมี LNA อยู่ติดกัน

3. ระวังการออกแบบไม่ให้มีการเข้าคู่กันเองของโมเลกุลที่มี LNA อยู่

นอกจากนี้ LNA ยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆอีกมากมายเนื่องจากความสามารถในการ stabilize โครงสร้าง oligonucleotide duplex ที่เกิดขึ้นนี้เอง [74]

Molecular discrimination using real-time PCR

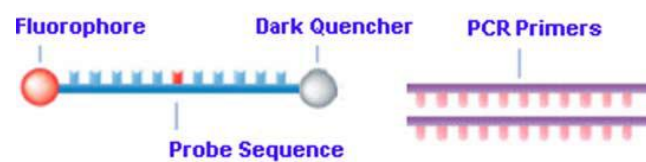
เป็นการใช้เทคนิค real-time PCRซึ่งมีความสามารถในการติดตามผลของการ PCR ได้ในแต่ละรอบของการ PCR ผสานกับความสามารถในการจำแนกความต่างของโมเลกุลในงานวิจัยนี้คือการจำแนก nucleotide ตำแหน่งที่เป็น SNP ในแต่ละ allele โดยเทคนิคที่เลือกใช้คือ

TaqMan

วิธี TaqMan หรืออีกชื่อว่า 5' nuclease assay เป็นวิธีที่ใช้ในการตรวจหาความหลากหลาย โดยวิธีนี้จะใช้ประโยชน์จาก 5' endonucleolytic activity ของ Taq DNA polymerase ในการตัด oligonucleotide probe ในระหว่างขั้นตอน extension ในการทำ PCR ซึ่งทำให้ probe ที่ถูกติดตาม

เรืองแสง (fluorescent) ไว้ที่ปลายด้านหนึ่งและปลายอีกด้านหนึ่งมี quencher ที่ทำหน้าที่ดูดซับพลังงานแสงในช่วงคลื่นที่สารเรืองแสงจะทำการเรืองแสงออกมา เมื่อ probe ขาดออกและทำให้ระยะทางระหว่างสารเรืองแสงและ quencher ห่างออกจากกันมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยพลังงานแสงทำให้สารเรืองแสงมีการเรืองแสงออกมาตรวจจับหาสัญญาณได้ (ดังภาพที่ 12)

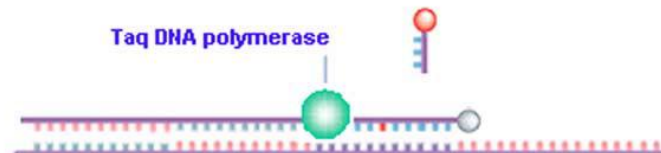
Elements of the TaqMan technology



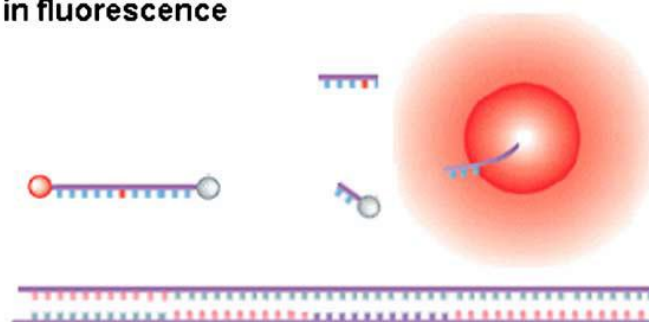
Step 1. Primer and probe annealing



Step 2. Primer extension with Taq DNA polymerase



Step 3. Release of probe fragments with increase in fluorescence



ภาพที่ 12 ขั้นตอนในการทำงานของเทคนิค TaqMan probe real-time PCR [75]

ซึ่งในแต่ละรอบของการทำ PCR จะทำให้มีจำนวนผลิตภัณฑ์ของ PCR ที่จะกลายเป็นแม่แบบในการเข้าคู่กับ probe โมเลกุลที่เหลือมากขึ้น ทำให้มีสัญญาณที่สูงขึ้นในรอบถัดไป จนกระทั่งรอบท้ายของการทำ PCR ซึ่งสารตั้งต้นหลายอย่างรวมถึง probe ที่มีเริ่มหมดไปทำให้สัญญาณที่ได้เริ่มคงที่ [75]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการวิจัยแบบ Case control study โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับ โดยผู้ป่วยทั้งหมดเข้ารับการศึกษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics)

ประชากรศึกษา

งานวิจัยนี้แบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

กลุ่มที่ทำการศึกษา คือกลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและเป็นมะเร็งตับที่ได้เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยกลุ่มประชากรเป้าหมายนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 202 คน เป็นเพศชาย 158 คนและเพศหญิง 44 คน (อายุเฉลี่ย \pm SD = 59.8 ± 12.3 ปี)

เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกผู้ป่วยกลุ่มที่ทำการศึกษา

- ผู้ป่วยที่ตรวจพบ HBsAg และได้รับการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาแล้วว่าเป็นมะเร็งตับ HCC และ ตับแข็ง

กลุ่มควบคุม (Control)

คือ กลุ่มประชากรไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแต่ไม่มีประวัติการตรวจพบมะเร็งตับและได้เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยกลุ่มประชากรควบคุมนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 196 คน เป็นเพศชาย 131 คน หญิง 65 คน (อายุเฉลี่ย \pm SD = 46.3 ± 9.9 ปี)

เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกผู้ป่วยกลุ่มควบคุม

- ผู้ป่วยที่ตรวจพบ HBsAg แต่ไม่มีผลทางพยาธิวิทยายืนยันได้ว่าเป็นมะเร็งตับ

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)

ในการศึกษาความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรม rs17401966 นี้ในประชากรไทยเบื้องต้นพบว่า P_0 หรือ โอกาสที่กลุ่มควบคุมจะมีปัจจัยเสี่ยงมีค่าเท่ากับ 0.44 เมื่อคำนวณขนาดของ

ประชากรตัวอย่างที่ต้องใช้ในงานวิจัยโดยใช้สมการ

$$\frac{n}{\text{group}} = \frac{(Z_{\alpha/2}\sqrt{2PQ} + Z_{\beta}\sqrt{(P_1Q_1 + P_0Q_0)})^2}{(P_1 - P_0)^2}$$

($\alpha = 0.05$, $\beta = 0.10$, $Z_{\alpha/2} = 1.96$, $Z_{\beta} = 1.28$, $P_0 = 0.44$, $P_1 = P_0R/(1 + P_0(R - 1)) = 0.611111111$, $P = (P_1 + P_0)/2 = 0.525555555$, $Q = 1 - P = 0.47444444$, $Q_0 = 0.56$, $Q_1 = 0.3888889$)

โดย Z = ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

P_0 = โอกาสที่กลุ่มควบคุมจะมีปัจจัยเสี่ยง

ผลจากการคำนวณด้วยสมการข้างต้นจะได้ขนาดของประชากรต่อกลุ่มเท่ากับ 184.0734777 หรือประมาณ 185 คนและเพื่อความแน่นอนและป้องกันการสูญหายของตัวอย่างเนื่องจากการเก็บตัวอย่างจะทำได้ก็ต่อเมื่อผู้ป่วยมาเข้ารับการรักษาเท่านั้นจึงต้องทำการเก็บตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่สามารถเก็บได้ ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างได้ 202 คนสำหรับกลุ่มเป้าหมาย และ 196 คนสำหรับกลุ่มควบคุม

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Materials)

Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml (Pyrex, USA)

Cuvett: 5 μ l, 10 μ l (MiralBio, Japan)

Cylinder: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)

Flask: 250 ml (Pyrex, USA)

Freezer -20°C (Sanyo, Japan)

Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGen, USA)

Parafilm (American Nation Can, USA)

Pipet tip: 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (AxyGen, USA)

Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)

Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, USA)

Stirring-magnetic bar

อุปกรณ์ (Equipments)

Autoclave (Sanyo, Japan)

Automatic adjustable micropipette: P10 (0.5-10 μ l), P20 (5-20 μ l),

P200 (20-200 μ l), P1000 (100-1,000 μ l) (Eppendorf, Germany)

Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)

Combs (Bio-RAD, Hercules, California)

Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)

Freezer-20°C (Sanyo, Japan)

Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)

Incubator (Mettler, Germany)

Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)

Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)

PCR Mastercycler personal (Eppendorf, Germany)

pH meter (Mettler Toledo, Switzerland)

Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)

Refrigerate microcentrifuge (Eppendorf, Germany)

Refrigerator 4°C (Mitsubishi, Japan)

Rotor gene 6000 (Corbett, Australia)

Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)

UV transilluminator (Fotodyne, USA)

Vortex mixer (Scientific industry, USA)

Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับการเก็บตัวอย่างเลือด

Lymphocyte separation medium (Wisent Inc., Canada)

Magnesium Chloride (Merck, Germany)

Phosphate Buffer Saline (BIO BASIC INC., NY, USA)

Sodium Chloride (Promega, CA, USA)

2. สารเคมีสำหรับการสกัด DNA (DNA extraction)

Absolute ethanol (Merck, Germany)

Chloroform (Sigma, MO, USA)

Disodium ethylenediamine tetraacetic acid: EDTA (USB, Hong Kong)

Glycogen (USB, Ohio, USA)

Isoamyl alcohol (BDH, UK)

Isopropanol (Sigma, Singapore)

Phenol (Amresco, OH, USA)

Proteinase K (5PRIME, Germany)

Sodium acetate (Sigma, Singapore)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Pharmacia biotech, Sweden)

Tris-HCl (Sigma, Singapore)

3. สารเคมีสำหรับ Polymerase Chain Reaction (PCR)

5Prime PerfectTaq Plus MasterMix Kit (5PRIME, Germany)

Primer (BioDesign, Thailand; 1st BASE CUSTOM OLIGOS, Singapore)

4. สารเคมีสำหรับทำ gel electrophoresis

Agarose molecular grade (Reserch Organics, OH, USA)

Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

GeneRuler 100 base pair DNA ladder (Fermentas, MD, USA)

5. สารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

Agarose GelExtract Mini Kits (5PRIME, Germany)

6. สารเคมีสำหรับการทำโคลนนิ่ง (Cloning)

Agar Bacteriological (GIBCO, NY, USA)

Ampicillin (Phamacia, Hong Kong)

FastPlasmid Mini (Eppendorf, Germany)

Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside: IPTG (Eppendorf, Germany)

One Shot TOP10 Chemically Competent E.Coli (Invitrogen, NY, USA)

pGEM-T Easy Vector System (Promega, CA, USA)

Tryptone powder (BIO BASIC INC., NY, USA)

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside: X-Gal (Promega, CA, USA)

Yeast Extract (GIBCO, NY, USA)

โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล

Chromas Lite (version 2.01)

OLIGOS primer design software (version 9.1)

Rotor gene (version 6.0)

SPSS for window (version 13.0)

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection)

ในประชากรกลุ่มเป้าหมายจะใช้เลือดจากการรักษาด้วยวิธี Transcatheter Arterial Chemo Embolization (TACE) ซึ่งต้องทำการเจาะหลอดเลือดคอตีบแล้ว โดยจะทำการเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 3 มิลลิลิตรในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) และในกลุ่มประชากรควบคุมซึ่งเป็นผู้ที่มาทำการตรวจรักษาไวรัสตับอักเสบบี จะใช้การเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำโดยใช้เข็มปลอดเชื้อ และเก็บเลือดในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเช่นกัน เมื่อได้ตัวอย่างเลือดมาแล้วจึงนำไปทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้ Lymphocyte separation medium (Wisent Inc., Quebec, Canada) แล้วทำการละลายในสารละลาย PBS จากนั้นจึงนำไปสกัด DNA ต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเม็ดเลือดขาวในการวิจัยนี้ใช้วิธี Phenol/Chloroform Extraction โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างเม็ดเลือดขาว 100 μ l ใส่ใน Microcentrifuge tube 1.5 ml
2. เติม Lysis buffer 400 μ l และ proteinase K 10 μ l แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex
3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. เติม Phenol และ Chloroform:IAA (49:1) อย่างละ 250 μ l แล้ว vortex
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g เป็นเวลา 20 นาที
6. ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในสารละลาย Glycogen 4 μ l + 2M NaOAc 40 μ l + Absolute ethanol 800 μ l แล้วใช้การกลั่นเหลอไปมาเพื่อผสมสารให้เข้ากัน
7. แช่เย็นที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
8. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g เป็นเวลา 30 นาที
9. ทดสารละลายทิ้งแล้วล้างด้วย 70% ethanol 1 ml
10. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g เป็นเวลา 20 นาทีแล้วทดสอบละลายทิ้ง แล้วทำให้แห้ง
11. เติม Distilled Water 100 μ l

การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับ SNP rs17401966 นั้นได้อ้างอิงนิวคลีโอไทด์ NW_001838523.1 บนฐานข้อมูล Genbank โดยเลือกให้ไพรเมอร์มีขนาดไม่เกิน 30 bp มีค่า GC content ประมาณ 50-60% และมี melting temperature (Tm) ระหว่าง 55-75 °C โดยคำนวณจากสูตร $Tm = 2^{\circ}C \times (A+T) + 4^{\circ}C \times (C+G)$ และไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จะถูกนำมา BLAST เพื่อตรวจสอบว่ามีความเหมือนกับตำแหน่งที่ต้องการในจีโนมของมนุษย์หรือไม่ จากนั้นใช้โปรแกรม Oligos version 9.1 ในการตรวจสอบการจับกันเองระหว่างไพรเมอร์เพื่อป้องกันการเกิดการจับกันเองซึ่งจะทำให้ไพรเมอร์ด้อยประสิทธิภาพลง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ปริมาณของสารเคมีรวมถึงเวลาและอุณหภูมิในการทำ PCR จะแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ส่วนลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR และขนาดของผลิตภัณฑ์แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 3 แสดงสารเคมีและปริมาตรที่ใช้ในการทำ PCR ต่อ 1 ปฏิกริยา

ส่วนประกอบ	ปริมาตร ($\mu\text{l}/\text{reaction}$)
2X Masrermix (5PRIME, Germany)	12.5
Forward primer (10 μM)	0.5
Reverse primer (10 μM)	0.5
Distilled water	10.5
DNA template	1
Total volume	25

ตารางที่ 4 แสดงรอบปฏิกริยาที่ใช้ในการทำ PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial denaturation	94 °C	5 นาที
Denaturation (35 repeats)	94 °C	30 วินาที
Annealing	60 °C	30 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
Final extension	72 °C	7 นาที

ตารางที่ 5 แสดงไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์

ไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับเบส (5'>3')	ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp)
KIF1B_rs17401966_F1	Forward	ATTCATCCCACTTTAGTCATTGCAAG	291 bp
KIF1B_rs17401966_R1	Reverse	CACAACATACTATGACTTCAGCAACT	

การทำโคลนนิ่ง (Cloning) เพื่อเตรียม Positive control

1. การเชื่อมต่อ DNA (Ligation) ที่ต้องการเข้ากับ plasmid (pGEM[®]-T Easy Vector) โดยนำ PCR product ที่ต้องการ โคลนมาบ่มกับสารเคมีตามวิธีของ pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, CA, USA)

2. การนำพลาสมิดที่ได้ถ่ายเข้าสู่ Competent cell (Transformation) มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำ Competent cell (*E. Coli*) 50 μ l ผสมกับสารละลาย ligation 5 μ l

2.2 แช่เย็นบนน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

2.3 Heat shock ด้วยการนำไปบ่มที่ 42 °C เป็นเวลา 50 วินาที จากนั้นนำกลับมาแช่บนน้ำแข็งต่ออีก 2 นาที แล้วทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง

2.4 เติมสารละลายที่ประกอบไปด้วย SOC medium 950 μ l และ 2M Mg²⁺ 10 μ l และ 2M glucose 10 μ l

2.5 นำไป shake ที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง

2.6ปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm นาน 5 นาที แล้วเทส่วน supernatant ทิ้ง

2.7 เติม x-gal 15 μ l และ 200 mg/ml IPTG 4 μ l

2.8 นำไปเกลี่ยบน LB agar ที่มี ampicillin 2.5 μ g แล้วจึงนำไปบ่มที่ 37 °C ซ้ำมคืน

3.การคัดเลือก Blue-white colony โดยจะทำการเลือก white colony มาเพาะต่อใน LB broth ปริมาตร 5 ml ที่มี ampicillin 0.5 mg และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการสกัด plasmid DNA จากแต่ละ culture (ปริมาตร 3 ml) แบบ Miniprep โดยใช้วิธีและอุปกรณ์ในชุดสกัด FastPlasmid Mini (Eppendorf, Germany)

การตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

1. การตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

1.1 นำ PCR product ที่ได้มาเลือกขนาดด้วยวิธี agarose gel eletrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 2% (w/v) และใช้ 100 bp DNA ladder ในการอ้างอิงขนาดของ DNA โดยนำไปย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนจะนำไปส่องภายใต้แสง ultraviolet (UV) แล้วทำการตัด ส่วนของ DNA ที่มีขนาดที่ต้องการ

1.2 สกัดด้วย PCRExtract & GelExtract Mini Kits (5PRIME, Germany)

1.3 ส่ง DNA ที่ได้ให้บริษัท First base laboratory SDN BHD (Malaysia) ตรวจ ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

1.4 เมื่อได้รับผลลำดับเบสกลับมาจึงนำไป BLAST เพื่อยืนยันลำดับเบสที่ได้ว่า ตรงกับช่วงที่ต้องการจากนั้นใช้โปรแกรม Chromas Lite (version 2.01) ในการเปิดเพื่อดู Chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น

2. การตรวจด้วยวิธี TaqMan probe Real-time PCR

2.1 เตรียม positive control สำหรับใช้อ้างอิงในการทำ real-time PCR

2.2 เตรียมสารเคมีและอุณหภูมิและเวลา รวมถึงโปรแกรมและ probe สำหรับแต่ละ ปฏิกริยาดังตาราง 6-9

ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการทำ real-time PCR

สารเคมี	ปริมาณ (µl/reaction)
2X Mastermix (5PRIME, Germany)	10
Forward primer (10 µM)	0.25
Reverse primer (10 µM)	0.25
KIF1B_rs17401966_Minor(FAM) probe (10 µM)	1
KIF1B_rs17401966_Major(JOE) probe (10 µM)	1
25 mM MgCl ₂	1
Distilled water	3.5
DNA Template	3
Total volume	20

ตารางที่ 7 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ Real-time PCR

Cycle	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial denaturation	95	10 นาที
Cycling step 1 (45 repeats)	95	10 วินาที
Cycling step 2	69	30 วินาที

ตารางที่ 8 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำ TaqMan probe Real-time PCR

Primer's name	Type	Sequence(5' -> 3')	Product size(bp)
rs17401966F1	Forward	ATTCATCCCACCTTTAGTCATTGCAAG	F1-R1:291bp
rs17401966F2	Forward	AGCACTTAATGAAAACACATAGTGCC	F2-R1:214bp
rs17401966R1	Reverse	CACAACATACTATGACTTCAGCAACT	

ตารางที่ 9 แสดงลำดับเบสของ probe ที่ใช้ในการทำ TaqMan probe Real-time PCR

Probe's name	LNA monomers in sequence	Sequence(5' -> 3')	Predicted Tm (°C)
KIF1Brs17401966Minor(FAM)	7	tatGaGtCcAtaTtGaGtc*	67
KIF1Brs17491966Major(JOE)	5	tatGagTccGtattGagTc*	67

*ตัวพิมพ์เล็กคือตำแหน่งเบสที่เป็น DNA และตัวพิมพ์ใหญ่คือตำแหน่งเบสที่เป็น LNA

2.3 วิเคราะห์ผลจาก Real-time PCR ด้วยวิธี TaqMan probe โดยการใช้โปรแกรม Rotor gene (version 6.0) ในการวิเคราะห์ค่า Tm ในการจำแนกรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

1. การวิเคราะห์รูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรม (genotype)

SNP rs17401966 จะถูกแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบด้วยกันนั่นคือ Major หรือ common homozygous genotype (AA) Minor (GG) และ heterozygous genotype (AG) และการวิเคราะห์จะใช้ผลบวกของแต่ละจีโนไทป์ที่พบจากการทดลอง

2. การคำนวณความถี่ของอัลลีล (Allele frequencies)

การคำนวณความถี่ของอัลลีลจะคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$P(GG) = \frac{2(GG)+(AG)}{2(AA+AG+GG)}$$

$$p(AA) = \frac{2(AA)+(AG)}{2(AA+AG+GG)}$$

โดย AA AG และ GG คือความถี่ของจีโนไทป์แต่ละแบบ

3. การวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม ตำแหน่ง rs17401966 จะใช้วิธีวิเคราะห์ binary logistic regression ในโปรแกรม SPSS version 13.0 การวิเคราะห์ โดยการเปรียบเทียบค่า odd ratio (OR)

บทที่ 4

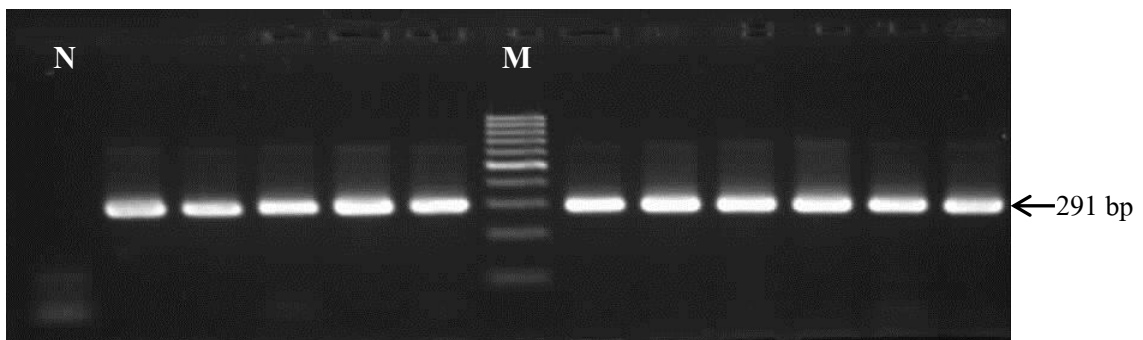
ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลอง

ผลจากการทดลองสามารถอธิบายได้ดังต่อไปนี้

1. ผลการตรวจสอบการผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ rs17401966F1 และ rs17401966R1 มาทำการแยกตามขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดอ้างอิงที่ 300 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดที่คาดการณ์จากการออกแบบไพรเมอร์ไว้นั้นคือ 291 bp ดังภาพที่ 13

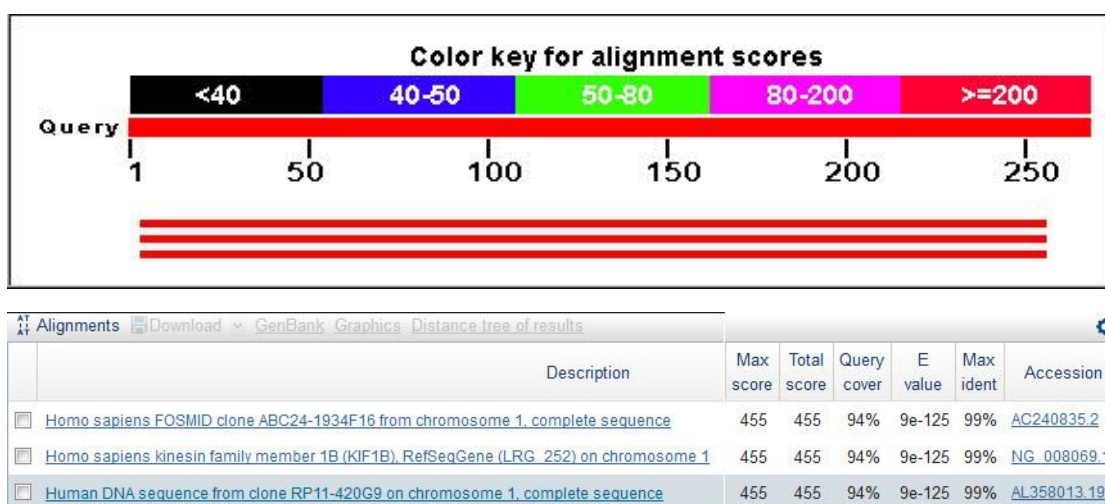


ภาพที่ 13 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ rs17401966 โดยใช้ 2% (w/v) agarose gel โดยช่อง M คือ 100 bp DNA marker ช่อง N คือ negative control และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด 291 bp

เมื่อทำการแยกตามขนาดดีเอ็นเอแล้วจึงนำไปตรวจสอบ SNP ต่อไปด้วยวิธี direct sequencing

2. ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing

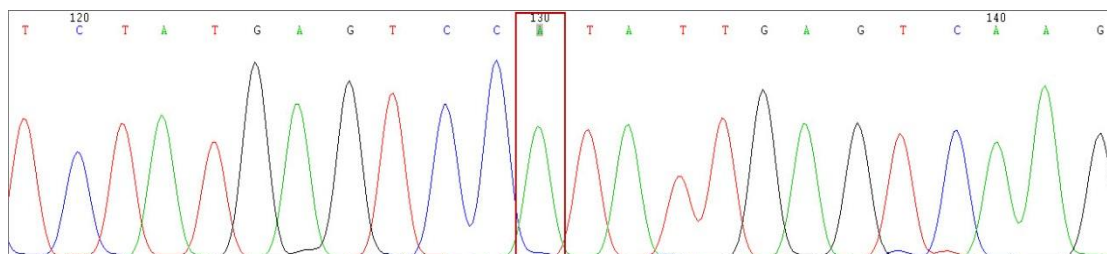
ผลที่ได้จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัท First base laboratories SDN BHD จะถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นมีความเหมือนกับ Homo sapiens FOSMID clone ABC24-1934F16 from chromosome 1, complete sequence และ Homo sapiens kinesin family member 1B (KIF1B), RefSeqGene (LRG_252) on chromosome 1 (ภาพที่ 14) ซึ่งทั้งสองลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ้างอิงในฐานข้อมูลคือบริเวณเดียวกันและเป็นบริเวณยีน *KIF1B* จึงถือว่าได้ผลผลิตจากการ PCR ตามต้องการ



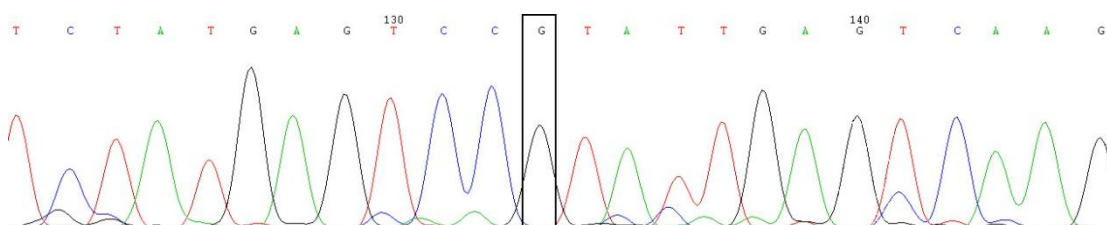
ภาพที่ 14 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ PCR ยีน *KIF1B* ในช่วงที่ครอบคลุม rs17401966 กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงในฐานข้อมูลของ GenBank

จากนั้นจึงใช้โปรแกรม Chromas Lite (version 2.01) ในการอ่านและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ เพื่อทำการตรวจสอบ SNP ที่ได้เป็น genotype ใดซึ่งจะแสดงในภาพที่ 15 โดยผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จะเรียกว่า chromatogram ซึ่งแกน x จะบอกถึงลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นๆ แกน y จะบอกถึงขนาดของสัญญาณที่ได้จากการตรวจ โดยผลที่ได้จะถูกรวบรวมเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ผลทางสถิติต่อไป

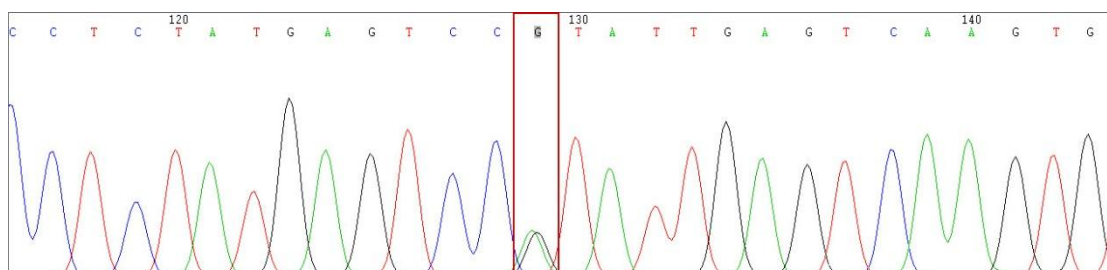
ก.



ข.



ค.

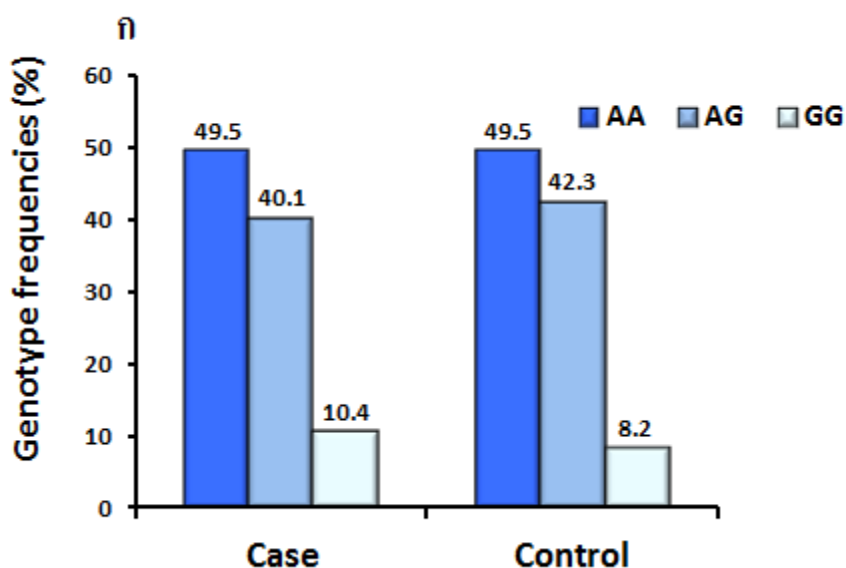


ภาพที่ 15 รูปแบบการแสดงผล chromatogram ของ rs17401966 ในยีน *KIF1B* ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยจะแสดงถึงลักษณะทางพันธุกรรมแบบต่างๆ ก. Homozygous A (AA) ข. Homozygous G (GG) ค. Heterozygous (AG)

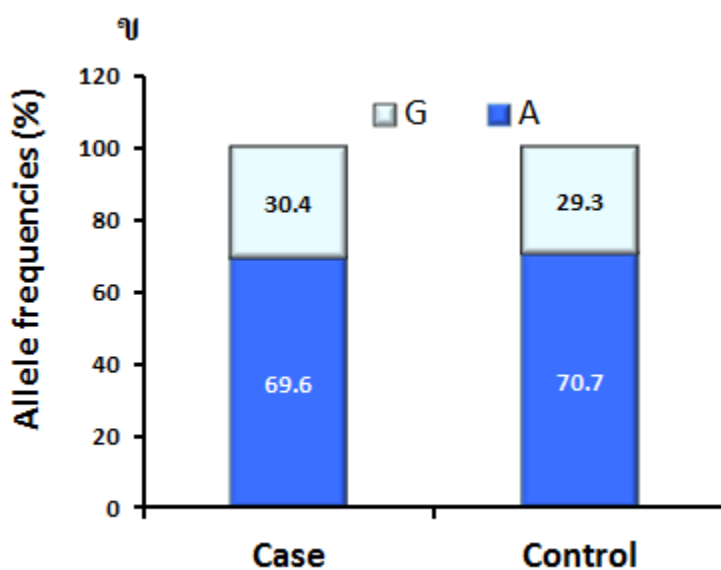
3.ผลวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทั้งหมด 398 คนและมี 202 คนที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับ (กลุ่มเป้าหมาย) และอีก 196 คนที่ไม่มีประวัติการเป็นมะเร็งตับ (กลุ่มควบคุม) โดยในกลุ่มเป้าหมายพบว่ามีลักษณะ

ทางพันธุกรรมเป็นแบบ homozygous major genotype (AA) ทั้งหมด 100 คนคิดเป็นร้อยละ 49.5 และมีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ heterozygous (AG) และ homozygous minor allele (GG) เป็นจำนวน 81 คน (ร้อยละ 40.1) และ 21 คน (ร้อยละ 10.4) ตามลำดับ และการกระจายตัวของความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้เป็นลักษณะใกล้เคียงกันในกลุ่มควบคุม 196 คน โดยมีผู้ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมแบบ homozygous major genotype (AA) 97 คน (ร้อยละ 49.5) และ heterozygous (AG) จำนวน 83 คน (ร้อยละ 42.3) และ homozygous minor allele จำนวน 16 คน (ร้อยละ 8.2) และจากการคำนวณความถี่ของแต่ละลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่าในกลุ่มเป้าหมายมี major allele (A) เท่ากับร้อยละ 69.6 และ minor allele (G) เท่ากับร้อยละ 30.4 สำหรับในกลุ่มควบคุมมีความถี่ของ major allele (A) ร้อยละ 70.7 และมีความถี่ของ minor allele คิดเป็นร้อยละ 29.3 ซึ่งข้อมูลข้างต้นจะแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดง (ก) ความถี่ของแต่ละ genotype และ (ข) ความถี่ของ allele ในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นมะเร็งตับ



ภาพที่ 16 แสดง (ก) ความถี่ของแต่ละ genotype และ (ข) ความถี่ของ allele ในกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุม

ข้อมูลทางสถิติของกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ป็นมะเร็งตับและกลุ่มควบคุมทั้งหมด 398 คนจะแสดงอยู่ในตารางที่ 10 ซึ่งในกลุ่มเป้าหมายมีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ 59.8 ± 12.3 ปี มีเพศหญิงจำนวน 44 คน เพศชาย 158 คน คิดเป็นร้อยละ 21.8 และ 78.2 ตามลำดับ กลุ่มควบคุมมีอายุเฉลี่ย 46.3 ± 9.9 ปี มีเพศหญิงจำนวน 65 คน และเพศชาย 131 คน คิดเป็นร้อยละ 33.2 และ 66.8 ตามลำดับ

ตารางที่ 10 แสดงข้อมูลสถิติของกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุม

Characteristics	Case	Controls
Total, n	202	196
อายุเฉลี่ย, ปี (Standard Deviation)	59.8 (12.3)	46.3 (9.9)
เพศ		
หญิง, n (%)	44 (21.8)	65 (33.2)
ชาย, n (%)	158 (78.2)	131 (66.8)
สัดส่วนเพศ (หญิง/ชาย)	44/158	65/131

เมื่อนำความถี่ของ genotype ของ rs17401966 ในยีน *KIF1B* มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ binary logistic regression ในโปรแกรม SPSS version 13.0 เพื่อเปรียบเทียบค่า odd ratio (OR) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่า rs17401966 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับ เนื่องจากเมื่อให้ความถี่ของ homozygous (AA) genotype เป็นตัวอ้างอิงเปรียบเทียบกับ heterozygous (AG) genotype (odd ratio (95% CI) = 0.95 (0.79-1.31), $p = 0.795$) และ homozygous (GG) genotype (odd ratio (95% CI) = 1.27 (0.63–2.58), $p = 0.503$) รวมไปถึง heterozygous (AG) + homozygous (GG) genotypes (odd ratio (95% CI) = 1.00 (0.68–1.48), $p = 0.998$) แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงค่าความถี่ของ genotype ของ rs17401966 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุม

SNPs	Genotype	Cases (n=202)	Controls (n=196)	OR*	95%CI	p-values*
rs17401966	AA	100 (49.5%)	97 (49.5%)	1**	–	–
	AG	81 (40.1%)	83 (42.3%)	0.95	0.63-1.43	0.795
	GG	21 (10.4%)	16 (8.2%)	1.27	0.63-2.58	0.503
	AG + GG	102 (50.5%)	99 (50.5%)	1	0.68-1.48	0.998

*Cases compare with controls

** Reference

และเมื่อนำความถี่ allele ของ rs17401966 Allele frequencies of rs17401966 and its association to HBV-related HCC มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ binary logistic regression เพื่อเปรียบเทียบค่า odd ratio (OR) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เช่นเดียวกันพบว่า ความแตกต่างของ allele ในระหว่างกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุมไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็ง

ดับในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีในไทยอย่างมีนัยสำคัญ (odd ratio (95% CI) = 0.95 (0.70–1.28), $p = 0.733$) ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงค่าความถี่ allele ของ rs17401966 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุม

SNP	Allele	Cases (2n=404)	Controls (2n=392)	OR*	95%CI	p-values*
rs17401966	Major (A)	281 (69.6%)	277 (70.7%)	1**	-	-
	Minor (G)	123 (30.4%)	115 (29.3%)	0.95	0.70-1.28	0.733

*Cases compare with controls

** Reference

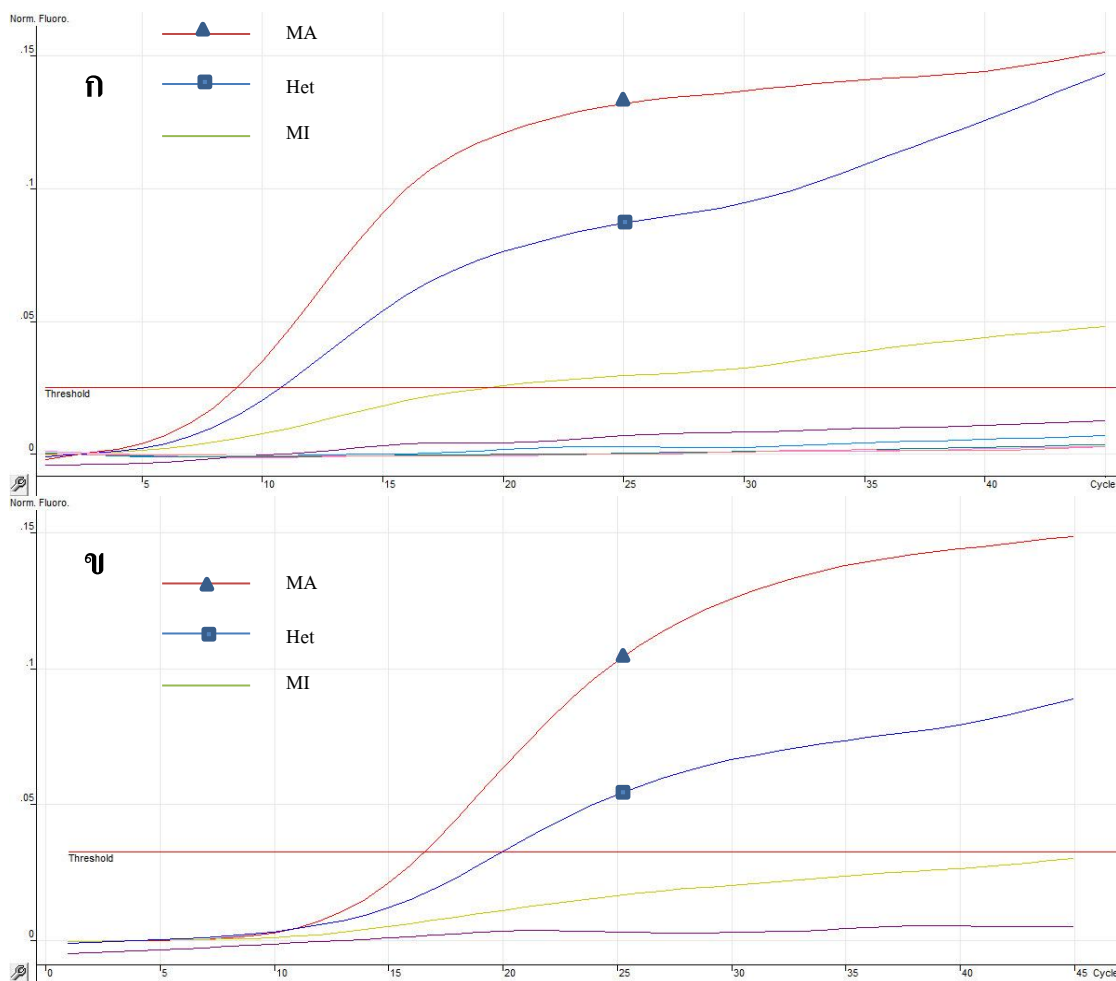
4.ผลการตรวจวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม rs17401966 ด้วยวิธี *TaqMan* probe real-time PCR

ในการพัฒนาเทคนิค *TaqMan* probe real-time PCR ต้องทำการหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ probe จะให้สัญญาณที่ดีและสามารถแยกแยะแต่ละ genotype ได้โดยอาศัยค่า melting temperature (T_m) และต้องทำการหาปริมาณเกลือ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา และทดสอบเพื่อหาค่าความไว (sensitivity) และความแม่นยำ (accuracy) เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับวิธีที่เชื่อถือได้ ในที่นี้คือ direct sequencing โดยผลของการทดลองในแต่ละส่วนเป็นดังนี้

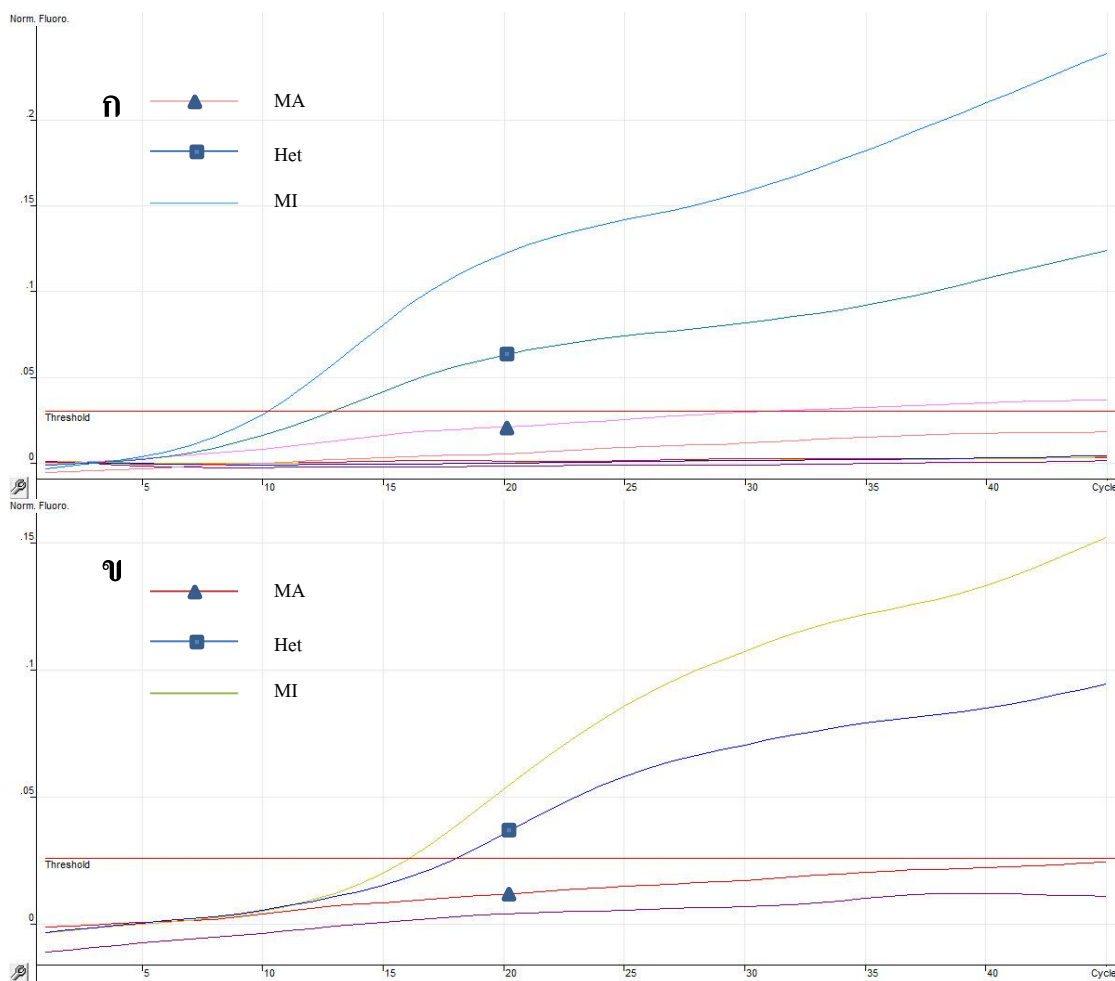
อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา

โดยดูจากค่า T_m ที่เหมาะสมที่จะทำให้ probe จับกับสายแม่แบบได้อย่างจำเพาะสามารถแยกสัญญาณจาก major และ minor ออกจากกันได้โดยค่า T_m เริ่มต้นคือ $65^\circ C$ และเพิ่มเป็น $67^\circ C$, $68^\circ C$, $69^\circ C$ ในที่สุด เนื่องจากในการทดลองที่ $T_m = 65^\circ C$, $67^\circ C$ และ $68^\circ C$ ยังไม่สามารถแยก

สัญญาณจากทั้งสอง genotype ออกจากกันได้ดังภาพที่ 17, 18 โดยเมื่อเพิ่ม T_m ขึ้นจะทำให้สัญญาณเกิดช้าลงหรือไม่เกิด เมื่อ Ct ที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการแยกสัญญาณจากแต่ละ genotype



ภาพที่ 17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่ม T_m จาก (ก) 65°C ขึ้นไปเป็น (ข) 69°C ทำให้สามารถแยกสัญญาณของ homozygous (AA) และ heterozygous ออกจาก homozygous (GG) ได้

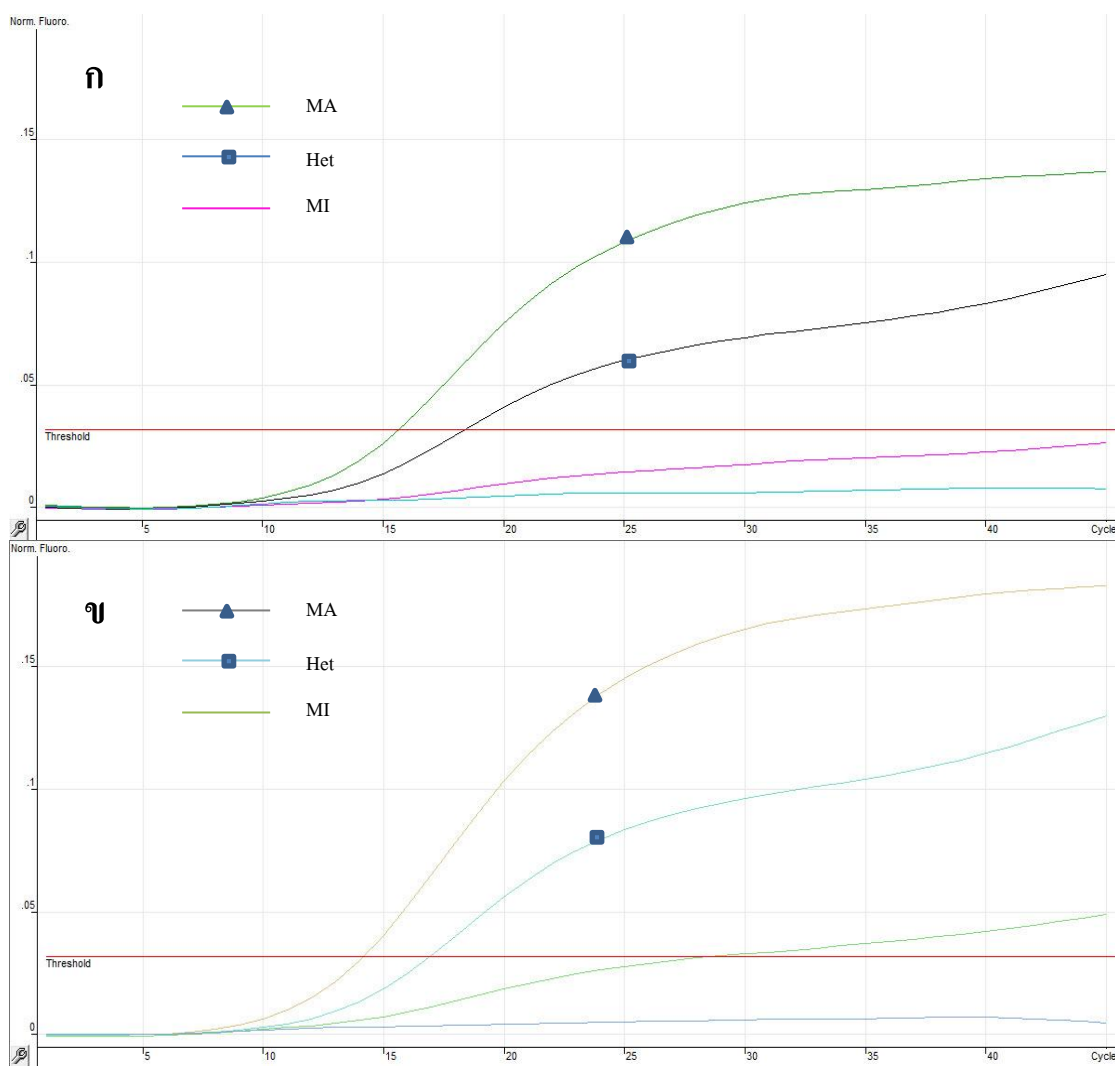


ภาพที่ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่ม T_m จาก (ก) 65°C ขึ้นไปเป็น (ข) 69°C ทำให้สามารถแยกสัญญาณของ homozygous (GG) และ heterozygous ออกจาก homozygous (AA)

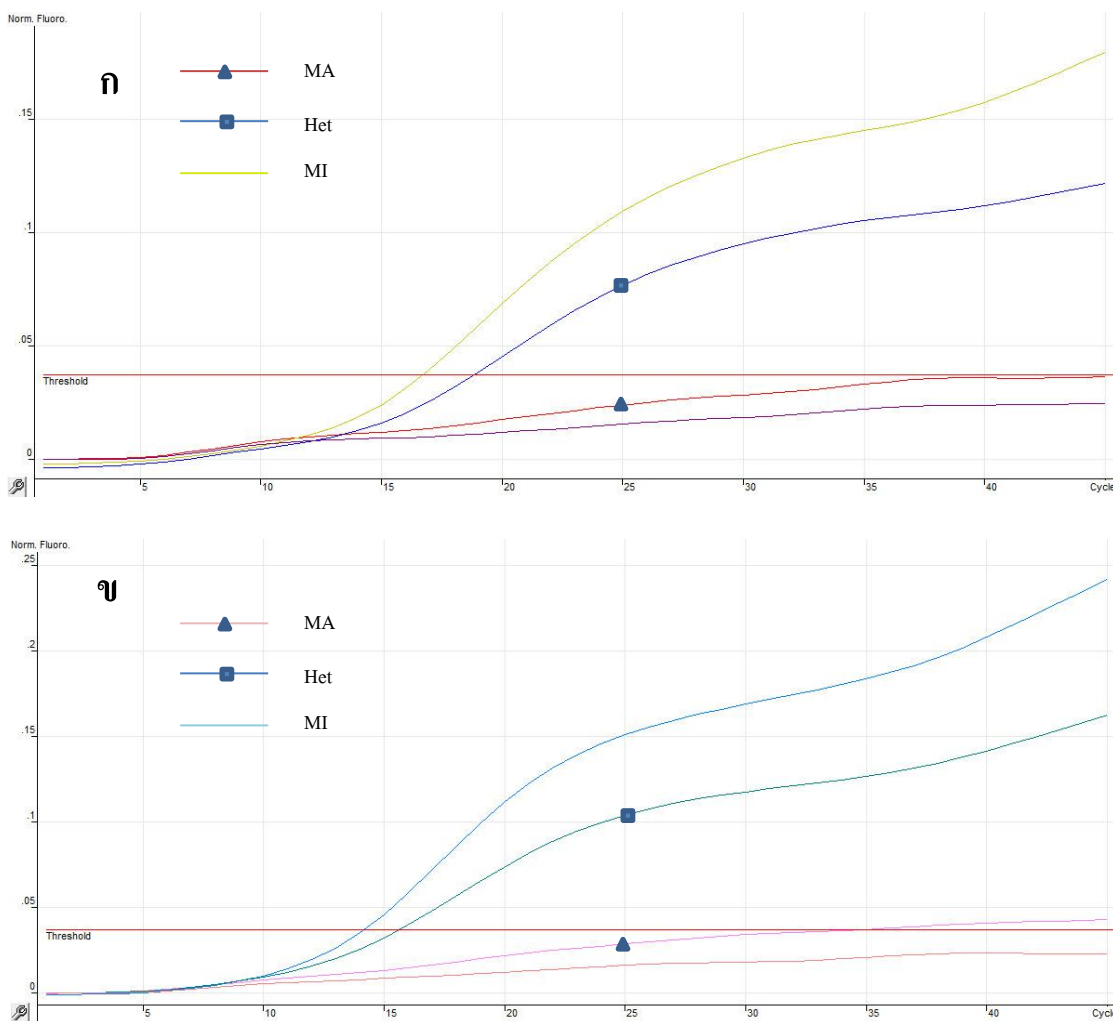
ปริมาณเกลือ (MgCl_2) ที่เหมาะสม

เกลือ MgCl_2 ช่วยให้เกิดเอนไซม์สามารถเข้าคู่กันได้ดีขึ้นเนื่องจาก Mg^{2+} จะไปทำหน้าที่เป็น salting bridge เพื่อลดแรงผลักระหว่างประจุลบของหมู่ฟอสเฟตบน backbone ของดีเอ็นเอ ดังนั้น การเพิ่มปริมาณเกลือจึงส่งผลต่อการจับของ probe กับ template ทำให้ probe มีโอกาสถูกตัดได้มากขึ้นและสัญญาณที่ได้จะได้ในช่วง C_t ที่ต่ำลง แต่จะมีโอกาสที่สัญญาณของแต่ละ genotype ซ้อนกัน ทำให้ต้องปรับปริมาณเกลือที่ให้สัญญาณขึ้นที่ C_t ไม่สูงจนเกินไปและสามารถแยกแยะสัญญาณ

จากแต่ละ genotype ได้ โดยลองทำการเพิ่มปริมาณเกลือในปฏิกิริยาโดยใช้ $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้น 25mM โดยเปลี่ยนความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละปฏิกิริยาจาก 1.25 mM (ใส่ 1 μ l) เป็น 1.875 mM (ใส่ 1.5 μ l) พบ ว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1.25 mM ดังภาพที่ 19, 20



ภาพที่ 19 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่มปริมาณเกลือ $MgCl_2$ จาก (ก) 1.25 mM ขึ้นไปเป็น (ข) 1.875 mM ทำให้ไม่สามารถแยกสัญญาณของ homozygous (AA) และ heterozygous ออกจาก homozygous (GG)

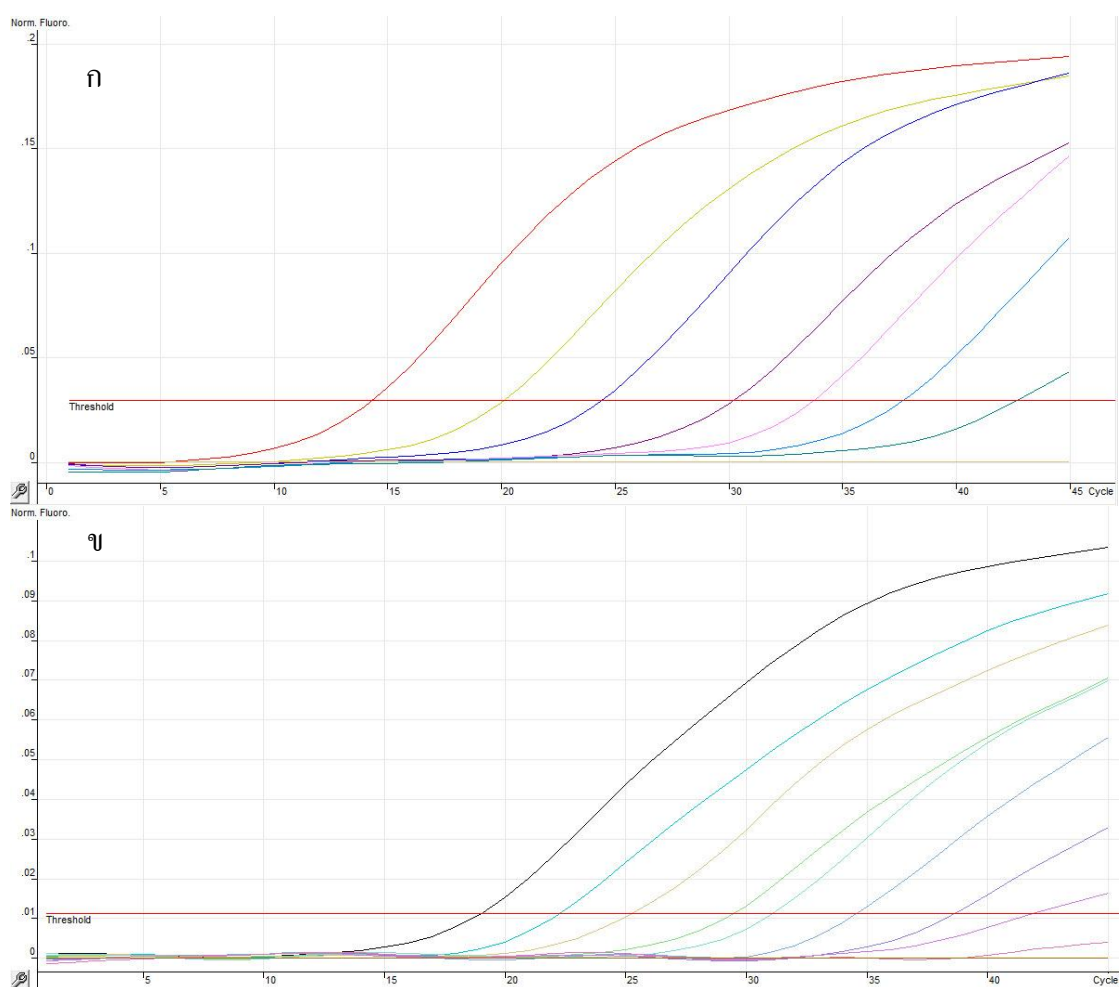


ภาพที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณเปรียบเทียบระหว่างการเพิ่มปริมาณเกลือ MgCl₂ จาก (ก) 1.25 mM ขึ้นไปเป็น (ข) 1.875 mM ทำให้ไม่สามารถแยกสัญญาณของ homozygous (GG) และ heterozygous ออกจาก homozygous (AA)

ความไว (Sensitivity)

ความไวของวิธี *TaqMan* probe real-time PCR จะทดสอบด้วยการนำ plasmid ที่รู้ความเข้มข้นของ DNA อยู่แล้ว (ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 260 nm) มาทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) โดยเริ่มตั้งแต่ความเข้มข้น 10^{10} copies/ μ l เจือจางครั้งละ 10 เท่า ไปจนถึง 10 copies/ μ l แล้วทำการวัดค่า cycle threshold (Ct) เพื่อหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต่ำที่สุดที่เหมาะสมกับการตรวจด้วยเทคนิคนี้

โดยเมื่อนำ positive control ที่ได้จากการโคลนใส่ plasmid ไว้มาทำการเจือจางเป็นลำดับ แล้วนำมาทดสอบด้วยเทคนิค *TaqMan* probe real-time PCR ในส่วนของ major (AA) positive control ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถจะใช้เทคนิคนี้ได้อยู่ที่ 10^3 copies/ μ l และสำหรับ minor (GG) positive control ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถใช้ได้คือ 10^3 copies/ μ l เช่นเดียวกัน (ดังภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 แสดงผลจากการทำ serial dilution เพื่อหาค่าความไวของเทคนิค *TaqMan* probe real-time PCR (เส้นในแนวนอนคือ threshold) (ก) serial dilution ของ major positive control (ข) serial dilution ของ minor positive control

ความแม่นยำ (accuracy)

การคำนวณหาความจำเพาะจะอ้างอิงผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากวิธี direct sequencing เพื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากวิธี TaqMan probe real-time PCR พบว่าจากกลุ่มตัวอย่าง 53 คนที่ผลจากวิธี direct sequencing ตรวจพบ homozygous major genotype (AA) 25 คน heterozygous (AG) 23 คน และ homozygous minor genotype (GG) 5 คน และวิธี TaqMan probe real-time PCR ตรวจพบ homozygous major genotype (AA) 24 คน heterozygous (AG) 22 คนและ homozygous minor genotype (GG) 7 คน ซึ่งข้อมูลแสดงอยู่ในตารางที่ 13 และจากผลการเปรียบเทียบระหว่างสองวิธีสามารถคำนวณความแม่นยำ (accuracy) ได้เท่ากับ ร้อยละ 94.34

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์ genotype ของ rs17401966 ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธี direct sequencing ในกลุ่มตัวอย่าง 53 คน

		Sequencing			total
		MA	MI	Het	
Real-time	MA	24	0	0	24
	MI	0	5	2	7
	Het	1	0	21	22
	total	25	5	23	53

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

โรคมะเร็งตับมีการดำเนินของโรคที่รวดเร็วและในระยะแรกๆ ผู้ป่วยมักจะไม่มีอาการทำให้ไม่ได้รับการตรวจและรักษาอย่างถูกวิธี ในขณะที่มะเร็งยังไม่ลุกลาม ดังนั้นผู้ป่วยส่วนมากที่มาพบแพทย์จึงมักจะเป็นระยะที่มะเร็งลุกลามแล้วทำให้ผลการรักษาเป็นไปได้ไม่ดี การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยจึงมีความสำคัญต่อการรักษาเป็นอย่างมากเพราะนอกจากจะทำให้มีอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยสูงขึ้นแล้วยังเพิ่มโอกาสที่จะรักษามะเร็งตับให้หายขาดได้อีกด้วย การประเมินความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับในกลุ่มเสี่ยงจึงอาจหมายถึงการตรวจพบโรคในระยะแรกและเฝ้าระวังการดำเนินของโรค ในงานวิจัยนี้หากพบว่า rs17401966 มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี อาจนำมาใช้ตัวแปรทางพันธุกรรมนี้มาประกอบการประเมินความเสี่ยงในผู้ป่วยเพื่อติดตามรักษาต่อไปได้

ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาถึงการกระจายตัวของรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมและความถี่ของ allele ของ rs17401966 รวมไปถึงความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่ในประเทศซาอุดีอาระเบียและหลายประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียง เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี สิงคโปร์ ได้มีการศึกษาการกระจายตัวและความถี่ของ allele และความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับของ rs17401966 แล้ว [12,13] และได้ทำการเปรียบเทียบกับผลในการวิจัยครั้งนี้ในตารางที่ 14 โดยในการวิจัยนี้พบว่าในกลุ่มเป้าหมายที่เป็นมะเร็งตับมีจำนวนผู้ที่มี homozygous major genotype (AA) อยู่อ้อยละ 49.5 และมี heterozygous genotype (AG) อยู่อ้อยละ 40.1 และผู้ที่มี homozygous minor genotype (GG) อยู่อ้อยละ 10.4 และในกลุ่มควบคุมก็มีการกระจายตัวที่ใกล้เคียงกันนั่นคือมีผู้ที่มี homozygous major genotype (AA) อยู่อ้อยละ 49.5 เช่นเดียวกับกลุ่มเป้าหมาย แต่มี heterozygous genotype (AG) อยู่อ้อยละ 42.3 และ homozygous minor genotype (GG) อยู่อ้อยละ 8.2 (ดังภาพที่ 13 และตารางที่ 11) ซึ่งการกระจายตัวของ genotype ของ rs17401966 ในไทยนี้ใกล้เคียงกับในประชากรฮ่องกงมาก และมีความแตกต่างกับประชากรซาอุดีอาระเบียทั้งนี้รูปแบบการกระจายตัวของ genotype ของ rs17401966 อาจแตกต่างกันขึ้นกับชาติพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า rs17401966 ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส

ดับอักเสบบีในไทย (p-value = 0.998, OR = 1.00 and 95% CI = 0.68-1.48) และกลุ่มประชากรข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งขัดแย้งกับผลการศึกษาในกลุ่มประชากรจีนแผ่นดินใหญ่ตามมณฑลต่างๆของจีนเช่น Guangxi, Beijing, Jiangsu, Guandong และ Shanghai พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มเป้าหมายและกลุ่มควบคุม โดยพบว่าในกลุ่มประชากรเป้าหมายจะมี homozygous major genotype (AA) สูงกว่าในกลุ่มควบคุม ในขณะที่เดียวกันก็มี heterozygous genotype (AG) และ homozygous minor genotype (GG) น้อยกว่ากลุ่มควบคุมเช่นกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่า rs17401966 มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในจีน [10] ความไม่สอดคล้องของผลการศึกษาในประเทศต่างๆนี้อาจเกิดจากปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับนอกเหนือจากความหลากหลายทางชาติพันธุ์ ทั้งนี้มีงานวิจัยมากมายชี้ให้เห็นถึงปัจจัยร่วมในการเกิดมะเร็งตับเช่น อายุ เพศ การดื่มแอลกอฮอล์ ปริมาณโฟเลตที่ได้รับการได้รับสารพิษในกลุ่ม aflatoxin ที่ปนเปื้อนในอาหาร การกลายพันธุ์ของยีน *p53* และปัจจัยร่วมที่เกิดจากไวรัส เช่นการกลายพันธุ์ของไวรัส การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype ต่างๆ ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดมะเร็งตับ [35,42]

ทั้งนี้การเกิดมะเร็งตับเป็นเป็นขั้นตอนที่ซับซ้อนและมีปัจจัยร่วมหลายปัจจัยเช่น ความแตกต่างทางเพศโดยพบว่าเพศชายมีโอกาสเป็นมะเร็งตับมากกว่าเพศหญิง [3,4,15] และมีการศึกษาพบว่าระดับฮอร์โมนเพศชายยังมีผลต่อการก่อให้เกิดมะเร็งตับอีกด้วย [18] และมักพบผู้ป่วยมะเร็งตับในประชากรที่มีอายุมาก [2,4] อาจเนื่องมาจากการเกิดมะเร็งตับนั้นเกิดจากการสะสมความผิดปกติทางพันธุกรรมดังนั้นผู้สูงอายุจึงเป็นกลุ่มประชากรที่มีโอกาสสะสมความผิดปกติไว้ได้มากกว่ากลุ่มผู้ที่มีอายุน้อยกว่า และการดื่มแอลกอฮอล์ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมจะเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับขึ้นถึง 5 เท่าโดยผู้ป่วยอาจมีภาวะตับแข็งร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้ [28] แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าปริมาณการได้รับโฟเลต อาจช่วยในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งตับที่เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ได้เช่นกัน [29] โดยจะเห็นได้ว่าปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อกันและกันแสดงให้เห็นถึงความซับซ้อนในการเกิดมะเร็งตับ นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้น การได้รับสารพิษกลุ่ม aflatoxin โดยเฉพาะอย่างยิ่ง aflatoxin B1 ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็งที่สำคัญที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น การกลายพันธุ์ R249S ในยีน *p53* ซึ่งเป็น tumor suppressor gene โดยพบว่ามี การกลายพันธุ์ของยีน *p53* สูงมากในแอฟริกาและจีนซึ่งเป็นผลมาจากการได้รับ aflatoxin [33, 34, 35] และ

นอกจากปัจจัยแวดล้อมต่างๆแล้ว ยังมีปัจจัยจากไวรัสที่ส่งผลต่อการเกิดมะเร็งตับอีกด้วยไม่ว่าจะเป็น การกลายพันธุ์ของไวรัสและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype ต่างๆกัน โดยพบว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C นั้นมีความสัมพันธ์กับอุบัติการณ์ของมะเร็งตับหรือก็คือผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส genotype C จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับเพิ่มขึ้นกว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัส genotype อื่นๆ และความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับจะยิ่งเพิ่มมากขึ้นอีกหากพบว่าผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ร่วมกับการตรวจพบการกลายพันธุ์ของไวรัสที่ basal core promoter [76] และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype ต่างๆกันในแต่ละประเทศยังส่งผลต่อการเกิดมะเร็งตับที่ไม่เท่ากันในแต่ละประเทศด้วย โดยการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C ในประเทศเกาหลีคิดเป็นร้อยละ 100 ของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และร้อยละ 82.3, 73 และ 50.9 ในประเทศญี่ปุ่น ไทย และจีนตามลำดับ [77-79] แต่ในขณะที่ชาวอุซเบก การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีส่วนใหญ่เป็น genotype D [80] ดังนั้นผู้วิจัยจึงคาดว่าปัจจัยที่กล่าวในข้างต้นอาจส่งผลให้เกิดความแตกต่างระหว่างผลการศึกษาความสัมพันธ์ของ rs17401966 กับการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่อย่างไรก็ดีข้อมูลด้านไวรัสไม่ว่าจะเป็นปริมาณไวรัส หรือการกลายพันธุ์ในไวรัสเป็นข้อจำกัดในงานวิจัยนี้เนื่องจากผู้ป่วยหลายคนจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสส่งผลให้ปริมาณไวรัสในเลือดลดต่ำลงจนไม่สามารถตรวจหาได้ในบางราย และข้อจำกัดในการหาผู้ป่วยกลุ่มควบคุมที่มีอายุใกล้เคียงกับกลุ่มเป้าหมายเนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งตับที่มาทำการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มีอายุค่อนข้างมาก

กล่าวโดยสรุปจากผลการศึกษาพบว่า rs17401966 ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในไทย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปัจจัยร่วมอื่นๆส่งผลต่อความซับซ้อนของกลไกการเกิดมะเร็งตับ และถึงแม้การตรวจ rs17401966 อาจจะยังไม่มีความสำคัญในการวางแผนการรักษาและประเมินความเสี่ยง แต่ในส่วนของการพัฒนาเทคนิค TaqMan probe real-time PCR เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ rs17401966 พบว่าสามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจได้ โดยมีความแม่นยำอยู่ที่ร้อยละ 94.34 และมีความไวอยู่ที่ 10^3 copies/ μ l และด้วยข้อดีของเทคนิคนี้ที่มีความรวดเร็วกว่าวิธี direct sequencing และลดขั้นตอนในการปฏิบัติการและลดโอกาสปนเปื้อน จึงอาจนำวิธี TaqMan probe real-time PCR ไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ทางคลินิกในโอกาสอื่นได้ในอนาคต

Populations	Case, n (%)						Control, n (%)						OR	95%CI	p-value	Reference
	Total	AA	AG	GG	A	G	Total	AA	AG	GG	A	G				
Chinese (Total)	2310	1497 (64.8)	736 (31.9)	77 (3.3)	3730 (80.7)	890 (19.3)	1789	936 (52.3)	715 (40.0)	138 (7.7)	2587 (72.3)	991 (27.7)	1.61	1.45-1.78	<0.001	Zhang et al., 2010
Japanese (Total)	321	196 (61.0)	107 (33.3)	18 (5.6)	499 (77.7)	143 (22.3)	1020	609 (59.7)	352 (34.5)	59 (5.8)	1570 (77.0)	470 (23.0)	0.94	0.76-1.16	0.572	Sawai et al., 2012
Korean	164	88 (53.6)	59 (36.0)	17 (10.4)	235 (71.6)	93 (28.4)	144	74 (51.4)	55 (38.2)	15 (10.4)	203 (70.5)	85 (29.5)	1.06	0.75-1.50	0.751	Sawai et al., 2012
Hong Kong Chinese	93	44 (46.8)	39 (41.5)	10 (10.6)	127 (68.3)	59 (31.7)	187	94 (50.3)	80 (42.8)	13 (6.9)	268 (71.7)	106 (28.3)	0.85	0.58-1.25	0.409	Sawai et al., 2012
Thai	202	100 (49.5)	81 (40.1)	21 (10.4)	281 (69.6)	123 (30.4)	196	97 (49.5)	83 (42.3)	16 (8.2)	277 (70.7)	115 (29.3)	0.95	0.70-1.28	0.733	This study
Saudi Arabian	183	127 (69.4)	47 (25.7)	9 (4.9)	301 (82.2)	65 (17.8)	72	47 (65.3)	22 (30.6)	3 (4.2)	116 (80.6)	28 (19.4)	1.12	0.68-1.83	0.657	Al-Qahtani et al., 2012

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบผลการศึกษากการกระจายตัวของ genotype ความถี่ allele ของ rs17401966 และ ความสัมพันธ์ต่อการเกิดมะเร็งตับในแต่ละกลุ่มประชากร

รายการอ้างอิง

- [1] พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์. ไวรัสตับอักเสบบีและมะเร็งตับ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ก. การพิมพ์เทียนกวาง, (ม.ป.ป.).
- [2] El-Serag, H.B. and Rudolph, K.L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. Gastroenterology 132 (Jun 2007): 2557-2576.
- [3] Parkin, D.M., et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC CancerBase 10 [Online]. 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr> [22/3/2013]
- [4] Tangkijvanich, P., Hirsch, P., Theamboonlers, A., Nuchprayoon, I., Poovorawan, Y. Association of hepatitis viruses with hepatocellular carcinoma in Thailand. J Gastroenterol 34 (1999): 227-233.
- [5] Tangkijvanich, P., Theamboonlers, A., Sriponthong, M., Kullavanijaya, P., Poovorawan, Y. SEN virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study. Am J Gastroenterol 98 (2003): 2500-2504.
- [6] พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์. การตรวจกรองโรคมะเร็งตับโดยใช้แอลฟาฟีโตโปรตีนและอัลตราซาวด์. ใน ชุมชน สวนกระต่าย และ ชานินทร์ อินทรกำจรชัย (บรรณาธิการ), Update in Problem-Based Medical Practices, หน้า 150-155. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.
- [7] El-Serag, H.B., Marrero, J.A., Rudolph, L. and Reddy, K.R. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 134 (May 2008): 1752-1763.
- [8] Kemp, W., Pianko, S., Nguyen, S., Bailey, M.J. and Roberts, S.K. Survival in hepatocellular carcinoma: impact of screening and etiology of liver disease. JGastroenterol Hepatol. 20(6) (Jun 2005): 873-881.
- [9] Bruix, J. and Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma. Hepatology 42(5) (2005): 1208-1236.

- [10] Zhang, H., et al. Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. Nat Genet. 42(9) (Sep 2010): 755-758.
- [11] Bagchi, A. and Mills, A.A., The quest for the 1p36 tumor suppressor. Cancer Res 68 (Apr 2008): 2551-2556
- [12] Al-Qahtani, A., et al. Role of Single Nucleotide Polymorphisms of *KIF1B* Gene in HBV-Associated Viral Hepatitis. PLoSOne 7 (9) (Sep 2012): e45128
- [13] Sawai, H., et al. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. BMC Med Genet 13 (Jun 2012): 47
- [14] Okuda, K., Nakanuma, Y. and Miyazaki, M. Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 1: epidemiology and etiology. J Gastroenterol Hepatol. 17(10) (Oct 2002): 1049-1055
- [15] Parkin, D.M., Whelan, S.L., Ferlay, J., Teppo, L. and Thomas D.B.eds. Cancer Incidence In five continents. Vol. VIII. No.155. Lyon: IARC Press, 2003
- [16] Sa-Nguanmoo, P., et al. Molecular Epidemiological Study of Hepatitis B Virus among Migrant Workers from Cambodia, Laos and Myanmar to Thailand. J Med Virol 82 (8) (Aug 2010): 1341-1349
- [17] Baig, S. Gender disparity in infections of Hepatitis B virus. J Coll Physicians Sug Pak. 19 (9) (Sep 2009): 598-600
- [18] Yu, M.W. and Chen, C.J. Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 53 (4) (Feb 1993): 790-794
- [19] Yu, M.W., et al. Hormonal markers and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study among men. J Natl Cancer Inst. 93 (21) (Nov 2001): 1644-1651

- [20] Pawarode, A., Tangkijvanich, P. and Voravud, N. Outcomes of primary hepatocellular carcinoma treatment: an 8-year experience with 368 patients in Thailand. J Gastroenterol Hepatol. 15 (8) (Aug 2000): 860-864
- [21] Llovet, J.M., et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. Hepatology. 29 (Jan 1999): 62-67
- [22] Zakim, D. and Boyer, T.B. Hepatology: A textbook of liver disease. Vol. 2. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990
- [23] Llovet, J.M., Brú, C. and Bruix, J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. Semin Liver Dis. 19 (3) (1999): 329-338
- [24] Verslype, C., et al. Hepatocellular carcinoma: ESMO-ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. Ann Oncol. 23 (Oct 2012): vii41-48
- [25] Lin, S.M., et al. Radiofrequency ablation improves prognosis ompared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma ≤ 4 cm. Gastroenterology 127 (Dec 2004): 1714-1723
- [26] Hassan, M.M., Frome, A., Patt, Y.Z. and El-serag, H.B. Rising prevalence of hepatitis C virus infection among patients recently diagnosed with hepatocellular carcinoma in the United States. J Clin Gastroenterol. 35 (Sep 2002): 266-269
- [27] Shi, J., Zhu, L., Liu, S. and Xie, W.F. A meta-analysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. Br J Cancer 92 (14 Feb 2005): 607-612
- [28] Morgan, T.R., Mandayam, S. and Jamal, M.M. Alcohol and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 127 (Nov 2004): S87-96

- [29] Persson, E.C., et al. Alcohol Consumption, Folate Intake, Hepatocellular Carcinoma, and Liver Disease Mortality. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 22 (2013): 415-421
- [30] Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M. and Losick, R. Molecular Biology of the Gene. 6th ed. New York: Cold Spring Harbor, (n.d.)
- [31] Marzilli, L.A., Wang, D., Kobertz, W.R., Essigmann, J.M. and Vouros, P. Mass Spectral Identification and Positional Mapping of Aflatoxin B1–Guanine Adducts in Oligonucleotides. J Am Soc Mass Spectrom. 9 (Jul 1998): 676-682
- [32] Macé, K., et al. Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. Carcinogenesis. 18 (Jul 1997): 1291-1297
- [33] Groopman, J.D., Johnson D. and Kensler, T.W. Aflatoxin and hepatitis B virus biomarkers: A paradigm for complex environmental exposures and cancer risk. Cancer Biomark. 1 (2005): 5-14
- [34] Ozturk, M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. Lancet. 338 (30 Nov 1991): 1356-1359
- [35] Montesano, R., Hainaut, P. and Wild, C.P. Hepatocellular carcinoma: from gene to public health. J Natl Cancer Inst. 89 (17 Dec 1997): 1844-1851
- [36] Ross, R.K., et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. Lancet 339 (1992): 943-946
- [37] Wu, H.C. and Santella, R. The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. Hepat Mon. 12 (Oct 2012): e7238
- [38] Winau, F., et al. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. Immunity. 26 (Jan 2007): 117-129
- [39] Stamenkovic, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. J Pathol. 200 (Jul 2003): 448-464

- [40] Friedman, S.L. Liver fibrosis – from bench to bedside *J Hepatol.* 38 (2003): S38-53
- [41] Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I. and Donato, F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology.* 127 (Nov 2004): S35-50
- [42] Lee, A.T. and Lee, C.G. Oncogenesis and transforming viruses: the hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma--the etiopathogenic link. *Front Biosci.* 12 (1 Jan 2007): 234-245
- [43] Wang, J., Zindy, F., Chenivresse, X., Lamas, E., Henglein, B. and Bréchet, C. Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 7 (Aug 1992): 1653-1656
- [44] Berasain, C., Patil, D., Perara, E., Huang, S.M., Mouly, H. and Brechet, C. Oncogenic activation of a human cyclin A2 targeted to the endoplasmic reticulum upon hepatitis B virus genome insertion. *Oncogene.* 16 (1998): 1277-1288
- [45] Zhou, Y.Z., Slagle, B.L., Donehower, L.A., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H. and Butel, J.S. Structural analysis of a hepatitis B virus genome integrated into chromosome 17p of a human hepatocellular carcinoma. *J Virol.* 62 (1988): 4224-4231
- [46] Slagle, B.L., Zhou, Y.Z. and Butel, J.S. Hepatitis B virus integration event in human chromosome 17p near the p53 gene identifies the region of the chromosome commonly deleted in virus-positive hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 51 (1991): 49-54
- [47] Hildt, E. and Hofschneider, P.H. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res.* 154 (1998): 315-329
- [48] Hildt, E., Saher, G., Bruss, V. and Hofschneider, P.H. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology.* 225 (Nov 1996): 235-239

- [49] Ameyar, M., Wisniewska, M. and Weitzman, J.B. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. Biochimie. 85 (Aug 2003): 747-752
- [50] Gilmore, T.D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. Oncogene. 25 (30 Oct 2006): 6680-6684
- [51] Paterlini, P., Poussin, K., Kew, M., Franco, D. and Brechot, C. Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. Hepatology. 21 (Feb 1995): 313-321
- [52] Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T. and Jay, G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature. 351 (23 May 1991): 317-320
- [53] Lee, A.T., Ren, J., Wong, E.T., Ban, K.H., Lee, L.A. and Lee, C.G. The hepatitis B virus X protein sensitizes HepG2 cells to UV light-induced DNA damage. J Biol Chem. 280 (30 Sep 2005): 33525-35
- [54] Wang, X.W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M.A., Gu, J.R. and Harris, C.C. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. Proc Natl Acad Sci U S A. 91 (15 Mar 1994): 2230-2234
- [55] Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C. and Cromlish, J.A. Direct Interaction of the Hepatitis B Virus HBx Protein with p53 Leads to Inhibition by HBx of p53 Response Element-Directed Transactivation. J Virol. 69 (Mar 1995): 1851-1859
- [56] Murata, M., et al. Hepatitis B virus X protein shifts human hepatic transforming growth factor (TGF)-beta signaling from tumor suppression to oncogenesis in early chronic hepatitis B. Hepatology. 49 (Apr 2009): 1203-1217

- [57] Libbrecht, L., Craninx, M., Nevens, F., Desmet, V., Roskams, T. Predictive value of liver cell dysplasia for development of hepatocellular carcinoma in patients with non-cirrhotic and cirrhotic chronic viral hepatitis. Histopathology 39 (2001): 66–73
- [58] Paradis, V. Histopathology of hepatocellular carcinoma. Recent Results Cancer Res. 190 (2013): 21-32
- [59] Kurbanov, F., Tanaka, Y. and Mizokami, M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. Hepatol Res. 40 (Jan 2010): 14-30
- [60] Louisirirochanakul, S., et al. The Distribution of Hepatitis B Virus Genotypes in Thailand. J Med Virol. 84 (Oct 2012): 1541-1547
- [61] Züchner, S., et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. Nat Genet. 36 (May 2004): 449-451
- [62] Nangaku, M., et al. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. Cell. 79 (30 Dec 1994): 1209-1220
- [63] Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., Hirokawa, N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. Proc Natl Acad Sci U S A. 98 (19 Jun 2001): 7004-7011
- [64] Bloom, GS. The UNC-104/KIF1 family of kinesins. Curr Opin Cell Biol. 13 (Feb 2001): 36-40
- [65] Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. Cell. 105 (1 Jun 2001): 587-597
- [66] Nakamura, N., Miyake, Y., Matsushita, M., Tanaka, S., Inoue, H., Kanazawa, H. KIF1Bbeta2, capable of interacting with CHP, is localized to synaptic vesicles. J Biochem. 132 (Sep 2002): 483-491

- [67] Matsushita, M., Tanaka, S., Nakamura, N., Inoue, H., Kanazawa, H. A novel kinesin-like protein, KIF1Bbeta3 is involved in the movement of lysosomes to the cell periphery in non-neuronal cells. Traffic. 5 (Mar 2004): 140-151
- [68] Munirajan, A.K., et al. KIF1Bbeta functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. J Biol Chem. 283 (5 Sep 2008): 24426-24434
- [69] Schlisio, S., et al. The kinesin KIF1B-beta (sic) acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. Genes Dev. 22 (1 Apr 2008): 884-893
- [70] Genetic Science Learning Center. Making SNPs Make Sense. Learn. Genetics. [Online]. 6 Aug 2012. Available from: <http://learn.genetics.utah.edu/content/health/pharma/snips/> [2/4/2013]
- [71] Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP) [Online]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. dbSNP accession: ss275711116, (dbSNP Build ID: 123/137). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> [2/4/2013]
- [72] Casper, M., Grünhage, F., Lammert, F. Cancer risk in chronic hepatitis B: Do genome-wide association studies hit the mark? Hepatology. 53 (Apr 2011): 1390-1392
- [73] Zhong, R., et al. HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility gene KIF1B is not associated with development of chronic hepatitis B. PLoS One. 7 (2012): e28839
- [74] Karkare, S. and Bhatnagar, D. Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino. Appl Microbiol Biotechnol. 71 (Aug 2006): 575-586
- [75] Gibson, N.J. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. Clin Chim Acta. 363 (Jan 2006): 32-47

- [76] Yang, H.I., et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. J Natl Cancer Inst. 100 (20 Aug 2008) 1134-1143
- [77] Kim, H., et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) genotypes and serotypes in patients with chronic HBV infection in Korea. Intervirology. 50 (2007):52-57
- [78] Matsuura, K., et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. J Clin Microbiol. 47 (2009): 1476-1483
- [79] Tangkijvanich, P., et al. Hepatitis B virus genotypes and Hepatocellular carcinoma in Thailand. World J Gastroenterol. 11 (2005): 2238-2243
- [80] Abdo, A.A., et al. Hepatitis B genotypes: relation to clinical outcome in patients with chronic hepatitis B in Saudi Arabia. World J Gastroenterol. 12 (2006): 7019-7024

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง

1. Red Cell Lysis Buffer (RCLB)

1 M Tris – HCl	10	ml
----------------	----	----

5 M NaCl	2	ml
----------	---	----

1 M MgCl ₂	5	ml
-----------------------	---	----

จากนั้นเติม distilled water จนมีปริมาตร 1,000 ml แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. Phosphate Buffer Saline (PBS)

PBS	9.88	g
-----	------	---

จากนั้นเติม distilled water จนมีปริมาตร 1,000 ml นำไป autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1. Lysis buffer

Tris – HCl	0.105	g
------------	-------	---

EDTA	0.1245	g
------	--------	---

SDS	0.335	g
-----	-------	---

จากนั้นเติม distilled water จนมีปริมาตร 50 ml แล้วเก็บที่ 4 °C

2. 20 mg/ml proteinase K

Proteinase K	2	ml
--------------	---	----

จากนั้นเติม distilled water 100 ml แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. 2M Sodium Acetate (2M NaOAc)

Sodium acetate	4.92	g
----------------	------	---

เติม distilled water 30 ml

4. Chloroform (CHCl₃): Isoamyl Alcohol (IAA), 49:1

Isoamyl Alcohol	1	ml
-----------------	---	----

เติม Chloroform จนปริมาตรรวมเป็น 50 ml

5. 70% Ethanol

Absolute Ethanol	70	ml
------------------	----	----

เติม distilled water ให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 ml

การเตรียมสารเคมีสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์

1. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	4	g
-------------	---	---

1 x TBE	200	ml
---------	-----	----

เขย่าให้เจลกระจายตัวแล้วอุ่นจน agarose gel ละลายหมด

2. 5xTris borate buffer (5 x TBE)

Tris-base	54	g
-----------	----	---

Boric acid	27.5	g
------------	------	---

EDTA (pH 8.0)	20	ml
---------------	----	----

จากนั้นเติม distilled water จนปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	μ l
------------------	----	---------

Distilled water	300	ml
-----------------	-----	----

4. Loading dye

0.25% Bromphenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติม distilled water จนมีปริมาตร 50 ml แล้วเก็บที่ 4 °C

การเตรียมสารเคมีในการทำ cloning

1. LB/ampicillin/IPTG/X-Gal agar plate 100 ml

agar	1.5	g
------	-----	---

yeast extract	0.5	g
---------------	-----	---

peptone	1	g
---------	---	---

NaCl	0.5	g
------	-----	---

เติม distilled water ให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 ml แล้วนำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch² จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลง เติม ampicillin 100 μ g/ml แล้วเตรียมใส่ plate ปริมาตร 35 ml

2. LB broth 50 ml

yeast extract	0.25	g
peptone	0.5	g
NaCl	0.25	g

เติม distilled water จนมีปริมาตรรวมเป็น 50 ml แล้วนำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch² เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุ่นจากนั้นเติม ampicillin จนความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/ml

3. SOC medium 100 ml

yeast extract	0.5	g
peptone	2	g
NaCl	1	ml
KCl	0.25	ml

เติม distilled water จนปริมาตรรวมเป็น 100 ml จากนั้นเติมกลูโคส 100 µl และ Mg²⁺ 100 µl

ภาคผนวก ข

ข้อมูลรายละเอียดของประชากรของกลุ่มเป้าหมาย

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
LM3	ชาย	49	GG
LM5	หญิง	60	AA
LM7	หญิง	79	AA
LM10	ชาย	57	AA
LM11	ชาย	52	AA
LM12	ชาย	79	AG
LM16	หญิง	56	AA
LM18	ชาย	56	AG
LM19	ชาย	67	AG
LM22	ชาย	55	GG
LM23	ชาย	63	AA
LM31	ชาย	58	AA
LM35	ชาย	45	AG
LM37	หญิง	26	AG
LM39	ชาย	40	AA
LM40	ชาย	55	AA
LM41	ชาย	45	AG
LM42	ชาย	84	AA
LM43	ชาย	77	AA
LM45	ชาย	58	AA
LM49	ชาย	69	AA
LM51	ชาย	65	AA
LM55	ชาย	56	AA
LM56	ชาย	42	AG
LM61	ชาย	64	AG

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
LM63	ชาย	57	AA
LM64	ชาย	66	AA
LM66	ชาย	58	AG
LM67	หญิง	71	AG
LM69	ชาย	64	GG
LM71	ชาย	54	AA
LM72	ชาย	42	AA
LM73	ชาย	45	AA
LM74	หญิง	38	AA
LM81	ชาย	62	AG
LM82	ชาย	62	AG
LM84	ชาย	56	AG
LM86	ชาย	71	AG
LM88	ชาย	53	GG
LM89	ชาย	41	AG
LM91	ชาย	57	GG
LM92	ชาย	47	AG
LM94	ชาย	49	AA
LM95	ชาย	63	AA
LM98	หญิง	65	GG
LM100	ชาย	69	AG
LM105	ชาย	46	AG
LM106	หญิง	80	AA
LM108	ชาย	57	GG
LM109	ชาย	72	GG

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
LM110	ชาย	59	AG
LM112	ชาย	47	AG
LM118	ชาย	59	AA
LM119	ชาย	52	AA
LM120	ชาย	57	AA
LM121	ชาย	44	AA
LM124	ชาย	58	AA
LM128	ชาย	45	AG
LM130	ชาย	45	AG
LM132	หญิง	66	AG
LM134	ชาย	66	AG
LM136	ชาย	41	AA
LM140	ชาย	69	AA
LM141	ชาย	43	AA
LM142	ชาย	66	AA
LM143	ชาย	62	AA
LM146	ชาย	82	AA
LM147	ชาย	73	AG
LM149	หญิง	48	AG
LM152	ชาย	65	AA
LM153	ชาย	77	GG
LM154	ชาย	53	AA
LM155	ชาย	83	GG
LM157	ชาย	48	AG
LM157	ชาย	48	AG
LM158	หญิง	36	AA
LM159	หญิง	59	AG
LM162	ชาย	80	GG

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
LM163	ชาย	49	AA
LM164	หญิง	71	AA
LM165	หญิง	46	AA
LM171	ชาย	73	AG
LM172	ชาย	42	AA
LM175	ชาย	54	AG
LM176	หญิง	60	AG
LM177	ชาย	56	GG
LM178	ชาย	54	AA
LM186	หญิง	77	AA
LM187	ชาย	57	AG
LM189	หญิง	60	AA
LM192	หญิง	68	AG
LM193	ชาย	57	AG
LM203	ชาย	72	AG
LM204	ชาย	68	AA
LM205	ชาย	56	AA
LM212	ชาย	55	AG
LM215	หญิง	83	AA
LM216	ชาย	67	AG
LM217	ชาย	60	AA
LM219	ชาย	66	AA
LM220	หญิง	71	AG
LM221	ชาย	70	AG
LM222	ชาย	52	AA
LM224	ชาย	42	AA
LM226	ชาย	70	AA
LM228	ชาย	71	AG

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
LM229	ชาย	82	AA
LM230	ชาย	65	AA
LM235	หญิง	61	AG
LM236	ชาย	48	AG
LM237	ชาย	66	AG
LM238	ชาย	62	AA
LM242	ชาย	50	GG
LM243	ชาย	64	AA
LM244	หญิง	64	AA
LM248	ชาย	79	AA
LM250	หญิง	58	AA
LM251	หญิง	47	AG
LM253	หญิง	63	AA
LM254	ชาย	61	AG
LM255	ชาย	61	AG
LM256	หญิง	64	AG
LM258	ชาย	64	AA
LM259	ชาย	33	AG
LM260	ชาย	39	AA
LM261	ชาย	56	AG
LM265	หญิง	81	AG
LM266	ชาย	65	AG
LM269	หญิง	89	AA
LM270	ชาย	79	AA
LM271	ชาย	66	AA
LM274	หญิง	64	AA
LM275	หญิง	64	AA
LM277	ชาย	73	GG

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
LM278	ชาย	78	AA
LM289	ชาย	38	AG
LM290	ชาย	33	AG
LM295	ชาย	54	AA
LM296	ชาย	54	AA
LM301	ชาย	42	AG
LM302	ชาย	51	AA
LM303	หญิง	78	AG
LM305	ชาย	47	AA
LM320	ชาย	43	AG
LM321	ชาย	77	AA
LM323	หญิง	57	AA
LM324	หญิง	75	GG
LM325	ชาย	53	AA
LM326	หญิง	77	AG
LM328	ชาย	55	AG
LM329	หญิง	53	AG
LM330	ชาย	49	AG
LM331	หญิง	78	GG
LM333	ชาย	63	AG
LM334	ชาย	74	AA
LM335	ชาย	73	AA
LM336	ชาย	72	GG
LM338	ชาย	61	GG
LM340	หญิง	37	AA
LM341	ชาย	44	AG
LM344	หญิง	77	AA
LM345	ชาย	74	AG

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
LM350	หญิง	61	AA
LM351	ชาย	68	AG
LM353	ชาย	69	AG
LM354	ชาย	66	AA
LM357	ชาย	47	AA
LM358	ชาย	62	AG
LM359	ชาย	49	GG
LM362	ชาย	72	AA
LM363	ชาย	38	AG
LM364	ชาย	60	AA
LM373	ชาย	44	AA
LM377	ชาย	44	AA
LM393	ชาย	53	AA
LM405	ชาย	50	AA
LM411	ชาย	61	AG
LM412	ชาย	53	AG
LM421	ชาย	73	AA
LM426	ชาย	52	AG
LM441	ชาย	54	AG
LM443	ชาย	62	AA
LM450	ชาย	45	GG
LM463	หญิง	63	AG
LM465	ชาย	72	AG
LM466	ชาย	68	AA
LM470	ชาย	66	AA

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
LM471	หญิง	69	AA
LM475	หญิง	70	AG
LM486	ชาย	61	AG
LM492	ชาย	68	AG
LM507	ชาย	51	AA
LM523	ชาย	65	AG
LM526	ชาย	62	AA
LM527	ชาย	64	AG
LM537	หญิง	54	GG
LM544	ชาย	63	AG
LM545	ชาย	61	AG
LM546	ชาย	64	AA
LM553	ชาย	84	AA
LM568	ชาย	55	GG
LM572	ชาย	71	AG
LM573	ชาย	30	AA

ข้อมูลเบื้องต้นของประชากรในกลุ่มควบคุม

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
BC1	ชาย	55	AG
BC2	หญิง	55	AG
BC3	ชาย	54	AG
BC4	หญิง	56	AG
BC5	ชาย	54	AG
BC6	ชาย	54	AA
BC7	หญิง	64	GG
BC8	หญิง	42	AA
BC9	ชาย	50	AA
BC10	ชาย	55	AA
BC11	หญิง	53	GG
BC12	ชาย	54	AG
BC13	ชาย	45	AG
BC14	หญิง	45	AG
BC15	ชาย	44	AA
BC17	ชาย	47	AG
BC18	หญิง	44	AA
BC19	หญิง	50	AA
BC20	ชาย	69	AG
BC21	ชาย	50	AA
BC22	หญิง	54	AA
BC23	หญิง	61	AG
BC24	หญิง	47	AA
BC25	ชาย	59	AA
BC26	ชาย	54	AA
BC27	หญิง	47	AG
BC28	หญิง	58	AG

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
BC29	หญิง	55	AG
BC30	ชาย	45	AG
BC31	หญิง	53	AG
BC32	หญิง	48	AA
BC33	หญิง	52	AG
BC34	หญิง	54	AA
BC35	ชาย	48	AA
BC36	ชาย	43	AA
BC37	หญิง	57	AA
BC38	ชาย	56	AG
BC39	หญิง	42	AG
BC40	ชาย	58	AA
BC41	ชาย	42	GG
BC42	หญิง	57	AG
BC43	ชาย	45	AA
BC44	หญิง	49	GG
BC45	หญิง	70	AA
BC46	หญิง	70	AG
BC47	ชาย	78	AA
BC48	หญิง	57	AG
BC49	หญิง	80	AA
BC50	ชาย	45	AA
BC51	ชาย	41	AA
BC52	ชาย	51	AA
BC53	หญิง	52	AG
BC54	หญิง	55	AA
BC55	ชาย	57	GG

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
BC56	ชาย	56	AA
BC57	ชาย	53	AA
BC58	ชาย	50	AA
BC59	ชาย	62	AG
BC60	ชาย	52	AA
BC61	ชาย	44	GG
BC62	ชาย	46	AG
BC63	หญิง	52	AA
BC64	หญิง	59	AG
BC65	หญิง	56	AA
BC66	ชาย	49	AA
BC67	ชาย	52	AG
BC68	ชาย	46	AG
BC69	ชาย	44	GG
BC70	ชาย	43	AA
BC71	ชาย	42	AG
BC72	ชาย	51	AA
BC73	ชาย	51	AA
BC74	ชาย	48	AA
BC75	ชาย	45	AG
BC76	หญิง	42	AG
BC77	ชาย	45	AG
BC78	ชาย	68	AA
BC79	ชาย	51	AG
BC80	ชาย	40	AA
BC81	ชาย	50	AG
BC82	ชาย	45	AA
BC83	หญิง	53	AA

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
BC84	ชาย	51	AG
BC85	ชาย	41	GG
BC86	หญิง	42	AA
BC87	หญิง	40	AG
BC88	ชาย	41	AA
BC89	หญิง	40	AA
BC90	ชาย	62	AA
BC91	ชาย	45	AG
BC92	หญิง	53	AA
BC93	หญิง	40	AA
BC94	ชาย	61	AA
BC95	หญิง	40	AG
BC96	หญิง	50	AG
BC97	ชาย	42	AG
BC98	หญิง	33	AG
BC99	ชาย	54	AA
BC100	ชาย	52	GG
BC101	ชาย	43	AA
BC102	ชาย	43	GG
BC103	ชาย	32	AG
BC104	ชาย	37	AG
BC105	ชาย	31	AA
BC106	หญิง	56	AG
BC107	ชาย	43	AG
BC108	หญิง	35	AG
BC109	ชาย	46	AA
BC110	ชาย	54	AG
BC111	หญิง	31	AA

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
BC112	ชาย	56	AA
BC113	ชาย	52	AG
BC114	ชาย	35	AA
BC115	ชาย	44	AG
BC116	ชาย	43	AG
BC117	หญิง	34	AA
BC118	ชาย	39	AA
BC119	ชาย	31	AG
BC121	ชาย	57	AA
BC122	ชาย	62	AA
BC123	ชาย	48	AG
BC124	ชาย	40	AA
BC125	ชาย	45	AA
BC126	ชาย	51	AG
BC127	ชาย	32	AG
BC128	ชาย	34	AG
BC129	ชาย	42	AA
BC130	หญิง	53	AG
BC131	ชาย	44	AA
BC132	ชาย	45	AG
BC133	ชาย	49	AG
BC134	ชาย	45	AG
BC135	ชาย	21	AA
BC136	หญิง	41	AG
BC137	หญิง	36	AA
BC138	ชาย	38	AA
BC139	ชาย	42	AA
BC140	ชาย	45	AA

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
BC141	ชาย	26	AG
BC142	หญิง	43	AG
BC143	ชาย	41	AA
BC144	ชาย	60	AA
BC145	หญิง	33	AA
BC146	ชาย	49	AG
BC147	หญิง	35	AA
BC148	ชาย	31	AA
BC149	ชาย	33	AG
BC150	ชาย	40	AA
BC151	ชาย	48	AG
BC152	ชาย	40	AG
BC153	หญิง	29	AA
BC154	ชาย	40	AA
BC155	หญิง	44	AA
BC156	ชาย	42	GG
BC157	ชาย	54	AG
BC158	ชาย	30	AA
BC159	ชาย	31	AG
BC160	หญิง	36	AG
BC161	หญิง	37	AA
BC162	ชาย	33	AA
BC163	ชาย	31	GG
BC164	หญิง	48	AA
BC165	ชาย	51	AG
BC166	ชาย	50	AG
BC167	ชาย	46	AA
BC168	ชาย	35	AA

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
BC169	หญิง	45	GG
BC170	ชาย	49	AA
BC171	ชาย	67	AG
BC172	ชาย	30	AA
BC173	ชาย	59	AG
BC174	หญิง	56	AG
BC175	หญิง	28	AA
BC176	ชาย	31	AG
BC177	หญิง	29	GG
BC178	ชาย	29	AA
BC179	หญิง	40	AG
BC180	ชาย	38	AA
BC181	ชาย	42	AG
BC182	ชาย	53	GG
BC183	ชาย	35	AA
BC184	ชาย	46	GG
BC185	ชาย	45	AA
BC186	หญิง	41	AG
BC187	ชาย	32	AA
BC188	หญิง	22	AA
BC189	ชาย	46	AG
BC190	ชาย	36	AA
BC191	หญิง	51	AG
BC192	ชาย	39	AA
BC193	ชาย	39	AA
BC194	ชาย	40	AG
BC195	ชาย	48	AG
BC196	หญิง	50	AA

Code	เพศ	อายุ	rs17401966
BC197	ชาย	34	AA
BC198	ชาย	44	AG

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล วทัญญู โสภิพงษ์ เพศ ชาย

อายุ 24 ปี เกิด 22 ตุลาคม 2531

สถานที่เกิด โรงพยาบาล มิชชั่น กรุงเทพฯ

ที่อยู่ 164 ซอยท่าดินแดง 17 ถนนท่าดินแดง แขวงสมเด็จเจ้าพระยา เขตคลองสาน กรุงเทพฯ 10600

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมี)

จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2552

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2553

การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

เสนอผลงานหัวข้อเรื่อง : Single nucleotide polymorphism of KIF1B (rs17401966) is not associated with the development of HBV-related hepatocellular carcinoma in Thai patients

เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Asian Pacific Journal of Cancer Prevention