ความชุกของการกลายพันธุ์ของโปรตีนพี 53 ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 249 จากอาร์จีนีนเป็นซีรีน ในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีและไม่มีแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทย

นายศัลยวิทย์ จิตต์มิตรภาพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE OF ARGININE TO SERINE P53 MUTATION AT CODON 249 (R249S) IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA OF PATIENTS WITH AND WITHOUT SERUM HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN IN THAILAND

Mr. Salyavit Chittmittrapap

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine
Department of Medicine
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกของการกลายพันธุ์ของโปรตีนพี 53 ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 249 จากอาร์จีนีนเป็นสิวซีนในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีและไม่มีแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทย
โดย	นาย ศัลยวิทย์ จิตต์มิตรภาพ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมเกียรติ แสงวัฒนาโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ นายแพทย์ ณัฐ พสุธารชาติ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ทวีศักดิ์ แทนวันดี)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศัลยวิทย์ จิตต์มิตรภาพ : ความชุกของการกลายพันธุ์ของโปรตีนพี 53 ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 249 จากอาร์จีนีนเป็นซีรีนในผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่มีและไม่มีแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทย. อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.นพ.ดร. ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ 51 หน้า.

ที่มาของการศึกษา

การกลายพันธุ์ของโปรตีนพี 53 ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 249 จากอาร์จีนีนเป็นซีรีน (R249S) เป็นลักษณะจำเพาะของการได้รับสารอะฟลาทอกซิน การประมาณการณ์ความชุกของการกลายพันธุ์นี้พบว่ามีความชุกระหว่างร้อยละ 7 ถึง 27 แต่เป็นการศึกษาขนาดเล็ก นอกจากนั้นไวรัสตับอักเสบบีซึ่งเป็นไวรัสที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยตับแข็งในประเทศไทย ยังเพิ่มความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับในผู้ที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาชนิดย้อนหลังที่นำชิ้นเนื้อมะเร็งตับที่เก็บไว้ในพาราฟิน โดยชิ้นเนื้อดังกล่าวได้จากผู้ป่วยที่ได้รับการเจาะตับหรือผ่าตัดตับที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ชิ้นเนื้อตับที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นมะเร็งตับปฐมภูมิ (Hepatocellular carcinoma) จะนำมาตรวจการกลายพันธุ์โดยวิธี Restriction fragment length polymorphism (RFLP) สารพันธุกรรมที่พบกลายพันธุ์ R249S โดยวิธี RFLP จะได้รับการยืนยันโดยวิธีการตรวจคู่เบส (sequencing)

ผลการศึกษา

พบการกลายพันธุ์ R249S ในเนื้อมะเร็งตับ 9 ตัวอย่างจาก 100 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9 โดย 6 ตัวอย่างเป็นมะเร็งตับของผู้ที่มีแอนติเจน HBsAg และส่วน 3 ตัวอย่างล้วนแต่มีแอนติบอดี้ AntiHBc ความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ในเนื้อมะเร็งตับกลุ่มที่มีแอนติเจน HBsAg เท่ากับร้อยละ 11.3 ซึ่งมากกว่าร้อยละ 6.4 จากกลุ่มที่ไม่มีแอนติเจนดังกล่าว แม้จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ในผู้ป่วยมะเร็งตับ 100 รายพบ HBsAg เป็นบวก 53 ราย และ AntiHCV เป็นบวก 11 ราย ผลตรวจของชิ้นเนื้อตับที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง 10 ราย พบว่า ทั้งหมดมีไม่มีการกลายพันธุ์ R249S

สรุป

ความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ในเนื้อมะเร็งตับของประเทศไทยมีประมาณ ร้อยละ 9 อาจอนุมานได้ว่าการได้รับสารอะฟลาทอกซินยังคงเป็นปัญหาในผู้ป่วยมะเร็งตับส่วนหนึ่งของประเทศไทย อย่างไรก็ตามการแนะนำให้ผู้ป่วยหลีกเลี่ยงถั่วลิสง พริกปน หรือข้าวโพดอาจยังไม่มีความจำเป็นที่ชัดเจน เพราะไม่มีหลักฐานที่พิสูจน์ว่าการหลีกเลี่ยงอาหารจะลดความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับ และมะเร็งตับของ

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต ศัลยวิทย์

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ปิยะวัฒน์

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ยง ภู่

52 74817230 : MAJOR MEDICINE

KEY WORDS: P53 mutation / 249ser / R249S / Hepatocellular carcinoma / HBsAg / Tumor suppressor gene

SALYAVIT CHITTMITTRAPAP, MD : PREVALENCE OF ARGININE TO SERINE P53 MUTATION AT CODON 249 (R249S) IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA OF PATIENTS WITH AND WITHOUT SERUM HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN IN THAILAND. ADVISOR : ASST. PROF. PIYAWAT KOMOLMIT, M.D., Ph.D., CO-ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., 51 pp.

Background: Missense hot spot mutation of p53 tumor suppressor gene on codon 249 or R249S was characteristic of aflatoxin exposure. Base on the few studies with small samples size, prevalence of R249S mutation in Hepatocellular carcinoma (HCC) in Thailand was 7-27 %. Moreover, Aflatoxin was believed to had synergistic effect on Hepatitis virus B (HBV) carcinogenesis. R249S prevalence was higher in patients with HBV surface antigen (HBsAg) positive than one who was not infected with HBV. Therefore, aim of this study is to determine the prevalence of this R249S mutation in patients with hepatocellar carcinoma

Methods: The study was retrospective descriptive study. 100 paraffin embedded liver tissues from patient who underwent liver resection and liver biopsy in King Chulalongkorn Memorial Hospital were studied. All of them had pathological diagnosis of HCC. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) was utilized to detect R249S mutation. Positive results were confirmed by direct sequencing.

Results: R249S mutation was found in 9 specimens (9 %), 6 of 9 were HBsAg positive. Fifty-three of 100 patients had HBsAg, 11 were positive for HCV antibody . R249S prevalence among HCC patients with positive HBsAg were 11.3 % compared to 6.4 % of HBsAg negative group, but the difference was not reach statistical significance. No R249S mutation was detected in 10 liver tissue specimens without hepatocellular carcinoma.

Conclusion: Prevalence of R249S mutation in Thailand was 9 %. Aflatoxin exposure may not be a major risk factor of HCC in Thailand. However it is controversy to advise the patients to strictly avoid eating peanut, corn and chili.

Department : Medicine	Student's Signature .....
Field of Study : Medicine	Advisor's Signature .....
Academic Year : 2010	Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของอาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งมี 4 ท่านได้แก่ ผศ. ดร.นพ. ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์, ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ, รศ. นพ. พิสิฐ ตั้งกิจวานิช และ รศ. พญ. นฤมล วิเศษโอภาส ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการทำวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่หน่วยโรคระบบทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาพยาธิที่ช่วยเหลือในการตรียมชิ้นเนื้อตับ

ขอขอบคุณ ดร.ทวีศักดิ์ เชี่ยวชาญศิลป์ และห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์สำหรับการดำเนินการตรวจการกลายพันธุ์

ขอขอบคุณ นพ. นริศร ลักคณานุรักษ์, นพ. มงคล สมพรรัตนาพันธุ์, พญ ธนุตรา จงเสถียรธรรม และ คุณวาทิรา สัตยาพินัน ที่ช่วยงานเอกสารและรวบรวมข้อมูล

ขอขอบพระคุณผู้ป่วยที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้อย่างดี

สุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณ ครอบครัวที่เป็นกำลังใจที่สำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ช

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฌ

กิตติกรรมประกาศ..... ญ

สารบัญ..... ฏ

สารบัญตาราง..... ฐ

สารบัญภาพ..... ฑ

คำย่อ..... ฒ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 1

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 1

2 ทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 2

3 วิธีการดำเนินการ..... 6

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 6

รูปแบบการวิจัย (Research design)..... 7

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)..... 7

เกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)..... 7

เกณฑ์การตัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)..... 7

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)..... 8

การรวบรวมข้อมูล (Data collection)..... 8

วิธีการห้องปฏิบัติการ..... 8

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)..... 15

ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations)..... 16

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)..... 17

บทที่ หน้า

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefit and application)…….. 17

อุปสรรคที่ผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดขึ้นในขณะดำเนินการวิจัย และมาตรการในการแก้ไข (Obstacle)…….. 17

การบริหารการวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and time schedule)…… 18

งบประมาณรายจ่ายของโครงการวิจัย (Budget)…….. 18

4 ผลการวิจัย…… 19

5 อภิปรายผลวิจัย…… 24

6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ…… 28

รายการอ้างอิง…….. 29

ภาคผนวก…… 33

ภาคผนวก ก เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย…… 34

ภาคผนวก ข เอกสารข้อมูลอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย…….. 37

ภาคผนวก ค. แบบบันทึกผู้ป่วย……... 44

ภาคผนวก ง. ขั้นตอนวิธีการสกัด, เพิ่มปริมาณดีเอนเอและตรวจหาการกลายพันธุ์โดยละเอียด……..... 48

ภาคผนวก จ. คู่เบสของยีนที่ทำการศึกษา ……..... 50

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……51

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตารางที่ 1 อุบัติการณ์ของมะเร็งตับ, อัตราการติดเชื้อตับอักเสบบีเรื้อรัง, ปริมาณการได้รับสารอะฟลาทอกซิน และอัตราการกลายพันธุ์ชนิด R249S ในประเทศกำลังพัฒนาและประเทศพัฒนาแล้ว	3
2	ตารางที่ 2 ประสิทธิผลในการสกัดดีเอนเอจากชิ้นเนื้อที่เก็บในพาราฟินโดยการสกัดและการละลายพาราฟินด้วยวิธีต่าง ๆ	4
3	ตารางที่ 3 ลักษณะการกลายพันธุ์ R249S และผลการตรวจด้วย RFLP	14
4	ตารางที่ 4 ลักษณะของผู้ป่วยที่นำเข้ามาศึกษา	19
5	ตารางที่ 5 ผลการตรวจแอนติเจน HBsAg เทียบกับการกลายพันธุ์ R249S	21
6	ตารางที่ 6 รายละเอียดของผู้ป่วยที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ R249S	23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพที่ 1 รูปกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาทอกซินที่ได้รับ กับ ความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ..... ……	4
2	ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์การกลายพันธุ์..... ……	10
3	ภาพที่ 3 ชิ้นเนื้อตับจะถูกขูดออกจากสไลด์แก้วโดยใบมีด เบอร์ 11 โดยใช้ ใบมีด 1 อัน ต่อสไลด์ 1 แผ่น (1 ตัวอย่าง) และ ชิ้นเนื้อตับที่ถูกขูดออกมาจะ ก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็ก ก่อนจะนำมาสกัดดีเอนเอ…… …….....	11
4	ภาพที่ 4 ตู้ดูดอากาศที่ใช้ในการขูดชิ้นเนื้อและสกัดสารพันธุกรรม..... …….....	11
5	ภาพที่ 5 เครื่องพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ……..…….....	12
6	ภาพที่ 6 เครื่องอีเลคโตรโฟเรซีส…… …….....	12
7	ภาพที่ 7 ตัวอย่างจะถูกนำมาหยอดใส่ถาดหลุมก่อนที่จะนำมาผ่านกระแสไฟฟ้า.....	13
8	ภาพที่ 8 เครื่องถ่ายภาพด้วยรังสียูวี (UV illuminator)..... ……	12
9	ภาพที่ 9 ภาพถ่ายรังสียูวี แสดงผลการตรวจ RFLP……..……..	14
10	ภาพที่ 10 ภาพตัวอย่างผลการตรวจของตัวอย่างที่ 24 ถึง 33 และ ตัวควบคุม ผลบวก (uncut) ตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่โคดอน 249 จะแยกเป็น 2 แถบ ดังเช่นตัวอย่างที่ 24 ในขณะที่ตัวอย่างที่ 29 พบแถบเพียงแถบเดียวและมีความยาว ของสายใกล้เคียงกับผลควบคุมบวก จึงอ่านผลว่าตัวอย่างที่ 29 มีการกลายพันธุ์ R249S และทำการยืนยันโดยตัดเจลดังกล่าวไปส่งตรวจการเรียงตัวของคู่เบส (sequencing)…… ……..……	20
11	ภาพที่ 11 ผลการตรวจการเรียงตัวของคู่เบส (sequencing) จากตัวอย่างจากโคโลนี ของแบคทีเรียที่ใส่ตัวอย่างที่ 2 ลงไปและทำ RFLP ได้ว่าไม่มีการกลายพันธุ์ พบว่าได้ ผลเป็น wild type คือโคดอน 249 เป็น Adenine-Guanine-Guanine (AGG)……	21
12	ภาพที่ 12: ผลการตรวจการเรียงตัวของคู่เบส (sequencing) จากตัวอย่างจากโคโลนี ของแบคทีเรียที่ใส่ตัวอย่างที่ 2 ลงไปและทำ RFLP พบว่ามีการกลายพันธุ์ ……	22
13	ภาพที่ 13: ผลการตรวจการเรียงตัวของคู่เบส (sequencing) จากตัวอย่างที่ 2 จาก สารพันธุกรรมที่สกัดได้จากมะเร็งตับ ……..……	22

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BP base pairs

HBsAg แอนติเจนต่อเปลือกของไวรัสตับอักเสบบี

HBV ไวรัสตับอักเสบบี

HCC มะเร็งตับปฐมภูมิ ที่เกิดจากเซลล์ตับ

HCV ไวรัสตับอักเสบซี

R249S การกลายพันธุ์ของโปรตีนพี 53 ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 249 จากอาร์จีนีนเป็นซีรีน

RFLP วิธีการตัดด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะและแยกตามความหลากหลายของความยาวสายพันธุกรรม (Restriction fragment length polymorphism)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

มะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบมากในประเทศไทย (1) ซึ่งภาวะตับแข็ง การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ไวรัสตับอักเสบซี และการได้รับสารอะฟลาทอกซิน บี 1 เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma)

ในประเทศกำลังพัฒนาเช่น อียิปต์, แกมเบีย, ไต้หวัน และในบางมณฑลของประเทศจีน มีความชุกของมะเร็งตับสูงมาก การศึกษาในประเทศดังกล่าวพบว่ามีอัตราการติดเชื้อตับอักเสบบีเรื้อรังและปริมาณการได้รับสารอะฟลาทอกซินสูงมาก นอกจากนั้นยังพบว่าปัจจัยเสี่ยงทั้ง 2 เพิ่มความเสี่ยงของการเป็นโรคมะเร็งตับอย่างมาก ซึ่งในประเทศกำลังพัฒนาที่มีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารสูง พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ชนิด R249S จะสูงมาก ตรงข้ามกับประเทศพัฒนาแล้วที่มีการควบคุมอาหารและผลิตภัณฑ์การเกษตรให้มีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินต่ำ จะพบว่าอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ชนิด R249S ได้น้อยมาก การตรวจวัดปริมาณสารอะฟลาทอกซินในอาหารของประเทศไทย พบว่ามีค่าสารพิษดังกล่าวมากกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว แม้ว่าค่าจะต่ำกว่าประเทศจีนและประเทศกำลังพัฒนาในแอฟริกา (2) (ตารางที่ 1) ดังนั้นสารอะฟลาทอกซินจึงอาจมีบทบาทต่อการเกิดโรคมะเร็งตับในประเทศไทย และอาจจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ เพราะเป็นสาเหตุการเกิดมะเร็งที่ป้องกันได้และอาจประหยัดงบประมาณของประเทศได้อย่างมากเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งตับ

การประมาณการณ์ของการเกิดมะเร็งตับ ที่เกี่ยวข้องกับการได้รับสารอะฟลาทอกซิน มักใช้วิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของที่ตำแหน่งโคดอนที่ 249 ของเอกซอนที่ 7 ของยีน TP53 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17 (protein 53 tumor suppressor gene mutation at codon 249 on exon 7) ซึ่งจะเกิดการกลายพันธ์เพียงคู่เบสเดียวและทำให้กรดอะมิโนที่สร้างได้เปลี่ยนแปลงจากอาร์จีนีนกลายเป็นซีรีน (single base pair substitution causing missense mutation) หรือที่เรียกย่อว่า R249S ซึ่งในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าการได้รับสารอะฟลาทอกซินทำให้เกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวและเป็นปัจจัยส่งเสริมต่อการเกิดมะเร็งตับ

แม้ว่าจะมีผลการศึกษาการกลายพันธุ์ดังกล่าวในชิ้นเนื้อมะเร็งตับในประเทศไทยพบว่าอัตราการกลายพันธุ์ชนิด R249S ในมะเร็งตับของผู้ป่วยในประเทศไทยพบได้ร้อยละ 6-24 แต่การศึกษาที่ผ่านมามีจำนวนผู้ป่วยเพียง 15 ราย และ 25 ราย เท่านั้น ซึ่งไม่มากเพียงพอ และยังไม่มีข้อมูลมากเพียงพอจะให้คำแนะนำแก่ผู้ป่วยว่าการได้รับสารอะฟลาทอกซินมีความสำคัญต่อการเกิดโรคมะเร็งตับมากน้อยเพียงใด และต้องหลีกเลี่ยงอาหารที่มีโอกาสปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินหรือไม่

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ (Hepatocellular carcinoma) เป็นมะเร็งที่พบมากในประเทศไทย (1) ซึ่งไวรัสตับอักเสบบี ซี สุรา และ การได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี 1 เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งตับ

กลไกการเกิดมะเร็งตับนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าเป็นกลไกที่มีหลายขั้นตอน (multi-step)(3) การกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนพี 53 (Tumor suppressor gene) เป็นกลไกหนึ่งซึ่งพบว่าผิดปกติได้มากถึงร้อยละ 20-50 ของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ และมีการศึกษาหลายการศึกษาที่พบว่าการกลายพันธุ์ R249S สัมพันธ์กับการพบมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ โดยการกลายพันธุ์นี้แทบจะไม่พบเลยในผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคมะเร็งตับหรือในผู้ป่วยมะเร็งอื่น ๆ

โปรตีนพี 53 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการลดอัตราการเกิดมะเร็ง โดยยีนที่สร้างโปรตีนนี้ (TP53) จัดว่าเป็น Tumor suppressor gene ที่สำคัญ ยีน TP53 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 17 ตำแหน่ง 17p13.1 เป็นโปรตีนขนาด 53 กิโลดัลตัน มีหน้าที่ควบคุมเกี่ยวกับ cell cycle, apoptosis, DNA repair และ angiogenesis (4)

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วกันว่าการกลายพันธุ์ R249S นี้จำเพาะกับการได้รับสารอะฟลาทอกซินและสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับปฐมภูมิ มีการทดลองใส่สาอะฟลาทอกซินในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งเป็นโมเดลที่ยอมรับเป็นตัวแทนของเซลล์ตับ (Big Blue mouse embryonic fibroblast model) พบว่าสามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเบสกวานีนไปเป็นไทมีน บนตำแหน่งที่เทียบเท่ากับตำแหน่งโคดอนที่ 249 ของเซลล์มนุษย์ (5) การทดลองดังกล่าวเป็นการยืนยันความเชื่อเดิมอย่างชัดเจน การกลายพันธุ์ของยีนที่สร้างโปรตีนพี 53 (TP53) ที่พบในมะเร็งตับนั้นมีหลายชนิด แต่ในประเทศที่มีความชุกของมะเร็งตับสูง เช่นในประเทศจีน และ แกมเบีย การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่จะเป็นแบบ R249S (6-10)

การกลายพันธุ์ R249S นี้ จะทำให้การทำงานของโปรตีนพี 53 เปลี่ยนแปลงไปกล่าวคือ 1. ความผิดปกติของการ inhibition of apoptosis(11) 2.ความผิดปกจิของการยับยั้ง p53 mediated transcription(12) และ 3. กระตุ้นให้เซลล์ตับเติบโตได้เร็วขึ้น (13) และยังมีงานวิจัยที่พบว่าการได้รับสารอะฟลาทอกซินเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับในคน(14)

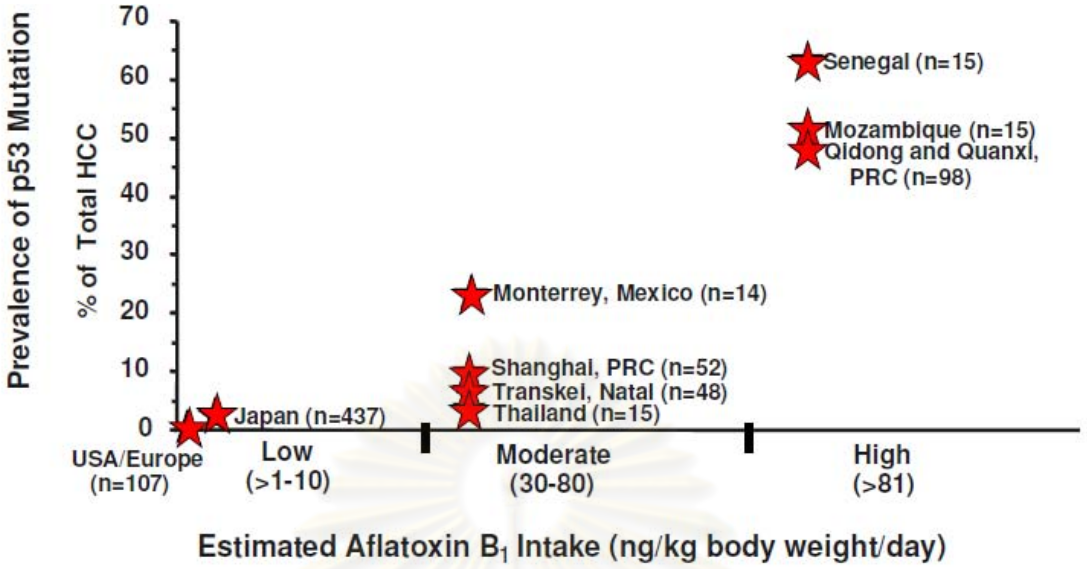
จากการประมาณการณ์พบว่า คนไทยได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินในระดับปานกลาง คือประมาณ 6-53 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อวัน (2, 15-16) ซึ่งปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่ได้รับนี้ ต่ำกว่าประเทศกำลังพัฒนาอื่น ๆ ที่พบอัตราการกลายพันธุ์สูง (รายละเอียดตามตารางที่ 2) แต่ก็สูงกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว จึงเป็นการยากที่จะอนุมานว่าการได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินในระดับปานกลางนี้จะมีผลต่อการเกิดมะเร็งตับในคนไทยมากน้อยเพียงใด การศึกษาในหัวข้อนี้ในประเทศไทยเคยมีการศึกษาที่ลงตีพิมพ์มาเพียง 2 ครั้ง การศึกษาจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ลงตีพิมพ์ในปี 2536 นั้นพบการกลายพันธุ์ชนิด R249S เพียง 1 จาก 15 ตัวอย่าง (6%)(17), การศึกษาที่เชียงใหม่ที่ลงตีพิมพ์ในปี 2548 พบว่าชิ้นเนื้อมะเร็งตับ 25 ตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์นี้ 6 ตัวอย่าง (24%) และพบการกลายพันธุ์ 9 ตัวอย่างจากเลือดของผู้ป่วยมะเร็งตับ 34 ตัวอย่าง (26.5%) (18) ซึ่งขนาดตัวอย่างชิ้อเนื้อตับ 25 ชิ้น ไม่เพียงพอต่อการประมาณการความชุกของการกลายพันธุ์ดังกล่าว (ดูรายละเอียดในหัวข้อการคำนวณขนาดตัวอย่าง)

การประมาณการณ์ของการเกิดมะเร็งตับ ที่เกี่ยวข้องกับการได้รับสารอะฟลาทอกซิน มีหลายวิธี (19) เช่น การตรวจโปรตีน aflatoxin albumin adduct ในเลือด การตรวจหาสารเมตาโบไลท์ของอะฟลาทอกซินในปัสสาวะ แต่วิธีที่ยืนยันได้ชัดเจนว่าสารอะฟลาทอกซินนั้นทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์มะเร็งตับจริงคือ ใช้วิธีการตรวจการกลายพันธุ์ของที่ตำแหน่งโคดอนที่ 249 ของเอกซอนที่ 7 ซึ่งจะเกิดการกลายพันธ์เพียงคู่เบสเดียวและทำให้กรดอะมิโนที่สร้างได้เปลี่ยนแปลงจากอาร์จีนีนกลายเป็นซีรีน (single base pair substitution causing missense mutation) หรือที่เรียกย่อว่า R249S ซึ่งในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าการได้รับสารอะฟลาทอกซินทำให้เกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวและเป็นปัจจัยส่งเสริมต่อการเกิดมะเร็งตับ (4)

ผลของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการกลายพันธุ์ R249S นั้นยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน แต่ผู้เชี่ยวชาญหลายท่านเชื่อว่าไวรัสตับอักเสบบีอาจทำให้การกลายพันธุ์ R249S เกิดได้ง่ายขึ้น แต่ข้อมูลยังไม่เพียงพอ มีการศึกษาที่รวบรวมข้อมูลการศึกษาที่ตรวจการกลายพันธุ์ R249S 48 การศึกษา (meta-analysis) พบว่ายังไม่มีข้อมูลมากเพียงพอที่จะสรุปเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการกลายพันธุ์ R249S (16) ซึ่งจุดด้อยที่การศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวทำได้ยากเพราะ ผู้ป่วยมะเร็งตับที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในการศึกษาเหล่านั้นมีน้อยมาก ไม่มีการระบุผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแฝง (occult HBV infection) ไม่มีรายละเอียดข้อมูลความเสี่ยงอื่นของมะเร็งตับมากเพียงพอ

ตารางที่ 1 อุบัติการณ์ของมะเร็งตับ, อัตราการติดเชื้อตับอักเสบบีเรื้อรัง, ปริมาณการได้รับสารอะฟลาทอกซิน และอัตราการกลายพันธุ์ชนิด R249S ในประเทศกำลังพัฒนาและประเทศพัฒนาแล้ว

Country		Incidence of HCC	HBsAg %	AFB intake	R249S %
Developing countries	China, Qidong	Very High	80 %	11.7-2027	45 - 61
	China, Guangxi	High	74%	11.7-2027	36
	Mozambique	High	88 %	39-180	50
Developed countries	USA	Moderate	14 %	2.7	0
	Japan	High	24 %	< 2	0.02



ภาพที่ 1 รูปกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาทอกซินที่ได้รับ กับ ความชุกของการกลายพันธุ์ R249S

การสกัดสารพันธุกรรมจากชิ้นเนื้อที่ฝังในพาราฟิน (paraffin embedded tissue) มาตรวจนั้นจำเป็นต้องละลายพาราฟินออกก่อนจากนั้นจึงทำการสกัดสารพันธุกรรมตามปรกติ ซึ่งการสกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ นั้นมีประสิทธิภาพในการสกัดที่ต่างกัน ดังตารางที่ 2 ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากการที่สายดีเอนเอจะแตกหักเป็นท่อนสั้น ๆ และเสียสภาพธรรมชาติไปจากสารพาราฟิน, สารที่ปนเปื้อน, ความเป็นกรดด่าง และ ขั้นตอนการสกัด[16] ในงานวิจัยนี้เราใช้การสกัดด้วยไซลีนและเอธานอล ย่อยเอาพาราฟินออกและ ใช้ฟีนอลและคลอโรฟอร์มในการสกัดแยกเอาสารพันธุกรรมออกมาในสารละลาย ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพสูงมากในการสกัด กล่าวคือ จากชิ้นเนื้อที่ฝังในพาราฟิน 124 ตัวอย่าง สามารถสกัดสารพันธุกรรมออกมาได้ปริมาณเพียงพอที่จะทำ PCR และสามารถเอามาตรวจโดยวิธี RFLP ได้ถึง 100 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80)

ตารางที่ 2 ประสิทธิผลในการสกัดดีเอนเอจากชิ้นเนื้อที่เก็บในพาราฟินโดยการสกัดและการละลายพาราฟินด้วยวิธีต่าง ๆ (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 16)

ประสิทธิผลในการสกัดดีเอนเอ		วิธีสกัดและทำให้บริสุทธิ์ (purification)		
		ฟีนอลและคลอโรฟอร์ม	อุ่นด้วยการต้ม	คีเลกซ์ 100
วิธีเอาพาราฟินออก (deparaffinisation)	ไซลีนและเอธานอล	15 % (3 จาก 20)	0 % (0 จาก 6)	0 % (0 จาก 8)
	อุ่นด้วยไมโครเวฟ	23 % (5 จาก 22)	19 % (5 จาก 26)	54 % (20 จาก 37)
	ใช้ความร้อนเป็นวงจร	12 % (2 จาก 17)	51 % (19 จาก 37)	61 % (100 จาก 163)

ส่วนการสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป ยี่ห้อ Qiagen (ประเทศเยอรมันนี) ได้ผลร้อยละ 60 (12 จาก 20)

วิธีการตรวจการกลายพันธุ์ R249S ที่เคยมีการตีพิมพ์ได้แก่ การทำการตรวจคู่เบสโดยตรง (direct sequencing) การตรวจโดยการตัดสารพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งการกลายพันธุ์ (Restriction fragment length polymorphism หรือย่อว่า RFLP) การตรวจด้วยสเปคโตรมีเตอร์ (short oligonucleotide mass analysis หรือที่ย่อว่า SOMA) โดยการศึกษาที่ใช้วิธีตรวจที่มีความไวสูง สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ R249S ในเลือดก่อนจะเกิดมะเร็งตับได้ (20-22)

การตรวจหาการกลายพันธ์นั้นในอดีตใช้การ sequencing โดยตรง และต่อมามีการตรวจโดยการใช้เทคนิคต่าง ๆ เข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของดีเอนเอเช่น RFLP, single stranded conformation polymorphism (SSCP) และ denaturing gradient gel electrophoresis ก็เป็นวิธีที่ใช้แพร่หลาย ในเวลาต่อมา ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจใหม่ ๆ หลายวิธี เช่น SOMA, pyrosequencing, COLD-PCR enhanced high resolution melting, Real time PCR, ฯลฯ ซึ่งหลายวิธีก็มีความไวมากกว่า สะดวกกว่า ค่าใช้จ่ายต่ำกว่า โดยมีความไว และ ความจำเพาะแตกต่างกันไป และหลายวิธีก็มีความแม่นยำมากเพราะเน้นการตรวจที่จำเพาะต่ออัลลีลที่สนใจได้แก่ multiplex allele-specific assay, allele primer extension assay, multiplex detection by rolling circle-enabled universal microarrays, realtime PCR with taqman probe และ COLD-PCR enhanced high resolution melting method ก็ซึ่งนอกจากวิธีการตรวจแล้ว ความแม่นยำยังขึ้นกับเทคนิคของผู้ตรวจ รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ และการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างออกมาตรวจอีกด้วย (23-24)

มีการศึกษาเปรียบเทียบโดยตรงในตัวอย่างที่ทราบแน่ชัดแล้วว่ามีการกลายพันธุ์ R249S อยู่แล้วพบว่าการตรวจด้วยวิธี SOMA มีความไวในการตรวจพบการกลายพันธุ์มากกว่า RFLP กล่าวคือเมื่อเจือจางสารพันธุกรรมลง SOMA สามารถพบการกลายพันธุ์ได้แม้ว่าจะมีการกลายพันธุ์เพียง 2.4 % (mutation:wild type allele) ขณะที่ RFLP นั้นจะสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์เมื่อความอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าร้อยละ 6 (25)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการ

คำถามของการวิจัย

ความชุกของการกลายพันธุ์ชนิด R249S ในเนื้อมะเร็งตับของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับในประเทศไทยเป็นเท่าไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อหาความชุกของการกลายพันธุ์ชนิด R249S ในเนื้อมะเร็งตับของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับในประเทศไทย

วัตถุประสงค์รอง

เพื่อหาความชุกของการกลายพันธุ์ชนิด R249S ในเนื้อมะเร็งตับของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับในประเทศไทยในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง และ กลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งตับที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

สมมติฐาน (hypothesis)

ไม่มีการตั้ง Ho และ H1 เนื่องจากเป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (descriptive)

ข้อตกลงเบื้องต้น

การวินิจฉัยโรคมะเร็งตับปฐมภูมิ (hepatocellular carcinoma) ใช้การวินิจฉัยยืนยันทางพยาธิวิทยา ตามเกณฑ์ขององการอนามัยโลก (World Heath Organization)

การพบการกลายพันธุ์ชนิด R249S ในเนื้อมะเร็งตับ จะอนุมานว่าเกิดจากการได้รับสารอะฟลาทอกซินและถือว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งตับ ซึ่งมีงานวิจัยสนับสนุนดังที่กล่าวในหัวข้อที่ 3

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง และ การไม่ได้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี นั้นตกลงว่าให้ถือตามผลตรวจแอนติเจนต่อผิวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B surface antigen หรือ HBsAg) โดยผู้เขียนยอมรับในผลลบลวงทั้งกรณีของผู้ป่วยที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในอดีตแต่แอนติเจนกลายเป็นลบในภายหลัง (HBsAg seroconversion ซึ่งผู้ป่วยที่แอนติเจนกลายเป็นลบเมื่ออายุมากแล้วก็ยังเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับมากกว่าผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี) และกรณีการติดเชื้อแฝง (occult infection) ซึ่งการยืนยันปรากฏการณ์นี้อาจใช้การย้อมพิเศษเพื่อหาหลักฐานการติดเชื้อในเนื้อตับหรือวัดปริมาณไวรัสตับอักเสบบีในเลือด ซึ่งผู้เขียนนิยามการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในการศึกษานี้โดยใช้ผล HBsAg ที่เป็นบวกเท่านั้น

คำสำคัญ

P53 mutation, R249S, Hepatocellular carcinoma, Hepatoma, HBsAg, Tumor suppressor gene

Opearational definition

Hepatocellular carcinoma หมายถึงมะเร็งตับปฐมภูมิ ใช้คำนิยามตามข้อตกลงของ EASL (15)

ผู้ที่เป็นโรคไวรัสตับอักเสบบี นิยามว่าคือผู้ที่มี HBsAg ในเลือดเป็นบวก หลังจากตรวจพบมะเร็งตับ

รูปแบบการวิจัย (Research design)

การวิจัยนี้เป็น 1. การศึกษาเชิงพรรณนาย้อนหลัง (retrospective descriptive study) ในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดหรือเจาะตับที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และศึกษาจากชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยมะเร็งตับที่ได้รับการผ่าตัดตับหรือเจาะตับที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในช่วงระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2551 ไปจนถึงวันที่ 30 เมษายน 2554

1. ประชากรเป้าหมาย (Population) และตัวอย่าง

ประชากรเป้าหมาย (Population) คือผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ (hepatocellular carcinoma)

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) คือผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ ที่ได้รับการผ่าตัดหรือเจาะตับที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1.ผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 18 ปี

2.มีผลการตรวจทางพยาธิวิทยา วินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งตับชนิดปฐมภูมิ (hepatocellular carcinoma)

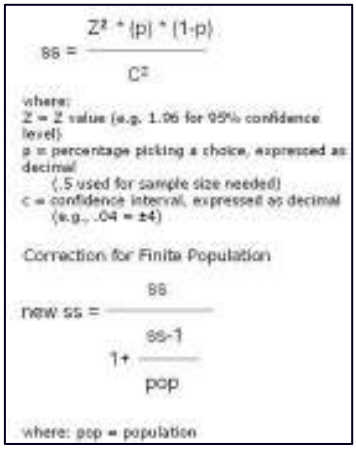
เกณฑ์การตัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

ผู้ป่วยที่ไม่มีชิ้นเนื้อตับเก็บไว้ (paraffin-embedded tissue) ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา

ไม่มีผลการตรวจเลือด HBsAg

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

เนื่องจากเป็นการทดลองที่ดูความชุก ซึ่งเคยมีผู้ศึกษาไว้แล้ว จึงต้องใช้สูตรคำนวณขนาดตัวอย่าง ในการหาความชุก ในกลุ่มประชากรกลุ่มเดียว



p=20 % (จากค่าประมาณการณ์ความชุกของการกลายพันธุ์จากการศึกษาในอดีตนำมาปัดลง)

C = 0.05 คือAccepted p varies คลาดเคลื่อนได้ 10 %

N=1.96*1.96*0.2*0.8/0.01

=62 คน (ปัดทศนิยมขึ้นให้เป็นจำนวนเต็ม)

การรวบรวมข้อมูล (data collection)

1. เก็บรวบรวมผู้ป่วยย้อนหลังโดยเก็บจากชิ้นเนื้อตับที่ภาควิชาพยาธิวิทยา ที่มีผลการตรวจยืนยันว่าเป็นมะเร็งตับ
2. รวบรวมข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยตามรายละเอียดในภาคผนวกเก็บลงในแบบเก็บข้อมูล (Case record form)
3. สกัดสารพันธุกรรมชิ้นเนื้อมะเร็งตับ ใช้ละลายพาราฟินออกและสกัดแยกดีเอนเอออกมาโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปยี่ห้อ 5 prime (บริษัท 5 prime GmbH, Hamburg, Germany)
4. จากนั้นนำดีเอนเอที่ได้ไปเพิ่มจำนวนโดยวิธีการพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้โพรบ (probe) ออกแบบมาที่มีความจำเพาะกับสายดีเอนเอของเอซอน 7 ของยีนพี 53 เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ R249S (3rd base pain substitute mutation of tumor suppressor protein at codon 249 of exon 7 of TP53 tumor suppressor gene) โดยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะและแยกตามความหลากหลายของความยาวสายพันธุกรรม (Restriction fragment length polymorphism; RFLP) โดยรายละเอียดวิธีการตรวจได้แสดงไว้ในหัวข้อวิธีการทางห้องปฏิบัติการ
5. วิเคราะห์ข้อมูลตามที่วางแผนไว้

วิธีการทางห้องปฏิบัติการ

1. ตัวอย่างมะเร็งตับ : ตัวอย่างมะเร็งตับ 135 ชิ้นที่มีการวินิจฉัยเบื้องต้นเป็นมะเร็งตับ HCC หลังจากทบทวนชิ้นเนื้อแล้วพบว่ามีผู้ป่วยที่มีการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาเป็น HCC จริง และมีผลการตรวจ

HBsAg (บวกหรือลบก็ได้) ทั้งสิ้น 124 ราย โดยทำการศึกษาเป็นแบบพรรณาย้อนหลังจึงไม่มีการเซ็นยินยอม และ ใช้ข้อมูลผู้ป่วยเป็นแบบ anonymous

2. นำชิ้นเนื้อที่เก็บไว้ในบล็อคพาราฟินมาตัดเป็นแผ่นบาง 10 หรือ 20 ไมครอน (ดังภาพที่ 2) โดยเลือกศึกษาส่วนที่เป็นเนื้อมะเร็งตับ โดยเนื้อตับข้างเคียงเพียงเล็กน้อย
3. การสกัดดีเอนเอ (DNA extraction) ; ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของบริษัท 5 prime GmbH, Hamburg, ประเทศเยอรมันนี ซึ่งเป็นการสกัดโดยใช้หลักการสกัดด้วยตัวทำละลายเอธานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (graded ethanol) และสารละลายที่สกัดได้จะถูกเจือจางให้มีปริมาณ 50 ไมโครลิตรและเก็บไว้ที่อัณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำการทำพีซีอาร์
4. การทำพีซีอาร์ (PCR) ; ทำพีซีอาร์แบบ nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอนเอบริเวณเอกซอน 7 ของโปรตีนพี 53 โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 2 คู่ โดยผสมสารละลาย ดังนี้
    a. DNA template 2 ul
    b. PerfectTaq และ MasterMix Kit (5 prime GmbH, Hamburg, Germany) 10 ul
    c. ไพรเมอร์คู่นอก ทั้ง outer forward primer (TP53-OS: 5'-CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA -3') และ outer reverse primer (TP53-OAS: 5'-AGG GGT CAG CGG CAA GCA GA-3') อย่างละ 1.25 mM
    d. น้ำกลั่น ผสมลงไปจนได้ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด 25 ul

    ต่อจากนั้นทำปฏิกริยา PCR โดยมีภาวะของ PCR ดังนี้เริ่มจาก 94°C เป็นเวลา 3 นาที, 40 cycle ที่ 94°C เป็นเวลา 18 วินาที, 50°C เป็นเวลา 21 วินาที, and 72°C เป็นเวลา 1.30 นาที และจบด้วยอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

    ต่อจากนั้นทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 โดยใช้ สารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพีซีอาร์ครั้งแรก 0.5 ul. ผสมกับสารดังข้อ a. b. และ d. โดยใช้ไพรเมอร์คู่ในได้แก่ inner forward primer (TP53-OS: 5'-AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT-3') และ inner reverse primer (TP53-OAS: 5'-TGT GCA GGG TGG CAA GTG GC-3') อย่างละ 1.25 mM
5. นำสารละลายที่ได้จากพีซีอาร์มาทำการแยกด้วยไฟฟ้า (electrophoresis) บนเจลอะกาโรสเข้มข้นร้อยละ 2 และนำมาดูด้วยแสง UV (เครื่อง UV transluminator) หลังจากย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งดีเอนเอของเอกซอน 7 ที่ได้จากการทำพีซีอาร์จะมีความยาว 237 bp และ 177 bp สำหรับผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ครั้งแรกและครั้งที่ 2 ตามลำดับ
6. ศึกษาการกลายพันธุ์ ที่โคดอน 249 ของเอกซอน 7 ของโปรตีนพี 53 โดย restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยวิธีการตามเอกสารอ้างอิงที่ Szymanska(21). กล่าวโดยย่อคือ ย่อยสายดีเอนเอ (restriction enzyme digestion) โดยเอนไซม์ restriction endonuclease คือ *Hae*III ซึ่งจะมีความจำเพาะต่อเบส 5' CCGG 3' ซึ่งพบได้ที่ ตำแหน่งที่ 3 ของโคดอน 249 โดยตำแหน่งที่เอนไซม์ *Hae*III จะย่อยคือมี 3 แห่งคือ ตำแหน่งที่ 12, 24 และ 116โดยมีส่วนประกอบของปฏิกริยาคือ
    a. ผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ครั้งที่ 2 ปริมาณ 15 ul
    b. 10X Buffer 4 (New England BioLabs inc, Ipswich, MA) 2ul

c. *Hea*III (New England BioLabs inc, Ipswich, MA) 1 ยูนิต

d. ผสมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 20 ul

จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C 1 คืน แล้วนำมาทำการแยกด้วยไฟฟ้า (electrophoresis) บนเจลอะกาโรสเข้มข้นร้อยละ 3 และนำมาดูด้วยแสง UV (เครื่อง UV transluminator) หลังจากย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งผลของการทดสอบจะอ่านออกมาว่ามีการกลายพันธุ์หรือไม่ดังตารางที่ 3 และภาพที่ 9

สายดีเอนเอที่ได้จาก nested PCR จะเรียงจาก 5' ไป 3' ดังนี้ (ความยาว 177 bp) (*Hea*III จะย่อยส่วนที่ แรเงา)

```
                                        1 aggcg cactggcctc atcttggccc
26  tgtgttatct cctaggttgg ctctgactgt accaccatcc actacaacta catgtgtaac
86  agttcctgca tgggcggcat gaaccggagg ccatcctca ccatcatcac actggaagac
146 tccaggtcag gagccacttg ccaccctgca ca
```

ก. ดีเอนเอของเอกซอน 7 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (wild type) จะแยกเป็น 3 bands และมีความยาว 12, 61 และ 92 bp

ข. ดีเอนเอของเอกซอน 7 ที่มีการกลายพันธุ์จะแยกเป็น 2 bands และมีความยาว 12 และ 153 bp เพราะตำแหน่ง 116 มีการเปลี่ยนแปลง (ggcc → gtcc ในกรณีของ R249S) เอนไซม์จึงไม่สามารถย่อยได้

7. ตัวอย่างที่มีผล RFLP เป็นบวกจะได้รับการส่งตรวจยืนยันโดยการ sequencing.

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์การกลายพันธุ์

ภาพที่ 3 ชิ้นเนื้อตับจะถูกขูดออกจากสไลด์แก้วโดยใบมีด เบอร์ 11 โดยใช้ ใบมีด 1 อัน ต่อสไลด์ 1 แผ่น (1 ตัวอย่าง) และ ชิ้นเนื้อตับที่ถูกขูดออกมาจะเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาดเล็ก ก่อนจะนำมาสกัดดีเอนเอ

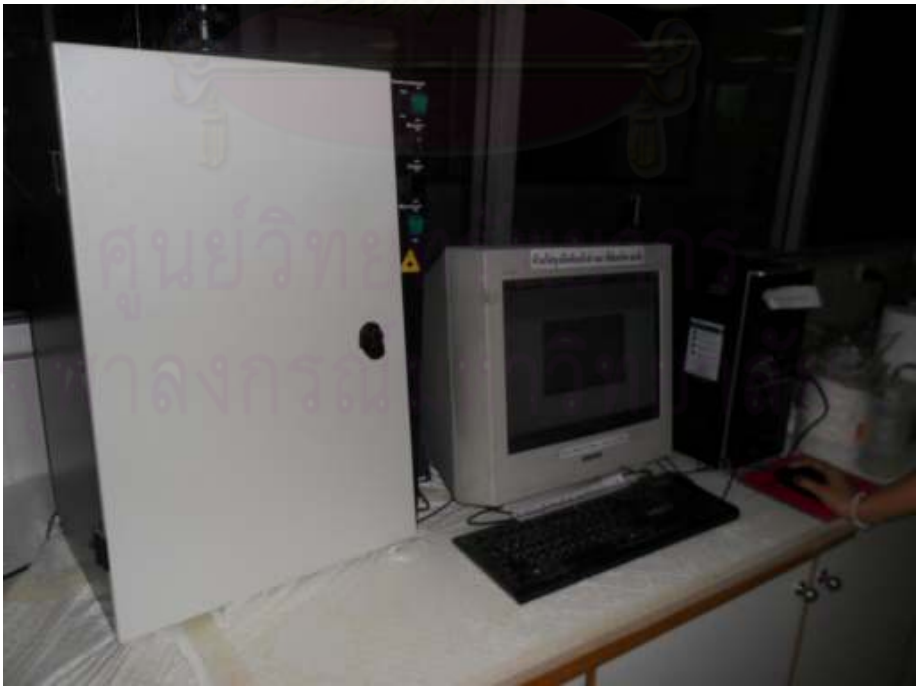
ภาพที่ 4 ตู้ดูดอากาศที่ใช้ในการขูดชิ้นเนื้อและสกัดสารพันธุกรรม

ภาพที่ 5 เครื่องพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งภายในจะถาดหลุมขนาดเล็ก สำหรับใส่สารละลายเพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมส่วนที่จำเพาะกับสารไพรเมอร์ (primer) ซึ่งในการทดลองนี้ออกแบบให้เพิ่มปริมาณของเอกซอนที่ 7 ของโปรตีน พี 53

ภาพที่ 6 เครื่องอีเลคโตรโฟเรซีส ใช้ในการทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าผลักให้สารพันธุกรรมแยกออกจากการโดยแยกกันตามขนาดของสายดีเอนเอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 7 ตัวอย่างจะถูกนำมาหยอดในช่องหลุมก่อนที่จะนำมาผ่านกระแสไฟฟ้า



ภาพที่ 8 เครื่องถ่ายภาพด้วยรังสียูวี (UV illuminator)

ตารางที่ 3 ลักษณะของการกลายพันธุ์ R249S และผลการตรวจด้วย RFLP

การกลายพันธุ์ของCodon 249	Bands	Bands length(bp)	ตัวอย่างแถบด้านล่าง
Mutant	1	12, 153	
ผสม Mutant และ Wildtype	3	12, 61, 92, 153	ข
Wildtype	2	12, 61, 92	ก

ก. ไม่มีการกลายพันธุ์ที่โคดอน 249 :

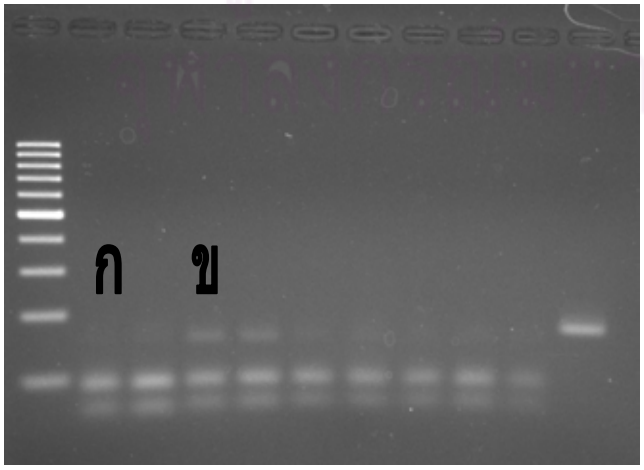
```
                                          1 aggcg cactggcctc atcttggccc
26  tgtgttatct cctaggttgg ctctgactgt accaccatcc actacaacta catgtgtaac
86  agttcctgca tgggcggcat gaaccggagg ccatcctca ccatcatcac actggaagac
146 tccaggtcag gagccacttg ccaccctgca ca
```

ดังนั้นจะตัดออกมาเป็น 3 เส้น แต่มองเห็นแค่ 2 เส้น (ไม่เห็นเส้น 12 bp)

ข. มีการกลายพันธุ์ที่โคดอน 249

```
                                        1 aggcg cactggcctc atcttggccc
26  tgtgttatct cctaggttgg ctctgactgt accaccatcc actacaacta catgtgtaac
86  agttcctgca tgggcggcat gaaccggagt cccatcctca ccatcatcac actggaagac
146 tccaggtcag gagccacttg ccaccctgca ca
```

ดีเอนเอของเอกซอน 7 ที่มีการกลายพันธุ์จะแยกเป็น 2 bands และมีความยาว 12 และ 153 bp เพราะตำแหน่ง 116 มีการเปลี่ยนแปลง (ggcc → gtcc ในกรณีของ R249S) เอนไซม์จึงไม่สามารถย่อยได้ดังนั้นจะตัดออกมาเป็น 2 เส้น แต่มองเห็นแค่ 1 เส้น (ไม่เห็นเส้น 12 bp)



ภาพที่ 9 ภาพถ่ายรังสียูวี แสดงผลการตรวจ RFLP เปรียบเทียบกับผลการตรวจของ ก. Wildtype จะเห็นเป็น 2 แถบ ข. Mutant ผสมกับ Wild type จะเห็นเป็น 3 แถบ ส่วนช่องขวาสุดที่มีแถบเดียวเป็น positive control เป็นสารตัวอย่างที่ได้จากการพีซีอาร์แต่ไม่ได้ส่งเอนไซม์ลงไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

การสังเกต, การวัด และ วิธีวิเคราะห์ข้อมูล (Observation, Measurement and Method of data analysis)

ความชุกของการกลายพันธุ์แสดงผลเป็นจำนวนและร้อยละ และ ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยส่วนที่เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพแสดงเป็นจำนวนและร้อยละ และข้อมูลเชิงปริมาณแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่ามัธยฐาน การเปรียบเทียบความชุกในผู้ป่วยที่มีและไม่มีแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบีนั้น เปรียบเทียบกันโดยใช้สถิติไคแสคว (chi-square) เพราะเป็นการเปรียบเทียบข้อมูลเชิงคุณภาพ โดยค่าความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากแบบเก็บข้อมูลจะถูกเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลจะถูกป้อนลงและวิเคราะห์ในโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. **ปัญหาทางจริยธรรม (ใบแสดงความยินยอม** (Consent form) **อยู่ในภาคผนวก)**

- respect of person (หลักความเคารพในบุคคล)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาย้อนหลัง โดยใช้ชิ้นเนื้อตับที่เหลือจากการตรวจทางพยาธิวิทยาตามปรกติ โดยเป็นการนำข้อมูลมาใช้แบบ anonymous คือไม่มีการเปิดเผยชื่อของผู้ป่วย

โครงการวิจัยยังแสดงการเคารพในความเป็นส่วนตัวและรักษาความลับ (privacy and confidentiality) โดยมีการปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัครโดยข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของอาสาสมัครจะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของอาสาสมัครจะได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัย

- beneficence (หลักการให้คุณประโยชน์)

ในส่วนของการศึกษาย้อนหลัง โครงการวิจัยนี้ไม่ได้มีประโยชน์โดยตรงต่อโรคของผู้ป่วย

ในส่วนของการศึกษาไปข้างหน้า (ซึ่งในงานวิจัยนี้ ในขณะนี้ยังไม่มีส่วนของการศึกษาไปข้างหน้า) การเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ไม่ได้มีประโยชน์โดยตรงต่อโรคของผู้ป่วย ซึ่งมีการระบุใน Information sheet ไว้ชัดเจนว่า “ท่านจะทราบว่าสารพันธุกรรมในเลือดหรือในตับของท่านมีการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการได้รับสารพิษอะฟลาอกซินหรือไม่ แต่การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้จะมีผลต่อสุขภาพหรือความรุนแรงของโรคของท่านน้อยมาก” และแจ้งอย่างชัดเจนถึงวิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร ไว้ว่า “ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากการตรวจนี้ ไม่มีผลต่อการรักษาโรคของท่าน และ(เท่าที่ผู้วิจัยทราบ) ยังไม่มีโรงพยาบาลใดให้บริการตรวจการกลายพันธุ์ชนิดนี้แก่ผู้ป่วยนอกเหนือจากการวิจัย” แต่อย่างน้อยที่สุดโครงการวิจัยนี้ก็ไม่ได้มีผลเสียต่อผู้เข้าร่วมนอกจากความเสี่ยงจากการเจาะเลือด ตามรายละเอียดที่ระบุไว้ใน information sheet แล้ว

- justice (หลักความยุติธรรม)

ในส่วนของการศึกษาย้อนหลัง นั้นไม่มีผลเสียเกิดแก่ผู้ป่วย

ในส่วนของการศึกษาไปข้างหน้าผู้ป่วยได้รับผลเสียคือการเจาะเลือด แต่อย่างไรก็ตามการเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างที่จะใช้ในงานวิจัยนั้นผู้วิจัยจะเก็บเลือดพร้อมกับการเจาะเลือดตรวจทางห้องปฏิบัติการตามปรกติของผู้ป่วย และใช้เลือดเพิ่มขึ้นกว่าปรกติเพียง 15 มิลลิลิตร ซึ่งน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณเลือดในร่างกายและมีผลเสียกับร่างกายน้อยมาก ข้อเสียจากการเจาะเลือดได้แก่ อาจเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก และผู้ป่วยต้องเจาะเลือดอยู่แล้วจึงจัดว่ามีผลเสียเพิ่มขึ้นน้อยมาก

ซึ่งหากเกิดอันตรายหรือผลข้างเคียงใด ๆ จากการเจาะเลือด ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

การใช้สิ่งส่งตรวจที่เหลือจากการตรวจตามปรกติ (เช่นชิ้นเนื้อตับ) เป็นของเหลือใช้จากการตรวจตามปรกติ ซึ่งโดยหลักจริยธรรมทั่วไปแล้วสามารถนำมาใช้ในงานวิจัยได้โดยจะขออนุญาติจากกรรมการจริยธรรมของโรงพยาบาลและคณะแพทยศาสตร์

3. **ข้อจำกัดของการวิจัย**

1. การศึกษานี้ไม่ได้วัดหลักฐานอื่นของการได้รับสารอะฟลาทอกซิน เช่นปริมาณโปรตีน (aflatoxin-albumin adduct) หรือ ปริมาณสารเมตาโบไลท์ของอะฟลาทอกซินในปัสสาวะ เพราะหลักฐานดังกล่าวบอกการได้รับสารอะฟลาทอกซินในช่วงหลายเดือนก่อนการตรวจแต่ไม่สามารถบอกการได้รับการอะฟลาทอกซินในระยะยาว และปริมาณดังกล่าวก็ด้อยกว่าการตรวจกลายพันธุ์ชนิด R249S ซึ่งเป็นผลสุดท้ายของสารอะฟลาทอกซิน และผู้ที่ได้รับและมีสารอะฟลาทอกซินในกระแสเลือดอาจเกิดการกลายพันธุ์หรือไม่ก็ได้

2. การเปรียบเทียบความชุกของการกลายพันธุ์ชนิด R249S ในผู้ป่วยที่มี HBsAg และไม่มี HBsAg จะแปรผลได้ยากเพราะการเกิดมะเร็งตับเกิดจากหลายปัจจัยและปัจจัยดังกล่าวก็มีปฏิสัมพันธ์กัน กล่าวคือการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอาจทำให้การกลายพันธุ์ชนิด R249S เกิดง่ายขึ้น หรือ ผู้ป่วยที่มีไวรัสตับอักเสบบีมีโอกาสเกิดมะเร็งตับสูงอยู่แล้ว ขณะที่ผู้ที่ไม่มีไวรัสตับอักเสบบี และมีกลายพันธุ์ชนิด R249S ก็สรุปผลไม่ได้เพราะยังมีปัจจัยเสี่ยงที่ร่วมส่งเสริมการเกิดมะเร็งตับที่เราไม่สามารถเก็บข้อมูลได้ทั้งหมด (เช่น beta-catenin pathway เป็นต้น)

3. การพบกลายพันธุ์ดังกล่าวในทั้ง 2 กลุ่มก็บอกได้เพียง association แต่ไม่สามารถสรุป causative effect ของการเกิดโรคมะเร็งตับ

4. **ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ทำให้ทราบถึงความชุกของการกลายพันธุ์ชนิดนี้ให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งตับในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ประเทศไทย ซึ่งจะนำความรู้นี้ไปประยุกต์ ใช้ประมาณการณ์ถึงผลเสียของการได้รับสารอะฟลาทอกซิน ต่อการเกิดมะเร็งตับในประชากรไทย โดยทางผู้วิจัยเชื่อว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งตับในปี 2550-2553 น่าจะได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินน้อยลงกว่าในอดีต และน่าจะพบอัตราการกลายพันธุ์น้อยลง

5. **อุปสรรคที่ผู้วิจัยคาดคะเนว่าจะเกิดขึ้นในขณะดำเนินการวิจัย**

การนำ Paraffin embedded tissue มาตรวจ DNA อาจสกัดได้เป็นชิ้นเล็ก ๆ (fragment) ซึ่งอาจทำให้การทำ PCR ไม่สามารถ amplify สารพันธุกรรมที่เราต้องการตรวจได้ แต่อย่างไรก็ตามเชื่อว่าวิธีการตรวจของผู้วิจัยจะไวพอที่จะตรวจวัดได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ การบริหารการวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Admistration and time schedule)

กิจกรรม	พ.ศ. 2552							พ.ศ. 2553												พ.ศ. 2554			
	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
1. ศึกษาเตรียมงาน	*	*	*	*	*																		
2. ขอทุนวิจัยและส่งเรื่องให้กรรมการจริยธรรมพิจารณา						*	*	*															
2. รวบรวมข้อมูล							*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3. วิเคราะห์ตัวอย่าง								*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4. เขียนรายงาน																						*	*
5.รายงานผลการวิจัย																							*

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย นับรวมชิ้นเนื้อตับที่เก็บตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2549 เป็นต้นมาและการศึกษาไปข้างหน้าจนถึงวันที่ 30 เมษายน 2554

7. งบประมาณรายจ่ายของโครงการวิจัย (Budget) เมื่อคำนวณสำหรับการตรวจ 200 ราย

1.	หมวดค่าใช้จ่ายเริ่มต้นของการสั่งและออกแบบ probe Taqman	33,000	บาท
2.	หมวดค่าใช้จ่ายในการตรวจการกลายพันธุ์	100,000	บาท
3.	หมวดค่าใช้จ่ายวัสดุสิ้นเปลืองในการทดสอบการกลายพันธ์	65,000	บาท
4.	หมวดค่าใช้จ่ายค่าตอบแทนอาสาสมัคร	0	บาท
5.	หมวดค่าใช้จ่ายค่าตอบแทนเจ้าหน้าที่ผู้ช่วยวิจัย	0	บาท
6.	หมวดค่าใช้จ่ายค่าเอกสาร	1,000	บาท
	รวมงบประมาณทั้งหมด	199,000	บาท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาชิ้นเนื้อตับที่มีการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาเป็นมะเร็งตับปฐมภูมิชนิด hepatocellular carcinoma ที่มีชิ้นเนื้อตับส่งตรวจที่ภาควิชาพยาธิวิทยาของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ช่วงระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2550 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2553 โดยมีชิ้นเนื้อตับที่นำมาเข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 135 ราย

ตัวอย่างทั้ง 135 ตัวอย่างเป็นการศึกษาแบบพรรณาย้อนหลังทั้งหมด

มีชิ้นเนื้อ 5 รายที่ทบทวนผลการตรวจทางพยาธิวิทยาแล้วไม่ใช่มะเร็งตับปฐมภูมิ และ 1 รายที่ไม่มีผลการตรวจแอนติเจนต่อไวรัสตับอักเสบบี และ 5 รายที่มีชิ้นเนื้อมะเร็งตับของผู้ป่วยรายเดียวกันมากกว่า 1 ชิ้น ทำให้มีผู้ป่วยเข้าร่วมในการศึกษาทั้งสิ้น 124 ราย มี 24 รายที่สกัดสารดีเอนเอออกมาไม่ได้หรือไม่ปรากฏแถบสารพันธุกรรมเมื่อทำการตรวจโดยการแยกด้วยไฟฟ้า จึงมีชิ้นเนื้อตับที่สามารถนำมาสกัดสารดีเอนเอออกมาได้และนำเข้าร่วมการศึกษาทั้งสิ้น 100 ชิ้น ซึ่งจำแนกเป็นมะเร็งตับของคนที่มีแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบีในเลือดเป็นบวก 55 ราย โดยมีภาวะติดเชื้อไวรัสบี 51 ราย ไวรัสบีร่วมกับไวรัสซี 2 ราย ไวรัสตับอักเสบซี 9 ราย และตรวจไม่พบไวรัสทั้ง 2 ชนิด 38 ราย จำแนกเป็นเนื้อตับที่ได้จากการเจาะตับ 30 ราย และ ชิ้นเนื้อจากการผ่าตัด 70 ราย

ลักษณะของผู้ป่วยมะเร็งตับที่นำมาศึกษามีอายุโดยเฉลี่ย 58.4 ปี เป็นเพศชายร้อยละ 84 มีแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบีในเลือดร้อยละ 53 มีแอนติบอดี้ของไวรัสตับอักเสบซีในเลือดร้อยละ 11

โดยมีผู้ป่วยร้อยละ 2 มีการติดเชื้อทั้งไวรัสตับอักเสบบี และ ไวรัสตับอักเสบซี ร้อยละ 51 ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ร้อยละ 9 ไวรัสตับอักเสบซี และ ที่เหลือร้อยละ 38 ไม่พบทั้งไวรัสตับอักเสบบี และ ไวรัสตับอักเสบซี

ตารางที่ 4 ลักษณะของผู้ป่วยที่นำเข้ามาศึกษา

Character	ร้อยละ (จำนวนผู้ป่วย 100 ราย)
Male (%)	84 %
Mean age (SD)	58.4 (12.9)
HBsAg positive (%)	53 %
Anti-HCV positive (%)	11 %
Liver biopsy specimen (%)	30 %
Tumor differentiation	
-well / moderately / poorly	23 / 54 / 23 %
Tumor pattern –mixed (%)	23 %
-trabecular (%)	51 %
Mean AFP (SD)	7052 (29755)
Median AFP (IU/ml)	31.6
R249S mutation (%)	9 %

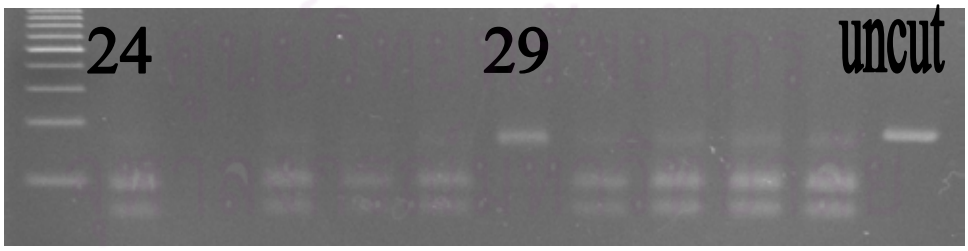
.

ลักษณะทางพยาธิวิทยาของมะเร็งตับเป็นชนิด trabecular pattern มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 51 ในขณะที่เป็นแบบผสมร้อยละ 23 โดยเนื้อมะเร็งมีลักษณะ differentiation อย่างดี (well-differentiated) ร้อยละ 23 อย่างปานกลาง ร้อยละ 54 และ อย่างแย่ (poorly-differentiated) ร้อยละ 23 ชิ้นเนื้อร้อยละ 70 ได้จากการผ่าตัดตัดเนื้อมะเร็งตับ (hepatic resection) ที่เหลือร้อยละ 30 ได้จากการเจาะชิ้นเนื้อตับมาตรวจ รายละเอียดของผู้ป่วยแสดงไว้ในตารางที่ 3

จากการตรวจหาการกลายพันธุ์ R249S ด้วยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ (RFLP) พบการกลายพันธ์ R249S ได้จำนวน 9 ตัวอย่าง ดังเช่นตัวอย่างในรูปที่ 10 โดยตัวอย่างที่ตรวจพบการกลายพันธ์ได้ทำการส่งยืนยันผลโดยการส่งตรวจยืนยันคู่เบสว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงกรดนิวคลีอิคจาก AGG เป็น AGT จริงโดยวิธี direct sequencing

จาก 9 ตัวอย่างที่พบการกลายพันธุ์ R249S 6 จาก 9 รายมี HBsAg เป็นบวกและ ทั้ง 9 รายล้วนแต่มี AntiHBc เป็นบวกซึ่งบ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในอดีต ผลการตรวจการกลายพันธุ์โดยวิธี RFLP และผลการตรวจ HBsAg และ Antibody ต่อ core antigen ของไวรัสตับอักเสบบีได้แสดงไว้ในตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ โดยรายละเอียดของผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ R249S ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6

ผลการตรวจหาการกลายพันธ์ที่ได้จากเนื้อตับของผู้ป่วยที่ไม่เป็นมะเร็งตับ นั้นได้จากเนื้อตับของผู้ที่มารับการเจาะชิ้นเนื้อตับมาตรวจ ซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มีอาการอักเสบของตับ ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซี และ ผู้ป่วยไขมันเกาะตับ โดยไม่มีมะเร็งตับ จาก 10 ตัวอย่าง โดยสามารถตรวจพบเอกซอน 7 ของโปรตีน พี 53 ทั้งหมด และผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ R249S พบว่าทั้งหมดมีโคดอน 249 เป็น wild type



รูปที่ 10 ภาพตัวอย่างผลการตรวจของตัวอย่างที่ 24 ถึง 33 และ ตัวควบคุมผลบวก (uncut) ตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่โคดอน 249 จะแยกเป็น 2 แถบ ดังเช่นตัวอย่างที่ 24 ในขณะที่ตัวอย่างที่ 29 พบแถบเพียงแถบเดียวและมีความยาวของสายใกล้เคียงกับผลควบคุมบวก จึงอ่านผลว่าตัวอย่างที่ 29 มีการกลายพันธุ์ R249S และทำการยืนยันโดยตัดเจลดังกล่าวไปส่งตรวจการเรียงตัวของคู่เบส (sequencing)

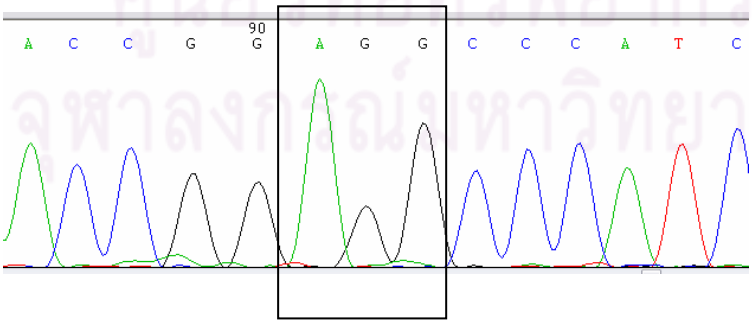
ตารางที่ 5 ผลการตรวจแอนติเจน HBsAg (HBV surface antigen) เทียบกับ การกลายพันธุ์ R249S

R249S	HBsAg positive	HBsAg negative	Total
Positive	6 (11%)*	3 (6.4%)*	9
Negative	47 (89 %)	44 (93.6%)	81
Total	53	47	100

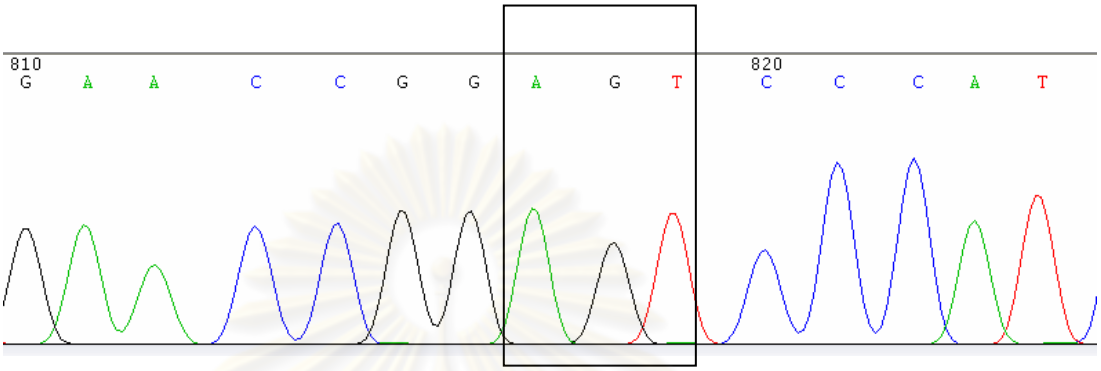
Chi-square test ได้ผลว่า P= 0.31

จะเห็นว่าอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ R249S ในกลุ่มที่ HBsAg เป็นบวก จะเท่ากับร้อยละ 11 (6 จาก 53 ตัวอย่าง) และอัตราการตรวจพบการกลายพันธุ์ R249S ในกลุ่มที่ HBsAg เป็นลบ จะเท่ากับร้อยละ 6.4 (3 จาก 47 ตัวอย่าง) ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทั้ง 3 ตัวอย่างได้จากกลุ่มที่ผลตรวจเลือดไม่พบทั้งไวรัสตับอักเสบบีและซี (ผล HBsAg และ anti HCV เป็นลบ)

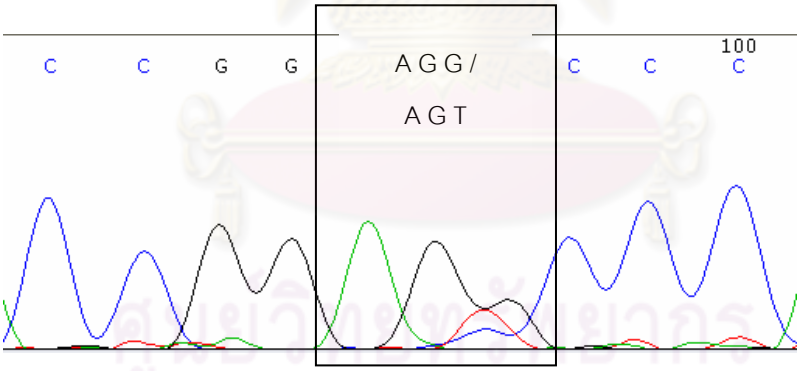
ตัวอย่างดีเอนเอที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ R249S นอกจากจะนำไปตรวจยืนยันการกลายพันธุ์โดย sequencing โดยทางผู้วิจัยได้นำดีเอนเอที่ผลตรวจ RFLP เป็นบวกไปใส่ในแบคทีเรีย E.coli โดยใช้ plasmid และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโดยวิธีจำเพาะเพื่อเลือกกลุ่มแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดที่มียีน R249S มาตรวจ พบว่าผลการตรวจก็ยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ R249S อยู่จริง ดังรูปที่ 11 ถึง 13



รูปที่ 11 ผลการตรวจการเรียงตัวของคู่เบส (sequencing) จากตัวอย่างจากโคโลนีของแบคทีเรียที่ใส่ตัวอย่างที่ 2 ลงไปและทำ RFLP ได้ว่าไม่มีการกลายพันธุ์ พบว่าได้ผลเป็น wild type คือโคดอน 249 เป็น Adenine-Guanine-Guanine (AGG)



รูปที่ 12: ผลการตรวจการเรียงตัวของคู่เบส (sequencing) จากตัวอย่างจากโคโลนีของแบคทีเรียที่ใส่ตัวอย่างที่ 2 ลงไปและทำ RFLP ได้ว่ามีการกลายพันธุ์ พบว่าได้ผลเป็น mutant คือมีโคดอน 249 เป็น Adenine-Guanine-Thymine (AGT) คือมีการกลายพันธุ์ R249S จริง ซึ่งกราฟที่ได้แสดงให้เห็นว่าโคดอน 249 ทั้งหมดกลายพันธุ์เพราะแบคทีเรีย 1 โคโลนีจะรับพลาสมิดได้เพียง 1 ชนิด



รูปที่ 13: ผลการตรวจการเรียงตัวของคู่เบส (sequencing) จากตัวอย่างที่ 2 จากสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากมะเร็งตับ และทำ RFLP ได้ว่ามีการกลายพันธุ์ พบว่าได้ผลเป็น mutant ผสมกับ wild type คือมีโคดอน 249 เป็น Adenine-Guanine-Thymine (AGT) ร่วมกับโคดอน 249 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์คือกราฟของคู่เบสที่ 3 ของโคดอนมีกราฟของคู่เบสไทมีนและกวานีนขึ้นทั้งคู่ ซึ่งบ่งบอกถึงการกลายพันธุ์ R249S ในบางเซลล์

ตารางที่ 6 รายละเอียดของผู้ป่วยที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ R249S

หมายเลขตัวอย่าง	เพศ	อายุ	HBsAg	AntiHCV	ผลเลือดที่เกี่ยวข้อง	HBV DNA (IU/ml)
HBsAg บวก						
2	ชาย	73	บวก	ลบ		4755
11	ชาย	60	บวก	ลบ	HBeAg ลบ	11256
29	ชาย	35	บวก	ลบ		
85	ชาย	58	บวก	ลบ		4455045
94	หญิง	51	บวก	ลบ	HBeAg ลบ	17823
T36	ชาย	42	บวก	ลบ		2955
HBsAg ลบ						
45	ชาย	56	ลบ	ลบ	Anti HBc บวก Anti HBs บวก	ไม่ได้ส่งตรวจ
73	ชาย	51	ลบ	ลบ	Anti HBc บวก Anti HBs บวก	ไม่ได้ส่งตรวจ
93	ชาย	66	ลบ	ลบ	Anti HBc บวก Anti HBs บวก	ไม่ได้ส่งตรวจ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาที่ออกแบบเพื่อหาความชุกของการกลายพันธุ์ของโปรตีนพี 53 ที่โคดอน 249 ที่มีจำนวนผู้ป่วยมากที่สุดในประเทศไทย เนื่องจากจำนวนผู้ป่วยที่ต้องใช้ในการประมาณความชุก ในกรณีที่ความชุกที่ต้องการหามีประมาณร้อยละ 20 นั้นต้องใช้ขนาดตัวอย่างมากกว่า 62 ราย (จากสูตรคำนวณขนาดตัวอย่างในบทที่ 3) ซึ่งการศึกษาในอดีตนั้นมีจำนวนผู้ป่วยไม่เพียงพอ

จากการศึกษานี้พบว่าความชุกของการกลายพันธุ์ R249S เท่ากับร้อยละ 9 ซึ่งถือว่าค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับการศึกษาในอดีตในประเทศไทยและข้อมูลจากทวีปแอฟริกาและบางส่วนของประเทศจีน แต่ก็สูงกว่าประเทศพัฒนา โดยการศึกษาในประเทศพัฒนาแล้วในยุโรปเช่นเยอรมันและอังกฤษ (26-27) และประเทศพัฒนาแล้วในเอเชียเช่นสิงคโปร์(28) และ ญี่ปุ่น(29) จะพบว่าไม่พบการกลายพันธุ์ R249S เลย

แม้ว่าอาจมีข้อจำกัดในการเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างการศึกษา เพราะการนำเอาความชุกของการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบของแต่ละการศึกษามาเปรียบเทียบกันนั้นอาจมีข้อด้อยคือศึกษาด้วยวิธีการตรวจที่ต่างกัน เทคนิคการสกัดสารพันธุกรรม และ เทคนิคการตรวจที่ต่างกัน และศึกษาในเวลาที่ต่างกัน แต่หากดูจากการศึกษาสหสถาบัน จาก 3 ประเทศที่ศึกษาในประเทศจีน ฝรั่งเศส และ อิตาลี (6) นั้น พบว่าประเทศฝรั่งเศส และอิตาลีนั้นพบการกลายพันธุ์ R249S ในเนื้อมะเร็งตับน้อยมากเทียบกับประเทศจีน (1 จาก 81 และ 0 จาก 90 ตัวอย่าง เทียบกับ 12 จาก 52 ตัวอย่าง ตามลำดับ) โดยการกลายพันธุ์ของโปรตีนพี 53 ในประเทศที่พัฒนาแล้วนั้นมักเกิดที่ตำแหน่งอื่น ซึ่งข้อมูลนี้สนับสนุนสมมุติฐานด้านบนว่า ผู้ป่วยมะเร็งตับส่วนหนึ่งของประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับการได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งปัจจัยเสี่ยงด้านอะฟลาทอกซินพบได้น้อยมากหรือไม่พบเลยในประเทศพัฒนาแล้ว

ข้อจำกัดอีกอย่างหนึ่งของการเปรียบเทียบค่าความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ในเนื้อมะเร็งตับของแต่ละการศึกษาคือวิธีการตรวจแต่ละวิธีมีความไวแตกต่างกัน โดยการตรวจโดยวิธี direct sequencing มีความไวต่ำกว่า RFLP และ ต่ำกว่า SOMA นอกจากนั้นประสิทธิผลของการสกัดสารพันธุกรรม การเพิ่มจำนวนดีเอนเอโดย PCR และขั้นตอนหลังจากได้ผลิตภัณฑ์ PCR ยังมีความแตกต่างกันทำให้อาจเทียบกันได้ยาก

แม้ว่าค่าความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ในเนื้อมะเร็งตับอาจไม่สามารถเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นได้โดยตรงตามข้อจำกัดเบื้องต้นแต่การที่พบความชุกของการกลายพันธุ์ต่ำเช่นนี้ โดยวิธีการตรวจที่มีความไวสูงพอสมควร และมีขนาดตัวอย่างมากเพียงพอก็น่าจะสามารถสรุปได้ว่าผู้ป่วยมะเร็งตับที่เข้าร่วมในการศึกษานี้มีสัดส่วนน้อยมากที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินมากจนเกิดการกลายพันธุ์ที่โปรตีนพี 53 ซึ่งพอจะอนุมานได้ว่าในปัจจุบัน ความเสี่ยงจากอะฟลาทอกซินในการส่งเสริมให้เกิดมะเร็งตับนั้นพบได้จริงแต่พบน้อย และพบได้มากในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังนั้นความจำเป็นต้องห้ามการรับประทานถั่วลิสง พริก ข้าวโพด และงา ในผู้ป่วยตับแข็งทุกคนดังที่แนะนำกันในอดีตอาจไม่มีความจำเป็นมากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

การที่การศึกษานี้พบความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ในเนื้อมะเร็งตับของประเทศไทยน้อยกว่าการศึกษาในอดีตนั้นอาจอธิบายได้จากการที่ปริมาณสารอะฟลาทอกซินในอาหารลดลงเมื่อเทียบกับอดีต ซึ่งการ

ศึกษ าในต่างประเทศก็พบแนวโน้มเช่นเดียวกัน และ ปริมาณสารอะฟลาทอกซินในอาหารที่ศึกษาในประเทศไทยก็ต่ำมาก และ สุขอนามัยในการเก็บถนอมอาหารก็ดีขึ้นซึ่งอาจทำให้ปริมาณราในถั่วลิสง ข้าวโพดลดลง นอกจากนี้ ความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ในกรุงเทพมหานครอาจต่ำอยู่แล้วดังที่ศึกษาไว้ในปี 2536 ซึ่งพบเพียงร้อยละ 6

แม้ว่าเทคโนโลยีทางวิทยาศาสตร์อาหารจะพัฒนาไปมากแล้วในหลายทศวรรษที่ผ่านมา แต่อาหารหลายชนิดยังคงมีสารพิษอะฟลาทอกซินอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (30) โดยการศึกษาที่รวบรวมข้อมูลจากการสำรวจในหลายประเทศพบว่ากว่าหนึ่งในสามของตัวอย่างที่นำมาตรวจมีสารพิษอะฟลาทอกซินอยู่เกินมาตรฐานสากล (31) และอาหารที่มักปนเปื้อนได้แก่ถั่วลิสง นม และสัตว์ปีก (3 ชนิดนี้คิดเป็นร้อยละ 59 ส่วนที่เหลือเป็นอาหารชนิดอื่น) (30) การศึกษาในประเทศไทยเมื่อปี 2524 พบว่าอาหารและเครื่องปรุงรสหลายชนิดของไทยมีเชื้อราตระกูลที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ เช่น ข้าวหมาก เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว (ที่หมักจากถั่วเหลือง) ผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง สาโท ไวน์ที่หมักเองในท้องถิ่น และ กระแช่ โดยอัตราการพบเชื้อราในผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงและเต้าเจี้ยว เท่ากับร้อยละ 10 และ 5 ตามลำดับ (32) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวและการตรวจพบการกลายพันธุ์ R249S ได้ร้อยละ 9 นี้ก็สนับสนุนว่าเชื้อราอะฟลาทอกซินยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศอยู่แม้ความรุนแรงจะต่ำกว่าประเทศด้อยพัฒนาก็ตาม

ความแตกต่างของความชุกของการศึกษานี้กับการศึกษาในอดีตของประเทศไทยนั้นอาจเกิดจาก 1. ศึกษาในเวลาที่ต่างกัน ซึ่งปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่ได้รับสะสมมาอาจแตกต่างกัน ตามสุขอนามัยของการเก็บถนอมอาหาร 2.) วิธีการตรวจของการศึกษาที่เชียงใหม่ใช้ SOMA ซึ่งแตกต่างจากวิธีการตรวจในการศึกษานี้ 3.) ภูมิลำเนาของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาเพราะทุกการศึกษาเป็นโรงพยาบาลระดับตติยภูมิที่รับดูแลผู้ป่วยส่งต่อจึงอาจมีผู้ป่วยจำนวนมากที่อาศัยอยู่ในต่างจังหวัดแต่ไม่ได้มีการเก็บข้อมูลในส่วนนี้ และ 4.) ผู้ป่วยจากภาคเหนืออาจได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินสูงกว่าภาคกลางเนื่องจากสถานะภาพทางเศรษฐกิจและสังคมที่ต่ำกว่า อาจเป็นเหตุอธิบายความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ที่สูงกว่าได้

การศึกษานี้ยังบ่งชี้ให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ R249S นี้ มักเกิดในผู้ที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดย 6 จาก 9 รายมี HBsAg เป็นบวกและ ผู้ป่วยทั้ง 9 รายล้วนแต่มี AntiHBc เป็นบวกซึ่งบ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในอดีต ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาในอดีต ที่พบว่าการกลายพันธุ์ R249S มักพบในผู้ป่วยที่มีไวรัสตับอักเสบบีมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่มีไวรัสตับอักเสบบี และเชื่อว่าไวรัสตับอักเสบบีอาจทำให้การกลายพันธุ์ที่โปรตีนพี 53 เกิดได้ง่ายขึ้น (33)

ความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ในกลุ่มที่ HBsAg เป็นบวก มากกว่า ในกลุ่มที่ HBsAg เป็นลบอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ คือร้อยละ 11 จะเท่ากับร้อยละ 6.4 ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจมีนัยสำคัญหากจำนวนตัวอย่างมากกว่านี้ หรือมะเร็งตับที่ HBsAg ที่เป็นลบนั้นเป็นการติดเชื่อตับอักเสบบีแฝง (occult HBV infection) หรือ เป็นการติดเชื่อในอดีตที่ผลต่อการกลายพันธุ์ R249S

แม้ว่าการกลายพันธุ์ R249S มักจะพบในประชากรที่มีมะเร็งตับและติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยเฉพาะในยุคแรก ๆ เพราะการศึกษาช่วงแรกทำในภูมิภาคที่มีความชุกของมะเร็งตับสูงมากและเป็นภูมิภาคที่มีอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบสูงมากด้วย แต่ในภายหลังที่มีข้อมูลมากขึ้นก็พบว่าความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ก็ไม่ได้

แตกต่างกันในผู้ป่วยที่ติดเชื้อและไม่ได้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (15) การศึกษาในบราซิลซึ่งเป็นประเทศกำลังพัฒนาที่ความชุกของไวรัสตับอักเสบบีไม่สูงมากนัก โดยผู้ป่วยมากกว่าครึ่งเป็นมะเร็งตับที่สัมพันธ์กับไวรัสตับอักเสบซีพบว่าความชุกของการกลายพันธุ์ R249S นั้นพบสูงถึงร้อยละ 28 โดยไวรัสตับอักเสบบีไม่ได้สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ R249S (34) นอกจากนี้งานวิจัยจากประเทศอียิปต์ก็สนับสนุนว่าการกลายพันธุ์ R249S นั้นไม่ได้สัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างมีนัยสำคัญ (35)

แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่จะต้องใช้เพื่อพิสูจน์ว่า HBsAg สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ R249S หรือไม่ต้องใช้ขนาดตัวอย่างมากกว่านี้ (เมื่อคำนวณโดยหลักทางสถิติ อาจต้องใช้ขนาดตัวอย่างสูงถึง 240 ราย) ความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญของความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ระหว่างกลุ่มที่ HBsAg บวกและลบในงานวิจัยนี้จึงไม่สามารถสรุปอะไรได้มากนัก

การนำผลการศึกษานี้ไปประยุกต์ใช้นั้นต้องพิจารณาว่า การป้องกันไม่ให้ประชาชนได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินนั้นทำได้หลายขั้นตอนและมีความยากง่ายและความคุ้มค่าที่แตกต่างกัน โดยการป้องกันที่เป็นไปได้ได้แก่

1. การป้องกันการเกิดราในผลิตภัณฑ์การเกษตร ซึ่งอยู่นอกขอบเขตงานของเพทย์
2. การป้องกันการเกิดการกลายพันธุ์ในคนที่ได้รับสารอะฟลาทอกซิน ซึ่งปัจจุบันยังไม่มียาใดที่ได้รับการรับรองให้นำมาใช้ในข้อบ่งชี้นี้ได้
3. การป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งจะลดการเกิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่วงการแพทย์ก็พยายามลดอัตราการติดเชื้อนี้อย่างเต็มที่แล้ว เช่นการให้วัคซีน และ การป้องกันการติดเชื้อจากแม่สู่ลูก
4. การป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับ รับประทานอาหารที่อาจปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซิน

จะเห็นได้ว่าสิ่งที่ใกล้ตัวแพทย์ที่สุดคือข้อ 4 ซึ่งมีข้อจำกัดหลายอย่าง เพราะการจำกัดอาหารดังกล่าวอาจทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตลดลง มีความกังวล และยังไม่มีข้อมูลที่พิสูจน์ว่าการหลีกเลี่ยงอาหารดังกล่าวจะลดโอกาสเป็นมะเร็งตับได้จริง

เมื่อพิจารณาร่วมกับอัตราการกลายพันธุ์ที่พบน้อยเพียงร้อยละ 9 การพบการกลายพันธุ์มากขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี และไม่พบการกลายพันธุ์เลยในผู้ป่วยที่มี AntiHBc เป็นลบนั้น ทำให้ผู้วิจัยเสนอแนะว่าอาจไม่มีความจำเป็นในการให้คำแนะนำในการหลีกเลี่ยงถั่ว พริก และข้าวโพด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

การศึกษานี้มิได้นำเนื้อตับที่อยู่ข้างเคียงมะเร็ง (adjacent tumor) หรือเซรั่มของผู้ป่วยมาศึกษาด้วย เนื่องจาก เป็นการศึกษานำร่องที่มีวัตถุประสงค์หลักจะหาความชุกของการกลายพันธุ์ R249S ในมะเร็งตับปฐมภูมิในประเทศไทยเท่านั้น

ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือ

1.) การตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ในตำแหน่งที่จะเพาะต่อการกลายพันธุ์ (RFLP) มีความไวในการตรวจต่ำกว่าวิธี SOMA และอาจได้ผลตรวจเป็นลบลวงได้หากการกลายพันธ์ในเนื้อมะเร็งมีน้อย โดยการศึกษาที่ใช้การตรวจ SOMA เทียบกับ RFLP โดยตรงนั้นพบว่าการใช้ SOMA จะเพิ่มความไวในการตรวจได้ประมาณร้อยละ 40 (25)

2.) ไม่มีการเก็บข้อมูลภูมิลำเนา ของผู้ป่วยที่นำมาเข้าร่วมการศึกษา แต่ข้อมูลทางทะเบียนบ้านเบื้องต้นพบว่าผู้ป่วยที่นำมาเข้าร่วมการศึกษา มิได้อยู่แต่ในกรุงเทพมหานครและเขตปริมณฑลเท่านั้น แต่ได้รับการส่งตัวมาจากทุกภูมิภาค และการศึกษานี้มีปริมาณตัวอย่างมากที่สุดที่เคยมีการศึกษาในประเทศไทย จึงอาจเป็นตัวแทนของผู้ป่วยมะเร็งตับของประเทศไทยทั้งหมดได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ตรวจหาผลของสารพิษอะฟลาทอกซินในมะเร็งตับโดยการตรวจการกลายพันธุ์ของโปรตีน พี 53 ที่โคดอน 249 ซึ่งเป็นหลักฐานที่ชัดเจนว่า มะเร็งตับร้อยละ 9 ของประเทศไทยมีความเกี่ยวข้องกับการได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยการศึกษานี้มีจำนวนผู้ป่วยมากที่สุดในประเทศไทยและเพียงพอต่อการประมาณการณ์ความชุกในทางสถิติ

ดังนั้นอาจอนุมานได้ว่ายังมีผู้ป่วยบางส่วนเกิดมะเร็งตับจากการได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินเป็นปัจจัยเสี่ยงร่วม ซึ่งการป้องกันการเกิดมะเร็งตับในส่วนที่เกี่ยวข้องกับอะฟลาทอกซินมีแนวทางป้องกันได้เป็นไปได้หลายทางได้แก่

1. ดูแลผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรให้มีความชื้นต่ำ เพาะปลูกโดยมีความชื้นและปริมาณน้ำที่เหมาะสม
2. การตั้งค่ามาตรฐานของสารพิษอะฟลาทอกซินขั้นสูงที่ยอมรับได้ในสินค้าเกษตรให้ต่ำลง
3. การให้ยาป้องกันการเกิดการกลายพันธุ์ในคนที่ได้รับสารอะฟลาทอกซิน ซึ่งปัจจุบันยังไม่มียาใดที่ได้รับการรับรองให้นำมาใช้ในข้อบ่งชี้นี้ได้
4. การป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งจะลดการเกิดการกลายพันธุ์ได้ แต่จะมีความคุ้มค่าเฉพาะในประเทศที่ความชุกของไวรัสตับอักเสบบีสูงมากเท่านั้น
5. คำแนะนำที่ให้ผู้ป่วยหลีกเลี่ยงอาหารที่มีส่วนประกอบของถั่ว ข้าวโพด และพริกที่อาจมีราปนเปื้อน

แต่การจำกัดอาหารดังกล่าวอาจทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตลดลง มีความกังวล และยังไม่มีข้อมูลที่พิสูจน์ว่าการหลีกเลี่ยงอาหารดังกล่าวจะลดโอกาสเป็นมะเร็งตับได้จริง เมื่อพิจารณาร่วมกับอัตราการกลายพันธุ์ที่พบน้อยเพียงร้อยละ 9 และไม่พบการกลายพันธุ์เลยในผู้ป่วยที่มี AntiHBc เป็นลบเลยนั้น ทำให้ผู้วิจัยเสนอแนะว่าอาจไม่มีความจำเป็นในการให้คำแนะนำในการหลีกเลี่ยงถั่ว พริก และข้าวโพด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

ทางผู้วิจัยเสนอให้มีการศึกษาเพิ่มเติมได้แก่

1. นำเอาตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ R249S ที่มีผล HBsAg เป็นลบ และ Anti-HBc เป็นบวกไปตรวจเพิ่มเติมเพื่อหาหลักฐานของ HBV เช่นการตรวจHBV DNA หรือ HBV cccDNA ในเนื้อมะเร็งตับ และเนื้อตับ
2. การศึกษาไปข้างหน้าในผู้ป่วยที่มีไวรัสตับอักเสบบี เพื่อหาการกลายพันธุ์ R249S ในเลือดหรือในชิ้นเนื้อตับจากการเจาะตับ และติดตามผู้ป่วยที่พบการกลายพันธุ์ R249S ไปว่าจะมีอัตราการเกิดมะเร็งตับมากขึ้นหรือไม่ โดยอาจศึกษาระยะยาว (เช่น 2-5 ปี)
3. การศึกษาวิธีตรวจการกลายพันธุ์ R249S ด้วยวิธีที่มีความไวสูงเช่น taqman realtime PCR เพื่อให้สามารถตรวจการกลายพันธุ์ R249S จากเลือดของผู้ป่วยได้

ต้นฉบับไม่มีหน้านี้
NO THIS PAGE IN ORIGINAL

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. Srivatanakul P. Epidemiology of Liver Cancer in Thailand. Asian Pac J Cancer Prev. 2001;2(2):117-21.

2. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Am J Clin Nutr. 2004 Nov;80(5):1106-22.

3. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology. 2007 Jun;132(7):2557-76.

4. Martin J, Dufour JF. Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2008 Mar 21;14(11):1720-33.

5. Besaratinia A, Kim SI, Hainaut P, Pfeifer GP. In vitro recapitulating of TP53 mutagenesis in hepatocellular carcinoma associated with dietary aflatoxin B1 exposure. Gastroenterology. 2009 Sep;137(3):1127-37, 37 e1-5.

6. Pineau P, Marchio A, Battiston C, Cordina E, Russo A, Terris B, et al. Chromosome instability in human hepatocellular carcinoma depends on p53 status and aflatoxin exposure. Mutat Res. 2008 May 31;653(1-2):6-13.

7. Lasky T, Magder L. Hepatocellular carcinoma p53 G > T transversions at codon 249: the fingerprint of aflatoxin exposure? Environ Health Perspect. 1997 Apr;105(4):392-7.

8. Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2008 Oct;48(4):1312-27.

9. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. Nature. 1991 Apr 4;350(6317):429-31.

10. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NJ, Harris CC. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. Nature. 1991 Apr 4;350(6317):427-8.

11. Forrester K, Lupold SE, Ott VL, Chay CH, Band V, Wang XW, et al. Effects of p53 mutants on wild-type p53-mediated transactivation are cell type dependent. Oncogene. 1995 Jun 1;10(11):2103-11.

12. Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, et al. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. Cancer Res. 1995 Dec 15;55(24):6012-6.

13. Dumenco L, Oguey D, Wu J, Messier N, Fausto N. Introduction of a murine p53 mutation corresponding to human codon 249 into a murine hepatocyte cell line results in growth advantage, but not in transformation. Hepatology. 1995 Oct;22(4 Pt 1):1279-88.

14. Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT, et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. Lancet. 1992 Apr 18;339(8799):943-6.

15. Stern MC, Umbach DM, Yu MC, London SJ, Zhang ZQ, Taylor JA. Hepatitis B, aflatoxin B(1), and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guangxi, People's Republic of China, and a meta-analysis of existing studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 Jun;10(6):617-25.

16. Wild CP, Montesano R. A model of interaction: aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. Cancer Lett. 2009 Dec 1;286(1):22-8.

17. Hollstein MC, Wild CP, Bleicher F, Chutimataewin S, Harris CC, Srivatanakul P, et al. p53 mutations and aflatoxin B1 exposure in hepatocellular carcinoma patients from Thailand. Int J Cancer. 1993 Jan 2;53(1):51-5.

18. Kuang SY, Lekawanvijit S, Maneekarn N, Thongsawat S, Brodovicz K, Nelson K, et al. Hepatitis B 1762T/1764A mutations, hepatitis C infection, and codon 249 p53 mutations in hepatocellular carcinomas from Thailand. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Feb;14(2):380-4.

19. Hall AJ, Wild CP. Aflatoxin biomarkers. Lancet. 1992 Jun 6;339(8806):1413-4.

20. Szymanska K, Chen JG, Cui Y, Gong YY, Turner PC, Villar S, et al. TP53 R249S mutations, exposure to aflatoxin, and occurrence of hepatocellular carcinoma in a cohort of chronic hepatitis B virus carriers from Qidong, China. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009 May;18(5):1638-43.

21. Szymanska K, Lesi OA, Kirk GD, Sam O, Taniere P, Scoazec JY, et al. Ser-249TP53 mutation in tumour and plasma DNA of hepatocellular carcinoma patients from a high incidence area in the Gambia, West Africa. Int J Cancer. 2004 Jun 20;110(3):374-9.

22. Jackson PE, Kuang SY, Wang JB, Strickland PT, Munoz A, Kensler TW, et al. Prospective detection of codon 249 mutations in plasma of hepatocellular carcinoma patients. Carcinogenesis. 2003 Oct;24(10):1657-63.

23. Zhang Y, Shen J, Ming W, Lee YP, Santella RM. Telomere length in hepatocellular carcinoma and paired adjacent non-tumor tissues by quantitative PCR. Cancer Invest. 2007 Dec;25(8):668-77.

24. Kirby GM, Batist G, Fotouhi-Ardakani N, Nakazawa H, Yamasaki H, Kew M, et al. Allele-specific PCR analysis of p53 codon 249 AGT transversion in liver tissues from patients with viral hepatitis. Int J Cancer. 1996 Sep 27;68(1):21-5.

25. Qian GS, Kuang SY, He X, Groopman JD, Jackson PE. Sensitivity of electrospray ionization mass spectrometry detection of codon 249 mutations in the p53 gene compared with RFLP. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002 Oct;11(10 Pt 1):1126-9.

26. Hoque A, Patt YZ, Yoffe B, Groopman JD, Greenblatt MS, Zhang YJ, et al. Does aflatoxin B1 play a role in the etiology of hepatocellular carcinoma in the United States? Nutr Cancer. 1999;35(1):27-33.

27. Kazachkov Y, Khaoustov V, Yoffe B, Solomon H, Klintmalm GB, Tabor E. p53 abnormalities in hepatocellular carcinoma from United States patients: analysis of all 11 exons. Carcinogenesis. 1996 Oct;17(10):2207-12.

28. Shi CY, Phang TW, Lin Y, Wee A, Li B, Lee HP, et al. Codon 249 mutation of the p53 gene is a rare event in hepatocellular carcinomas from ethnic Chinese in Singapore. Br J Cancer. 1995 Jul;72(1):146-9.

29. Hayashi H, Sugio K, Matsumata T, Adachi E, Urata K, Tanaka S, et al. The mutation of codon 249 in the p53 gene is not specific in Japanese hepatocellular carcinoma. Liver. 1993 Oct;13(5):279-81.

30. Waenlor W, Wiwanitkit V. Aflatoxin contamination of food and food products in Thailand: an overview. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003;34 Suppl 2:184-90.

31. Li FQ, Li YW, Wang YR, Luo XY. Natural occurrence of aflatoxins in Chinese peanut butter and sesame paste. J Agric Food Chem. 2009 May 13;57(9):3519-24.

32. Sripathomswat N, Thasnakorn P. Survey of aflatoxin-producing fungi in certain fermented foods and beverages in Thailand. Mycopathologia. 1981 Feb 13;73(2):83-8.

33. Jiang W, Wang XW, Unger T, Forgues M, Kim JW, Hussain SP, et al. Cooperation of tumor-derived HBx mutants and p53-249(ser) mutant in regulating cell proliferation, anchorage-independent growth and aneuploidy in a telomerase-immortalized normal human hepatocyte-derived cell line. Int J Cancer. 2010 Sep 1;127(5):1011-20.

34. Nogueira JA, Ono-Nita SK, Nita ME, de Souza MM, do Carmo EP, Mello ES, et al. 249 TP53 mutation has high prevalence and is correlated with larger and poorly differentiated HCC in Brazilian patients. BMC Cancer. 2009;9:204.

35. Hosny G, Farahat N, Tayel H, Hainaut P. Ser-249 TP53 and CTNNB1 mutations in circulating free DNA of Egyptian patients with hepatocellular carcinoma versus chronic liver diseases. Cancer Lett. 2008 Jun 18;264(2):201-8.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.
เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่องความชุกของการกลายพันธุ์ของโปรตีนพี 53 ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 249 จากอาร์จีนีนเป็นซีรีน (R249S) ในผู้ป่วยโรคตับที่เป็นและไม่เป็นโรคมะเร็งตับในประเทศไทย

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....ที่อยู่ .....ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่ 10 ธันวาคม 52 และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าผู้เข้าร่วมการวิจัยจะได้รับการรักษาตามมาตรฐานของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตามปรกติโดยโครงการวิจัยจะไม่ได้เพิ่มหรือลดการรักษาและตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของข้าพเจ้าแต่อย่างใด นอกจากขอเก็บเลือดเพิ่มเติม 15 มิลลิลิตร รวมทั้งการเจาะตับ ตามมาตรฐานและข้อบ่งชี้ตามปรกติ โดยผู้วิจัยจะขออนุญาตินำชิ้นเนื้อตับที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ตามปรกติมาใช้ ดังนั้นหากเกิดอันตรายหรือผลข้างเคียงใด ๆ จากการเจาะเลือด ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น แต่องค์กรณ์ของรัฐ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ข้าพเจ้ารับทราบว่าข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวข้าพเจ้า จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของข้าพเจ้าจะได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของข้าพเจ้า

จากการลงนามยินยอมของข้าพเจ้า ผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากข้าพเจ้าต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์

ดังกล่าว ข้าพเจ้าสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ หน่วยทางเดินอาหารและตับ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป และหลังจากข้าพเจ้าขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ข้าพเจ้าได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของข้าพเจ้าอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และข้าพเจ้าจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อจะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบการวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

เมื่อข้าพเจ้าตัดสินใจเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ข้าพเจ้ายินยอมให้ผู้วิจัยเก็บเลือดและชิ้นเนื้อส่วนที่เหลือจากการศึกษานี้ไว้ในฐานะของสิ่งส่งตรวจนิรนาม ซึ่งหากมีทีมวิจัยอื่นจะใช้เลือดหรือชิ้นเนื้อดังกล่าวทำการศึกษาวิจัย ทางผู้วิจัยที่จะศึกษา จะขออนุญาติจากทางคณะกรรมการจริยธรรมของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เพื่อนำสิ่งส่งตรวจที่เหลือไปใช้โดยไม่มีการระบุชื่อ และไม่หลักฐานที่จะติดตามว่าสิ่งส่งตรวจนั้นเป็นของใคร ซึ่งจะต้องดำเนินการให้ถูกต้องตามมาตรฐานสากลเกี่ยวกับการตรวจสิ่งส่งตรวจที่เป็นสารพันธุกรรม

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

(Information sheet for research participant)

ชื่อโครงการวิจัย. ความชุกของการกลายพันธุ์ของโปรตีนพี 53 ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 249 จากอาร์จีนีนเป็นซีรีน (R249S) ในผู้ป่วยโรคตับที่เป็นและไม่เป็นโรคมะเร็งตับในประเทศไทย

ผู้สนับสนุนการวิจัย ได้รับการ “สนับสนุน” จากทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2553 ครั้งที่ 1

<u>แพทย์ผู้ทำวิจัย</u>

ชื่อ ผศ.นพ.ดร. ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์

ที่อยู่ หน่วยทางเดินอาหารและตับ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4265

ชื่อ ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ

ที่อยู่ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4909, 02-256-4929

ชื่อ รศ.นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4265

ชื่อ ผศ. นพ. สมบัติ ตรีประเสริฐสุข

ที่อยู่ หน่วยทางเดินอาหารและตับ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4265

ชื่อ พญ. รุ่งฤดี ชัยธีรกิจ

ที่อยู่ หน่วยทางเดินอาหารและตับ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4265, 086-983-4721

ชื่อ นพ. ศัลยวิทย์ จิตต์มิตรภาพ

ที่อยู่ หน่วยทางเดินอาหารและตับ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4265, 083-413-3597

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นผู้ที่มีคุณสมบัติตามที่โครงการวิจัยนี้ต้องการ ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

<u>เหตุผลความเป็นมา</u>

มะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบมากในประเทศไทย ซึ่งภาวะตับแข็ง การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ไวรัสตับอักเสบซี และการได้รับสารอะฟลาทอกซิน บี 1 เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดมะเร็งตับ

ในประเทศที่ประชาชนได้รับสารอะฟลาทอกซินสูง จะเพิ่มโอกาสเป็นโรคมะเร็งตับอย่างมาก และจะพบหลักฐานต่อการได้รับสารพิษนี้คือพบการกลายพันธุ์ของโปรตีนที่มีหน้าที่ต่อต้านมะเร็งของร่างกาย(tumor suppressor gene) ที่ตำแหน่ง 249 (R249S) ตรงข้ามกับประเทศพัฒนาแล้วที่มีการควบคุมอาหารและผลิตภัณฑ์การเกษตรให้มีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินต่ำ จะพบว่าอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ชนิดนี้ได้น้อยมาก ในประเทศไทยมีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารสูงปานกลาง และมะเร็งตับก็เป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของชาวไทย ดังนั้นการศึกษาบทบาทของสารอะฟลาทอกซินต่อการเกิดโรคมะเร็งตับในประเทศไทยจึงมีความสำคัญ และจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศ เพราะเป็นสาเหตุการเกิดมะเร็งที่ป้องกันได้และอาจประหยัดงบประมาณของประเทศได้อย่างมากเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการรักษาผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งตับ

นอกจากนี้การกลายพันธุ์ดังกล่าวในคนปกติอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในอนาคต ซึ่งอาจนำไปสู่การใช้การตรวจนี้ในการตรวจหาผู้ที่มีความเสี่ยงสูงในการเป็นโรคมะเร็งตับได้

<u>วัตถุประสงค์ของการศึกษา</u>

เพื่อหาความชุกของการกลายพันธุ์ชนิด R249S ในเนื้อมะเร็งตับและในเลือดของผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ และเปรียบเทียบกับการกลายพันธุ์ชนิดนี้ในเนื้อตับและในเลือดของผู้ป่วยที่ยังไม่เป็นมะเร็งตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ซึ่งอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้โอกาสเกิดโรคมะเร็งตับเพิ่มเป็นทวีคูณ

ใช้จำนวนผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยอย่างน้อย 246 คน

<u>วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย</u>

หลังจากท่านให้ความยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะขอเก็บเลือดเพิ่มเติม 15 มิลลิลิตร เมื่อท่านต้องรับการเจาะเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการในครั้งถัดไป และในกรณีที่ท่านมีความจำเป็นต้องตรวจชิ้นเนื้อตับ เช่นการเจาะตับหรือการผ่าตัดตับตามมาตรฐานและข้อบ่งชี้ตามปรกติ ทางผู้วิจัยขอใช้ชิ้นเนื้อตับที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ตามปรกติไปใช้ในการตรวจการกลายพันธุ์ โดยทุกท่านจะได้รับการรักษาตามมาตรฐานของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตามปรกติโดยโครงการวิจัยจะไม่ได้เพิ่มหรือลดการรักษาและตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของท่านแต่อย่างใด

ผู้วิจัยจะขอซักถามข้อมูลจากท่านหลังจากที่ท่านสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที โดยท่านไม่ต้องมาพบผู้วิจัยนอกเหนือจากการมาตรวจตามปรกติของท่านเท่านั้น

<u>ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

เพื่อความปลอดภัย ท่านไม่ควรใช้วัคซีน หรือรับประทานยาอื่น จากการจ่ายยาโดยแพทย์อื่นหรือซื้อยาจากร้านขายยา แต่หากท่านมีความประสงค์จะใช้ ขอให้ท่านแจ้งแก่ผู้ทำวิจัย ทั้งนี้เนื่องจากวัคซีน หรือยาดังกล่าวอาจมีผลต่อการทำงานของตับหรือโรคตับ ดังนั้นขอให้ท่านแจ้งผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับยาที่ท่านได้รับในระหว่างที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย

<u>ความเสี่ยงที่อาจได้รับ</u>

ความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับการเจาะเลือด และหากท่านรับการเจาะตับหรือการผ่าตัดตับ ท่านก็จะมีความเสี่ยงจากการตรวจรักษาดังกล่าวไม่ต่างจากผู้ที่ไม่เข้าร่วมโครงการวิจัย เพราะโครงการวิจัยไม่ได้ใช้ชิ้นเนื้อตับมากไปกว่าการตรวจปรกติ ส่วนความเสี่ยงจากการรักษาอื่นเช่นการรักษาโรคมะเร็งตับและการรับประทานยาทุกชนิดอาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้ทั้งสิ้นไม่มากก็น้อย แพทย์ผู้ทำการวิจัยขอยืนยันว่าท่านจะได้รับการรักษาตามมาตรฐานของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตามปรกติโดยโครงการวิจัยจะไม่ได้เพิ่มหรือลดการรักษา

และตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของท่านแต่อย่างใด นอกจากขอเก็บเลือดเพิ่มเติม 15 มิลลิลิตร และขอตรวจชิ้นเนื้อตับที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ตามปรกติเท่านั้น

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก โดยผู้วิจัยจะขอเพิ่มปริมาณเลือดที่เจาะตรวจเพิ่มขึ้นจากปรกติอีก 15 มิลลิลิตร(ประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ) ในการเจาะเลือดครั้งเดียวกัน ซึ่งไม่ทำให้ท่านต้องเจ็บตัวเพิ่มแต่อย่างใด และปริมาณเลือด 15 มิลลิลิตรจะมีผลต่อร่างกายน้อยมาก (ปริมาณเลือดในร่างกายมีประมาณ 3000-5000 มิลลิลิตร) การตรวจนี้จึงมีผลต่อร่างกายของท่านน้อยมาก

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะตับ การผ่าตัดตับ และการฉีดสีเข้าไปอุดเส้นเลือดตับ

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ อาการเลือดออก อาการช้ำที่แผลจากการเจาะตับ-ผ่าตัดตับ-รอยเจาะเลือดที่ใช้ฉีดสี โดยความเสี่ยงดังกล่าวพบได้เท่ากับการตรวจรักษาปรกติที่ท่านมีข้อบ่งชี้ที่จะรับการตรวจรักษานั้นอยู่แล้ว ซึ่งเป็นการตรวจตามมาตรฐานที่แพทย์เจ้าของไข้พิจารณาแล้วว่ามีข้อบ่งชี้ โครงการวิจัยเพียงแต่ขอใช้ชิ้นเนื้อตับส่วนที่เหลือจากการตรวจปรกติ โดยไม่มีการเก็บชิ้นเนื้อเพิ่มจากปรกติแต่อย่างใด

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากการวิจัย

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะทราบว่าสารพันธุกรรมในเลือดหรือในตับของท่านมีการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการได้รับสารพิษอะฟลาอกซินหรือไม่ แต่การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้จะมีผลต่อสุขภาพหรือความรุนแรงของโรคของท่านน้อยมาก

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจากการตรวจนี้ ไม่มีผลต่อการรักษาโรคของท่าน และ(เท่าที่ผู้วิจัยทราบ) ยังไม่มีโรงพยาบาลใดให้บริการตรวจการกลายพันธุ์ชนิดนี้แก่ผู้ป่วยนอกเหนือจากการวิจัย

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย
- ขอให้ท่านไม่จำเป็นต้องงดการใช้ยา, สมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอื่นนอกเหนือจากที่แพทย์ได้จัดให้ แต่ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบทันที หากท่านได้รับยาหรือการรักษาอื่นนอกเหนือจากที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จัดให้ เช่น การรักษาด้วยสมุนไพร การซื้อยาจากร้านขายยา การฝังเข็ม วิธีทางไสยศาสตร์

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ผู้เข้าร่วมการวิจัยจะได้รับการรักษาตามมาตรฐานของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตามปรกติโดยโครงการวิจัยจะไม่ได้เพิ่มหรือลดการรักษาและตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการแต่อย่างใด นอกจากขอเก็บเลือดเพิ่มเติม 15 มิลลิลิตร แต่หากเกิดอันตรายหรือผลข้างเคียงใด ๆ จากการเจาะเลือด ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถ

ติดต่อกับผู้ทำวิจัยคือ ผศ.นพ.ดร. ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์ หรือ นพ. ศัลยวิทย์ จิตต์มิตรภาพ ได้ที่หน่วยทางเดินอาหารและตับ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หรือติดต่อที่เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4265, 083-413-3597 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านจะได้รับยาและการตรวจค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ตามที่แพทย์ผู้ดูแลรักษาให้สมควร โดยไม่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยนี้ แต่ค่าใช้จ่ายอื่นที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยคือค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว ผู้วิจัยและผู้สนับสนุนการวิจัยเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับส่วนนี้ทั้งหมด

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัย

การประกันภัยเพื่อคุ้มครองผู้เข้าร่วมวิจัย (ถ้ามี)

ผู้สนับสนุนการวิจัยไม่ได้ทำประกันภัยให้แก่ผู้เข้าร่วมการวิจัยเนื่องจากผู้เข้าร่วมการวิจัยจะได้รับการรักษาตามมาตรฐานของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตามปรกติโดยโครงการวิจัยจะไม่ได้เพิ่มหรือลดการรักษาและตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการแต่อย่างใด นอกจากขอเก็บเลือดเพิ่มเติม 15 มิลลิลิตร แต่หากเกิดอันตรายหรือผลข้างเคียงใด ๆ จากการเจาะเลือด ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่าน

สามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ หน่วยทางเดินอาหารและตับ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

<u>สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย</u>

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งยาและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ยา หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้

ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิดลชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

แบบเก็บข้อมูล

Case Record Form for Patients (CU HCC R249S study) v 2.0 dated 2 February 2010

วันที่..... Study Running Number.....

รหัสผู้ป่วย.....

เพศ.....อายุ.....จังหวัดภูมิลำเนา ..... จังหวัดที่อาศัยอยู่ในปัจจุบัน ..... หากอยู่กรุงเทพ อาศัยอยู่ในกรุงเทพมา.....ปี

อาชีพ..... อาการที่นำผู้ป่วยมาพบแพทย์ .....ระยะเวลาที่เป็น.....

ประวัติครอบครัว ท่านมีญาติเป็นโรคตับหรือมะเร็งตับหรือไม่..... .....โรคมะเร็งอื่น ๆ.....

น้ำหนักปัจจุบัน .....kg ท่านเคยมีน้ำหนักมากที่สุด .....kg น้ำหนักเมื่อ 6 เดือนก่อน ความสูง.....cm รอบเอว ..... นิ้ว

Alcohol use ; □current use _____ □ previous use _____ครั้งต่อสัปดาห์ ปริมาณที่ดื่ม_____ ต่อครั้ง

ประวัติการสูบบุหรี่ □current use _____ □ previous use _____.ซอง ต่อ วัน เลิกมา .....ปี

ประวัติโรคในอดีต.....

ท่านเคยใช้อาหารเสริม หรือยาสมุนไพร หรือรักษาแพทย์ทางเลือก หรือไม่ _____ ระยะเวลาที่ใช้.....

รายละเอียด_____ราคา.....ที่มา.....

สิทธิ์การรักษา (ดูสิทธิ์ในใบสั่งยาก่อน หากเขียนว่าจ่ายเองค่อยถามเพิ่ม) □ เบิกได้/จ่ายตรง □ ประกันสังคม □ ประกันสุขภาพถ้วนหน้า □ จ่ายเอง

ที่มาของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หรือ ซี (ขีดถูกถ้ามี) : _____มีญาติเป็นไวรัสตับอักเสบ ระบุ_____

: □เคยได้รับเลือด เมื่อปีพศ. _____(หรือประมาณว่ากี่ปีมาแล้ว)

: □ เคยใช้เข็มฉีดยา (iv drug use)

ยาที่กินเป็นประจำ รวมทั้งยาจาก รพ. ได้แก่

_____

_____

_____

_____

เคยได้รับการรักษาโรคไวรัสตับอักเสบมาก่อนหรือไม่..... ระบุ date_____

detail_____

Medical Information review ; ประวัติไวรัสตับอักเสบและมะเร็งตับ และตับแข็ง

HBsAg _____titer_____ HBeAg_____titer____

AntiHbc _____ AntiHbs _____HBV DNA _____

Anti HCV _____

AFP _____ date_____ HCC 1st dx date_____

HCC จาก ☐ CT ☐ MRI Left lobe จำนวนก้อน _____size _____cm. ☐ hypertrophy

Right lobe จำนวนก้อน _____size _____cm. ☐ atrophy at _____ ☐ hepatomegaly

Local invasion _____ ☐ abnormal portal vein/hepatic vein ระบุ_____

Lymph node_____TNM staging _____ HCC grade _____

HCC barcelona stage _____ Metastasis (ระบุlocation)_____

Cirrhotic status by clinical ____ non-cirrhotic _____ compensated ____ decompensated

Complication of cirrh date and detail ;

- SBP _____ ☐ ไม่เคยมี
- Ascites _____☐ ไม่เคยมี
- Hep encep _____☐ ไม่เคยมี

☐ Variceal GI bleed

EGD date _____result_____

R249S mutation detected by Taqman Realtime PCR _____ Specimen No._____

<u>Laboratory results</u> date _____ results

Hb_____MCV_____WBC_____N_____L_____E_____M_____Platelet_____

FBG_____Cholesterol_____Triglyceride_____BUN_____Creatinine_____

TB_____DB_____AST_____ALT_____Alk_____Alb_____total protein_____PT_____INR_____PTT_____

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANA_____titer_____type_____ AntiSmoothMuscle_____titer_____ AntiLKM_____

Ferritin_____Transferrin_____ Serum iron_____ Transferrin saturation_____

Ceruloplasmin_____ Other _____

USG abdomen date_____ result _____

CT / MRI date _____result _____

Treatment ; _____ surgery _____ RFA _____ TACE / TOCE _____ Chemotherapy

Date _____ Specify _____Last session _____

Quality of Life VAS _____ /10 Pain Score _____ / 10

Survival ; ☐ Dead วันที่ ____ ☐ Loss to follow up Last opd visit วันที่_____☐ Still had OPD follow up appointment

Child pugh score _____ MELD score _____ Mode of death _____

……< cut here

Follow Up Information (แยกเก็บออกจากส่วนบน) SP ……-……

Contact ; เบอร์โทรศัพท์ที่สามารถติดต่อได้…… เบอร์ติดต่อญาติที่ใกล้ชิด .....เกี่ยวข้องเป็น……

Quality of Life VAS _____ /10 Pain Score _____ / 10

Survival ; ☐ Dead วันที่ ____ ☐ Loss to follow up Last opd visit วันที่_____☐ Still had OPD visit

Child pugh score _____ MELD score _____

Survival (from diagnosis) _____

Survival (from first onset of patient detected symptoms) _____

Survival (after clinical decompensation if any) _____

Mode of death _____

Version 2.0 printed 8 February 2010

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.

ขั้นตอนวิธีการสกัด, เพิ่มปริมาณดีเอนเอ และตรวจหาการกลายพันธุ์โดยละเอียด

1.ขูดชิ้นเนื้อจากสไลด์แก้วที่มีเนื้อมะเร็งตับอยู่มาใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก

2.ใส่สารละลายเพื่อสกัดสารพันธุกรรมออกมา และล้างเอาพาราฟินออก โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปยี่ห้อ 5 prime (บริษัท 5 prime GmbH, Hamburg, Germany)

3. สารละลายที่สกัดได้ 50 ไมโครลิตรจะถูกนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ติดลบ 20 องศาเซลเซียส เพื่อรอรับการตรวจ

4. นำดีเอนเอไปเพิ่มจำนวนส่วนของเอกซอน 7 โดยการทำพีซีอาร์ 2 ครั้ง (Nested PCR) โดยผสมสารละลายดีเอนเอ 2 ไมโครลิตรเข้ากับสารละลาย PerfectTaq Plus MasterMix Kit (5-Prime, Hamburg, Germany) 10 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 ตัว (1.25 mM outer forward primer (TP53-OS: 5'-CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA -3') และ 1.25 mM outer reverse ward primer (TP53-OAS: 5'-AGG GGT CAG CGG CAA GCA GA-3')) และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 25 ไมโครลิตร

5. ดำเนินการเพิ่มจำนวนดีเอนเอในส่วนของเอกซอน 7 โดยเริ่มกระบวนการพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ (94°C นาน 3 นาที, then follow by 40 cycle of 94°C นาน 18 วินาที, 50°C นาน 21 วินาที, and 72°C นาน 1.30 นาที and conclude by 72°C นาน 10 นาที.

6.นำผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ที่ได้ ซึ่งเป็นเอกซอน 7 ที่มีความยาวประมาณ 237 คู่เบส มาเพิ่มจำนวนอีกครั้งโดยทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์อีกคู่ซึ่งจับกับส่วนปลายของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพีซีอาร์แรก (คือใช้สารละลายเช่นเดียวกับข้อ 4 แต่เปลี่ยนไพรเมอร์เป็น 1.25 mM inner forward primer (TP53-OS: 5'-AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT-3') และ 1.25 mM inner reverse ward primer (TP53-OAS: 5'-TGT GCA GGG TGG CAA GTG GC-3') โดยใช้ผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 5 ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร

7. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากพีซีอาร์ครั้งที่ 2 มาแยกบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้นร้อยละ 2 และผ่านด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)

8. นำมาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์และดูด้วยกล้องยูวี (UV transluminator) โดยผลผลิตที่ได้จะเป็น 2 แถบที่มีความยาว 237 และ 177 คู่เบส (เพราะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด)

9.นำมาตรวจการกลายพันธุ์โดยวิธีตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction fragment length polymorphism (RFLP)) โดยใช้เอนไซม์ restriction endonuclease ชื่อ *Hae*III ซึ่งจะตัดสายดีเอนเอในตำแหน่งที่มีคู่เบสเป็น CCGG เท่านั้น ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งโคดอนที่ 249 พอดี แต่ยังมีตำแหน่ง CCGG อีกตำแหน่งที่ส่วนต้นของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของการศึกษานี้ที่เป็น CCGG ซึ่งจะโดนตัดเช่นกัน ซึ่งทำปฏิกริยาโดยผสมเอนไซม์ 1 *Hea*III (New England BioLabs inc, Ipswich, MA) 1 ยูนิต กับ 10X Buffer 4 (New England BioLabs inc, Ipswich, MA) 2 ไมโครลิตร และผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ครั้งที่ 2 15 ไมโครลิตรเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร 20 ul.

10.ทิ้งสารละลายดังกล่าวไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

11. จากนั้นนำสารละลายมาแยกบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้นร้อยละ 3 และผ่านด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)

12. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์และดูด้วยกล้องยูวี (UV transluminator) ซึ่งจะเป็นการตรวจว่ามีการกลายพันธุ์ที่โคดอน 249 หรือไม่ เพราะ *Hae*III จะตัดสายดีเอนเอได้ที่ตำแหน่งที่ 12, 24, และ 116 ซึ่งตำแหน่ง 116 ตรงกับโคดอน 249

ในตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์จะพบว่าแถบเรืองแสงจะปรากฏที่ความยาว 12, 61 และ 92 คู่เบส ขณะที่ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์จะพบว่าแถบเรืองแสงจะปรากฏที่ความยาว 12 และ 153 คู่เบส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ.

คู่เบสของยีนที่ทำการศึกษา

คู่เบสของยีนพี 53 (TP53) บริเวณเอกซอนที่ 7 ซึ่งเริ่มจากคู่เบสที่ 18256 ถึง 18365 อ้างอิงจากฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของ www.pubmed.com

/gene="TP53"

/gene_synonym="FLJ92943; LFS1; P53; TRP53"

/inference="alignment:Splign:1.39.8"

/number=7

```
17941 ggcggatcac gaggttggga gatcgagacc atcctggcta acggtgaaac cccgtctcta
18001 ctgaaaaata caaaaaaaaa ttagccgggc gtggtgctgg gcacctgtag tcccagctac
18061 tcgggaggct gaggaaggag aatggcgtga acctgggcgg tggagcttgc agtgagctga
18121 gatcacgcca ctgcactcca gcctgggcga cagagcgaga ttccatctca aaaaaaaaaa
18181 aaaaaggcct cccctgcttg ccacaggtct ccccaaggcg cactggcctc atcttgggcc
18241 tgtgttatct cctaggttgg ctctgactgt accaccatcc actacaacta catgtgtaac
18301 agttcctgca tgggcggcat gaaccggagg cccatcctca ccatcatcac actggaagac
18361 tccaggtcag gagccacttg ccaccctgca cactggcctg ctgtgcccca gcctctgctt
18421 gcctctgacc cct gggccca cctcttaccg atttcttcca tactactacc catccacctc
18481 tcatcacatc cccggcgggg aatctcctta ctgctcccac tcagttttct tttctctggc
18541 tttgggacct cttaacctgt ggcttctcct ccacctacct ggagctggag cttaggctcc
18601 agaaaggaca agggtggttg ggagtagatg gagcctggtt ttttaaatgg gacaggtagg
18661 acctgatttc cttactgcct cttgcttctc ttttcctatc ctgagtagtg gtaatctact
```

Left ext and int primer = Primer ฝั่งซ้าย (forward primer)

Right ext and int primer = Primer ฝั่งขวา (reverse primer)

Original cut of Exon 7 ; 18256..18365

18241 tgtgttatct cctag-18256-gttgg ctctgactgt accaccatcc actacaacta catgtgtaac

18301 agttcctgca tgggcggcat gaaccggagg cccatcctca ccatcatcac actggaagac

18361 tc-18365-caggtcag gagccacttg ccaccctgca cactggcctg ctgtgcccca gcctctgctt

Exon 7

1 gttggctctg actgtaccac catccactac aactacatgt gtaacagttc ctgcatgggc

61 ggcatgaacc ggaggcccat cctcaccatc atcacactgg aagactccag

NCBI Reference Sequence: NG_017013.1

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ nested PCR

```
1                                        aggcg cactggcctc atcttggccc
26 tgtgttatct cctaggttgg ctctgactgt accaccatcc actacaacta catgtgtaac
66 agttcctgca tgggcggcat gaaccggagg cccatcctca ccatcatcac actggaagac
126tccaggtcag gagccacttg ccaccctgca ca
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	นพ. ศัลยวิทย์ จิตต์มิตรภาพ
ภูมิลำเนา	กรุงเทพมหานคร
การศึกษา	แพทยศาสตร์บัณฑิต
	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2547
	วุฒิบัตรอายุรแพทย์ ราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย ปีการศึกษา 2551
พ.ศ. 2548-2549	แพทย์ใช้ทุนโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2549-2552	แพทย์ประจำบ้านสาขาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2552-2554	ปัจจุบันกำลังฝึกอบรมหลักสูตรแพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาอายุรศาสตร์ โรคระบบทางเดินอาหาร ที่หน่วยทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย