


การศึกษาเปรียบเทียบโรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดการตี้อยา
กับกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป



นาย สุรัชย์ อมรสวัสดิ์วัฒนา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF HBV RIBONUCLEASE H DOMAIN IN NAÏVE AND DRUG RESISTANCE
PATIENTS : A PILOT STUDY

Mister Surachai Amornsawadwattana



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 2009

Copyright of Chulalongkorn University

สุรัชย์ อมรสวัสดิ์วัฒนา : การศึกษาเปรียบเทียบ ไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดการดื้อยากับกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป (COMPARISON OF HBV RIBONUCLEASE H DOMAIN IN NAÏVE AND DRUG RESISTANCE PATIENTS: A PILOT STUDY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.นพ.ดร.ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ, 33 หน้า

ที่มา ยาที่ใช้รักษาไวรัสตับอักเสบบีแบ่งเป็น 2 ชนิด คือยากกลุ่มอินเตอร์เฟอรอนและยากกลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ ในปัจจุบันพบปัญหาเรื่องกาต่อยากกลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์มากขึ้นเรื่อยๆ

เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์โพลีเมอเรสของไวรัสตับอักเสบบีและเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทสของไวรัสเอชไอวีมีความคล้ายคลึงกัน และมีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวางในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนของไวรัสเอชไอวีในด้านต่างๆ ซึ่งพบว่าในผู้ป่วยเอชไอวีที่มีภาวะดื้อยาจะมีเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมในบางตำแหน่งของส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนบ่อยขึ้นกว่าผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการและยังสัมพันธ์กับการดื้อยาไซโดวูดีน

ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการศึกษาในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มีการดื้อยามาก่อน จากหลักการและข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จึงนำไปสู่การวิจัยในครั้งนี้ เพื่อศึกษาว่ามีเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนเปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดการดื้อยาและกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป

วิธีการศึกษา ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่สงสัยว่าเกิดการดื้อยาและกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป จะได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจหาการดื้อยาและตรวจหารหัสพันธุกรรมในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่ม

ผลการศึกษา ผู้ป่วยทั้งหมด 37 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วย 24 รายที่เป็นกลุ่มไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป และผู้ป่วย 13 รายที่เป็นกลุ่มไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดการดื้อยา มีลักษณะพื้นฐานใกล้เคียงกัน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มและไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผลการศึกษา เนื่องจากผู้ป่วยในการศึกษามีจำนวนน้อย พบว่าไม่มีความแตกต่างในเรื่องการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนระหว่างผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั่วไปและผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดการดื้อยา คงต้องการการศึกษาที่มีจำนวนผู้ป่วยที่มากขึ้นเพื่อยืนยันผลการศึกษาในครั้งนี้

ภาควิชา.....อายุรศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....**สุรัชย์ อมรสวัสดิ์วัฒนา**.....
สาขาวิชา.....อายุรศาสตร์.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....**Noirun Mas**.....
ปีการศึกษา 2552.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....**๐๕ ๒๖๖**.....

5174844030 : MAJOR MEDICINE (GASTROENTEROLOGY)

KEYWORDS: Ribonuclease H / Drug resistance / Hepatitis B virus

SURACHAI AMORNSAWADWATTANA : COMPARISON OF HBV RIBONUCLEASE H DOMAIN IN NAÏVE AND DRUG RESISTANCE PATIENTS : A PILOT STUDY. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PIYAWAT KOMOLMIT, M.D., THESIS CO-ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., 33 pp.

Background Nucleotide or nucleoside analog (NA) drug resistance has increasingly become a problem in HBV treatment. Due to the similarity between HBV polymerase and HIV-1 reverse transcriptase, knowledge obtained from HIV research might be applied to HBV. A previous study has shown that HIV-1 Ribonuclease H (RNase H) mutation might contribute to nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) resistance. Therefore, we hypothesize that it may be possible to have any mutation in the HBV RNase H domain of HBV NA drug resistant patients.

Methods A one-year cross-sectional study was conducted in a single university hospital. Serum samples were collected from naïve and suspected HBV NA drug resistant patients. To confirm HBV NA drug resistance, genotypic resistance testing was performed. HBV genotype and RNase H domain were also sequenced and compared.

Results In total, 37 HBV-infected patients were finally analyzed. Of these, 24 were considered sensitive to the drug and 13 resistant as determined by the genotypic resistance method. Comparison between both groups showed that they had comparable baseline characteristics and there was no particular mutation in the HBV RNase H domain.

Conclusion Possibly due to the small sample size, no significant mutation was found in the HBV RNase H domain of either group of HBV-infected patients. Further research on a larger patient group will be essential to confirm these initial findings

Department : Medicine Student's Signature *ศุภชัย อมรสาวิวัฒน์*
 Field of Study : Medicine Advisor's Signature *P. Komolmit*
 Academic Year : 2009 Co-Advisor's Signature *Yong Poovorawan*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของ ผศ.นพ.ดร.ปิยะวัฒน์ โกมลสิทธิ์และ ศาสตราจารย์ยง ภู่วรรณที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการทำวิจัย ขอขอบคุณ พญ.สติมัย อนิวรรณ ที่ช่วยให้คำปรึกษา รวมถึงแพทย์หน่วยโรคระบบทางเดินอาหารและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเก็บข้อมูลผู้ป่วย

ขอขอบคุณ คุณภัทริศา สงวนหมู่, คุณนุชนารฏ ถาวรสุขและคุณปริยาพร วิชัยวัฒนาที่แนะนำ และช่วยเหลือขั้นตอนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ คุณพนารัตน์ ไทยใหม่ และเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยระบบทางเดินอาหาร คุณวัชรินทร์ อัมพล ช่วยตรวจแก้ไขเอกสาร

ขอขอบพระคุณผู้ป่วยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฅ |
| สารบัญภาพ..... | ญ |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... | ฎ |
| บทที่ | |
| 1. บทนำ..... | 1 |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย..... | 1 |
| คำถามการวิจัย..... | 1 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 2 |
| กรอบแนวความคิดในการวิจัย..... | 2 |
| คำสำคัญ..... | 2 |
| การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย..... | 3 |
| ข้อจำกัดของการวิจัย..... | 3 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 3 |
| 2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... | 4 |
| 3. วิธีการดำเนินการ..... | 10 |
| รูปแบบการวิจัย (Research design)..... | 10 |
| ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)..... | 10 |
| เกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)..... | 10 |
| เกณฑ์การตัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)..... | 10 |
| ขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)..... | 10 |
| การสังเกตและการวัด (Observation and measurement)..... | 11 |
| ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย..... | 11 |

| บทที่ | หน้า |
|--|------|
| การรวบรวมข้อมูล (Data collection)..... | 11 |
| การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)..... | 12 |
| ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations)..... | 12 |
| ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)..... | 12 |
| ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefit and application)..... | 13 |
| อุปสรรคที่ผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดขึ้นในขณะดำเนินการวิจัย และมาตรการในการแก้ไข (Obstacle)..... | 13 |
| การบริหารการวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and time schedule)..... | 13 |
| งบประมาณรายจ่ายของโครงการวิจัย (Budget)..... | 13 |
| 4. ผลการวิจัย..... | 15 |
| 5. อภิปรายผลวิจัย..... | 20 |
| 6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... | 23 |
| รายการอ้างอิง..... | 24 |
| ภาคผนวก..... | 26 |
| ภาคผนวก ก ใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา..... | 27 |
| ภาคผนวก ข แบบบันทึกผู้ป่วย..... | 29 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... | 33 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1 | ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย..... | 16 |
| 2 | แสดงการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนในส่วนโบริบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนผู้ป่วย ที่ไม่เคยรับการรักษผู้ป่วยที่ตรวจพบการดื้อยา..... | 18 |



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 1 | โครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี..... | 4 |
| 2 | ตำแหน่งที่มีการเกิด mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีดื้อยา..... | 5 |
| 3 | การทำงานของ Ribonuclease H enzyme..... | 6 |
| 4 | โครงสร้างทางเคมีของยาที่มีผลต่อการแบ่งตัวไวรัสตับอักเสบบี 3 กลุ่ม..... | 7 |
| 5 | อัตราการดื้อยากลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ สะสม..... | 7 |
| 6 | การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวรัสตับอักเสบบีเมื่อเกิดการดื้อยา..... | 8 |
| 7 | แผนงานการดำเนินงานการวิจัย..... | 12 |
| 8 | สรุปจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการ..... | 15 |
| 9 | ปริมาณไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA) ระหว่างผู้ป่วยทั่วไป (Naïve) กับผู้ป่วยที่ดื้อยา (Resistant)..... | 17 |
| 10 | ระดับ ALT ระหว่างผู้ป่วยทั่วไป (Naïve) กับผู้ป่วยที่ดื้อยา (Resistant)..... | 17 |
| 11 | กลไกการดื้อยาของการกลายพันธุ์ในส่วนของไรโบนิวคลีโอเอสเอสโดเมน..... | 21 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | |
|---------|--------------------------------|
| HBV | Hepatitis B virus |
| RNase H | Ribonuclease H |
| NA | Nucleotide/ Nucleoside Analogs |
| LAM | Lamivudine |
| ADV | Adefovir |
| ETV | Entecavir |
| LdT | Telbivudine |
| TDF | Tenofovir |



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

ไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญประการหนึ่ง ประเมินการว่ามีผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังทั่วโลก 350 ล้านคน [1,2] ยาที่ใช้ในการรักษาไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังแบ่งเป็น 2 กลุ่มด้วยกันคือ Interferon และ Nucleotide/ Nucleoside Analogues (NA) ซึ่งยากกลุ่ม analogues ที่ได้รับอนุญาตเพื่อใช้ในการรักษาในปัจจุบันมีอยู่ 5 ชนิดด้วยกันได้แก่ Lamivudine, Adefovir, Entecavir, Telbivudine และ Tenofovir ปัญหาของยาในกลุ่ม NA ที่สำคัญคือการดื้อยา[2] ซึ่งเกิดจากการมี mutation ในส่วน reverse transcriptase function ของ HBV-DNA polymerase [2]

มีข้อมูลสนับสนุนว่าโครงสร้างของ HIV polymerase และ HBV polymerase มีลักษณะคล้ายคลึงกัน [3] และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับ Ribonuclease H (RNase H) Domain ในผู้ป่วย HIV infection ในแง่ที่จะเป็นยารักษากลุ่มใหม่ (new antiviral agent) และความสัมพันธ์ระหว่าง mutation ในส่วน RNase H Domain กับการดื้อยา Zidovudine (AZT) ซึ่งเป็นยากกลุ่ม nucleoside analogue ตัวหนึ่ง [4] ดังการศึกษาของ Roquebert B และคณะ [5] ซึ่งพบว่าผู้ป่วย HIV infection ที่มีภาวะดื้อยา จะมี mutation ในบางตำแหน่งในส่วนของ RNase H บ่อยขึ้น (L469T/I/M/H, T470P/S/E/K, A554T/L/K และ K588R/G/E) กว่าผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการรักษา และ mutation ที่ตำแหน่ง K588R/G/E นั้นสัมพันธ์กับ number of thymidine analogue mutation (TAM) ซึ่ง TAM นี้สัมพันธ์กับการดื้อยา AZT

เนื่องจากความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างของ HBV และ HIV ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับ HIV อาจจะนำมาประยุกต์ใช้ใน HBV ได้ ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการศึกษาในส่วน RNase H Domain ในผู้ป่วย HBV ที่มีการดื้อยามาก่อน จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จึงนำไปสู่การวิจัยในครั้งนี้ เพื่อศึกษาว่ามี mutation ในส่วน RNase H Domain ในผู้ป่วย HBV หรือไม่

1.2 คำถามหลักของการวิจัย (Research Questions)

คำถามหลัก (Primary Research Question)

ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มีการดื้อยาในกลุ่ม NA นั้น มีการเกิด mutation ในส่วน RNase H domain เมื่อเทียบกับผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีปกติที่ไม่มีการดื้อยาหรือไม่

คำถามรอง (Secondary Research Question)

ถ้ามีการเกิด mutation ในส่วน RNase H domain จริง จะมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาในกลุ่ม NA ตัวใดตัวหนึ่งอย่างจำเพาะเจาะจงหรือไม่

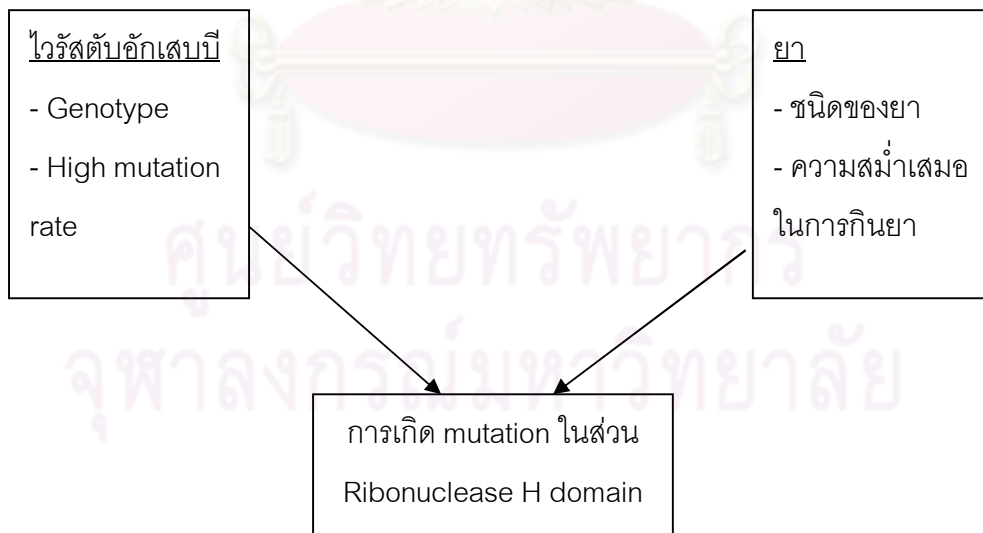
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาว่ามีการเกิด mutation ในส่วน Ribonuclease H domain ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มีการดื้อยาในกลุ่ม NA หรือไม่
2. เพื่อศึกษาว่าถ้ามีการเกิด mutation ในส่วน Ribonuclease H domain จริง จะมี mutation ตำแหน่งใดบ้าง ที่จะสัมพันธ์กับการดื้อยาในกลุ่ม NA ตัวใดตัวหนึ่งอย่างจำเพาะเจาะจงบ้าง

1.4 สมมุติฐาน (Hypothesis)

ไม่มี

1.5 กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption) ไม่มี

1.7 คำสำคัญ (Key Words)

Ribonuclease H

Drug resistance

Hepatitis B virus

1.8 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีดื้อยานิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ (HBV NA drug resistance) คือผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่ตรวจรหัสพันธุกรรมด้วยวิธี polymerase chain reaction แล้วตรวจพบ Genotypic resistance ของยานิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์

1.9 ข้อจำกัดทางการวิจัย (Limitation)

การวิจัยนี้ศึกษาเปรียบเทียบผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดการดื้อยากับผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษา โดยที่ผู้ป่วยก่อนการรักษาและเกิดการดื้อยาไม่ใช่คนคนเดียวกัน ดังนั้นจึงอาจมีความผันแปร (variation) ของพันธุกรรมที่มีโอกาสเกิดได้เองมาเกี่ยวข้อง แล้วทำให้เกิดความแตกต่างในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอส (Ribonuclease H domain) ได้โดยบังเอิญ ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา

1.10 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefit and Application)

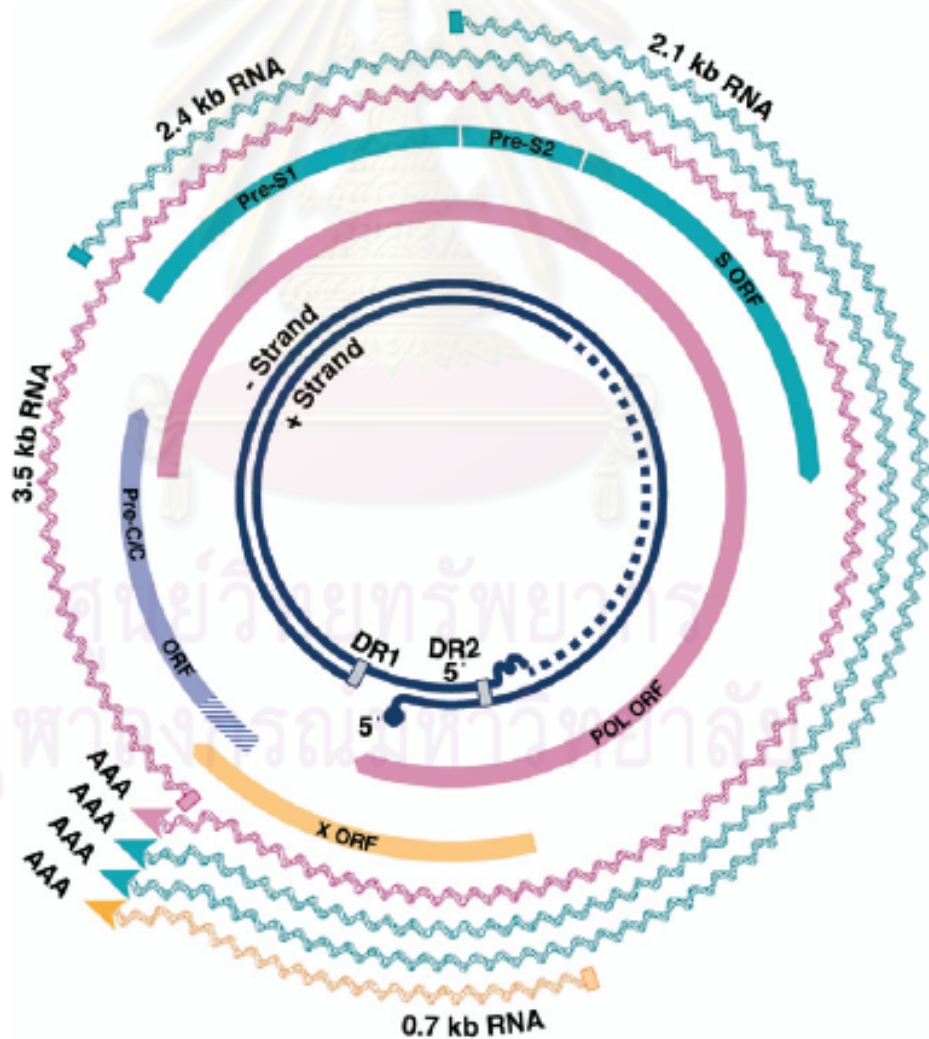
ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับการตรวจหาการดื้อยาโดยไม่เสียค่าใช้จ่ายใดๆ ถ้าผลการศึกษาออกมาว่ามีความสำคัญของ mutation ในส่วน RNase H Domain ในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มีการดื้อยา ก็จะเป็นการค้นพบความรู้ใหม่ขึ้นมา และถ้า mutation ในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสนี้มีสัมพันธ์กับการดื้อยาตัวใดตัวหนึ่งขึ้นมา ก็อาจจะเปลี่ยนแปลงวิธีการตรวจการดื้อยาที่ทำอยู่ในปัจจุบัน อาจจะต้องตรวจ mutation ในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสนี้เพิ่มเติม เพื่อยืนยันเรื่องการดื้อยา

ศูนย์วิจัยทรัพยากรชีวภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of related literatures)

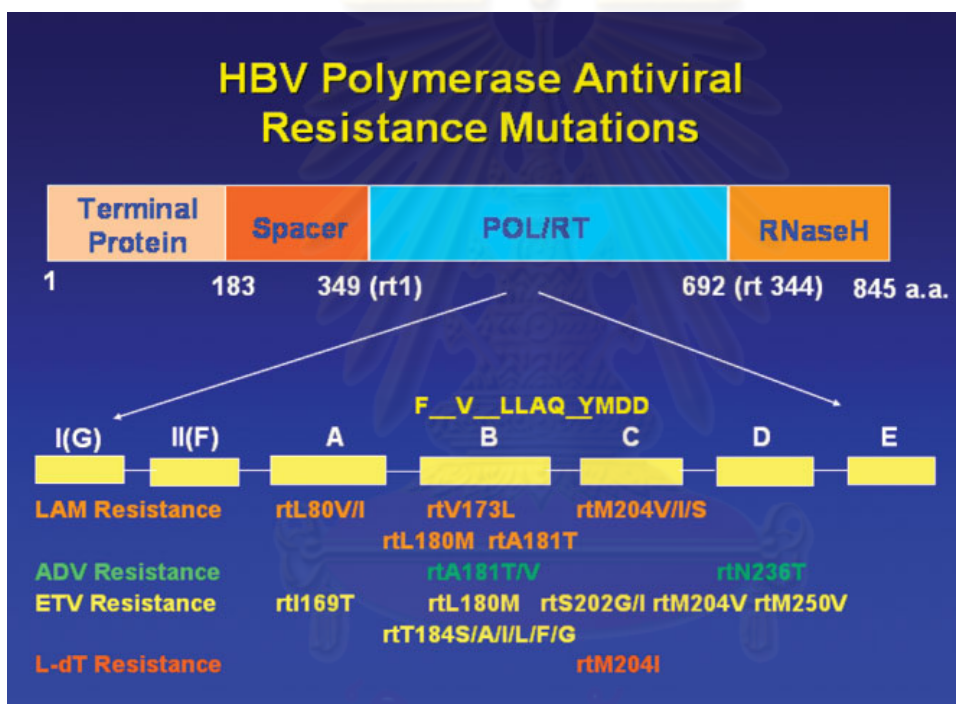
ไวรัสตับอักเสบบี (HBV virus) [6] จัดเป็น DNA virus ขนาดประมาณ 42 นาโนเมตร ประกอบด้วยเปลือกที่เป็นไขมัน (lipid envelope) และมีนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) อยู่ข้างในซึ่งโครงสร้างเป็นแบบ partially double stranded และมีขนาดประมาณ 3.2 กิโลเบส จีโนมของไวรัสตับอักเสบบีจะมี reading frame 4 สายที่ซ้อนกันอยู่ และมีสาย RNA 4 แบบซึ่งสร้างโปรตีนของไวรัสได้ 7 ชนิด ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี[6]

HBV polymerase เป็นโปรตีนที่ทำงานได้หลายหน้าที่ ประกอบด้วย 4 ส่วนย่อยด้วยกัน[6,7] ดังภาพที่ 2 คือ

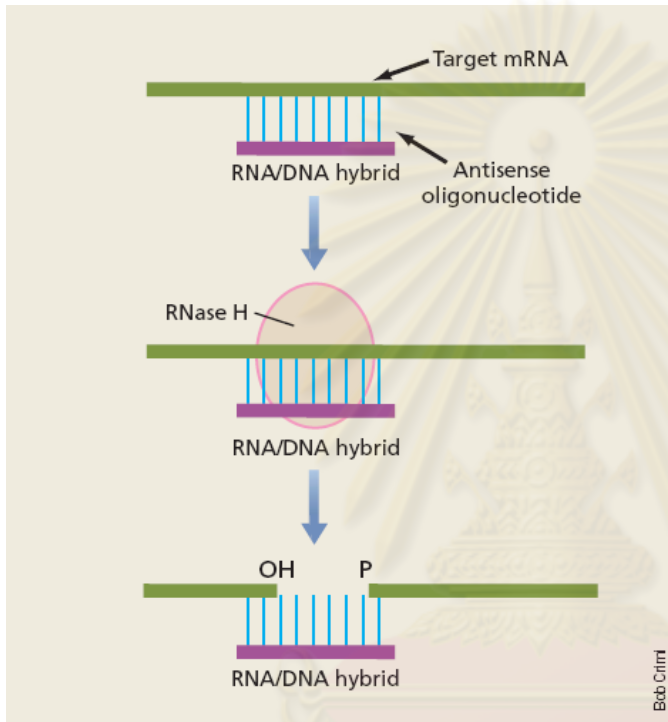
- Terminal protein ทำหน้าที่ จับกับสาย DNA เพื่อเริ่มขบวนการ Reverse transcription
- Spacer ยังไม่ทราบการทำงานที่ชัดเจน
- Reverse transcriptase มีความสำคัญคือ เป็นบริเวณที่เกิด mutation ของเชื้อดื้อยา
- Ribonuclease H (RNase H) มีขนาดเท่ากับกรดอะมิโน 153 ตัว ทำหน้าที่ย่อยสลาย Pregenomic RNA หลังจากมีการสังเคราะห์ DNA เกิดขึ้นแล้ว ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 ตำแหน่งที่มีการเกิด mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีดื้อยา [8]

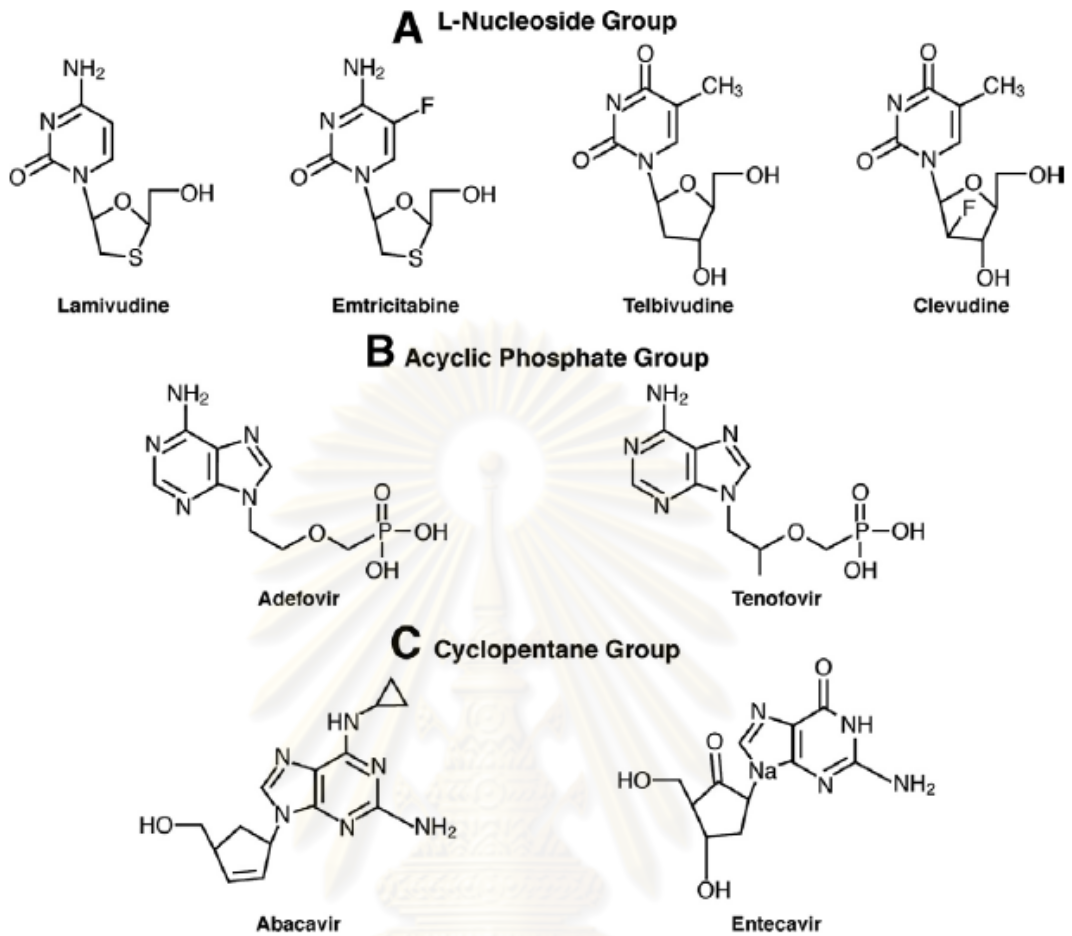
ไวรัสตับอักเสบบีมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว สามารถเพิ่มจำนวนได้ 10^{12} virion/วัน และมีอัตราการกลายพันธุ์สูง (high mutation rate) ประมาณ 10^{-5} substitution/base/cycle หรือคิดเป็นการกลายพันธุ์ได้ถึง 10^{11-12} point mutation ต่อวัน เมื่อเทียบกับไวรัสตับอักเสบบีที่มีขนาด 3.2 กิโลเบส ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนได้ในทุกๆตำแหน่ง นอกจากนี้เอนไซม์โพลีเมอเรสของไวรัสตับอักเสบบียังไม่มีการตรวจสอบความถูกต้อง (proofreading function) ของสายนิวคลีโอไทด์ที่สร้างขึ้นใหม่ ดังนั้นการกลายพันธุ์จึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

ยากลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ถ้าแบ่งตามโครงสร้างทางเคมีจะแบ่งได้ 3 กลุ่มด้วยกัน คือ L-nucleosides, acyclic phosphonate nucleotides, และ cyclopentane deoxyguanosine analogues [6] ดังภาพที่ 4 กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้เมื่อบริหารเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดขบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตเข้าไปยังโมเลกุลของตัวยา (phosphorylation) ซึ่งเมื่อโมเลกุลนี้ไปต่อยังสายนิวคลีโอไทด์จะทำให้เกิดการสิ้นสุดการสร้าง (termination) ของสายนิวคลีโอไทด์ที่สร้างขึ้นใหม่ [6]

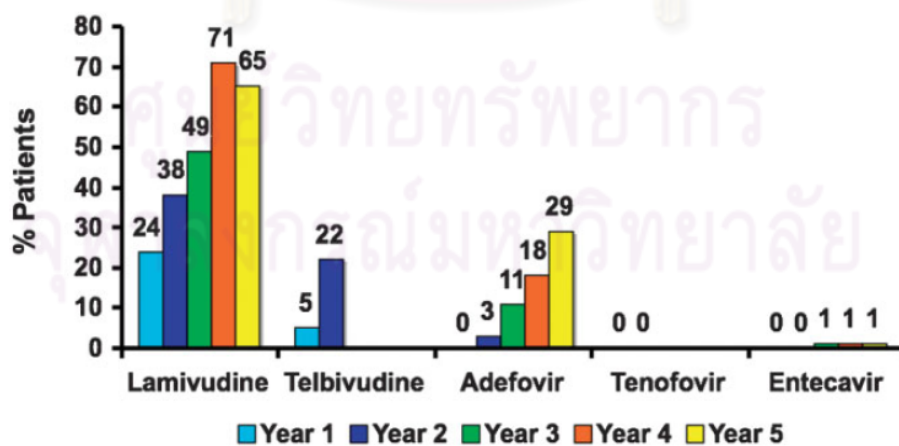


ภาพที่ 3 การทำงานของ Ribonuclease H enzyme [9]

กลไกการคือยากลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ เมื่อมีการกลายพันธุ์ในส่วนของรีเวอร์สทรานสคริปเทสของเอนไซม์โพลีเมอเรส จะมีผลทำให้ความสามารถของเอนไซม์นั้นจับกับยาได้ลดลง ทำให้ยังมีการสร้างสายพันธุกรรมต่อไปได้ [10] อัตราการคือยากลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์สูงสุดในกลุ่ม L-nucleosides ซึ่งประกอบไปด้วยยา Lamivudine กับ Telbivudine และลดต่ำลงในกลุ่ม acyclic phosphonate nucleotides, และ cyclopentane deoxyguanosine ในปัจจุบันนี้ยาที่มีการคือยาน้อยที่สุดได้แก่ยา Entecavir และ Tenofovir และในขณะนี้ยา Tenofovir ยังไม่พบปัญหาเรื่อง Primary drug resistance ใดๆ [11]



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของยาที่มีผลต่อการแบ่งตัวไวรัสตับอักเสบบี 3 กลุ่ม [6]

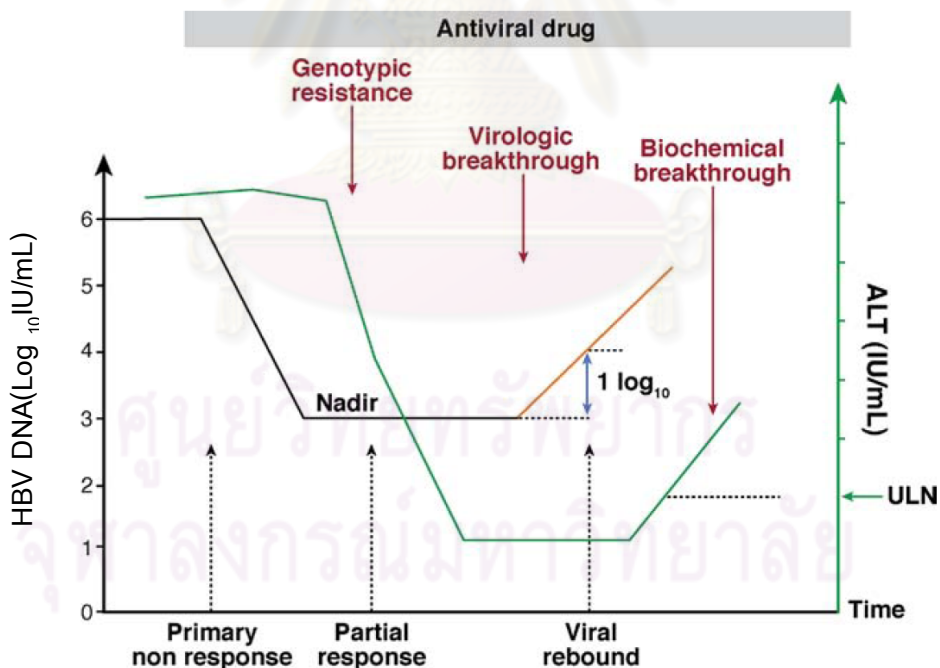


ภาพที่ 5 อัตราการดื้อยากลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ สะสม (Cumulative rate of antiviral resistance) ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มี HBeAg เป็นบวก (ยกเว้นยา Adefovir ที่ข้อมูลเป็นผู้ป่วยที่มี HBeAg เป็นลบ) ที่ไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน [10]

ได้มีการให้คำจำกัดความเรื่องการดื้อยาไวรัสตับอักเสบบี (Drug resistance) [8,12] ถ้ามีข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้ มีความเป็นไปได้ว่ามีการดื้อยาเกิดขึ้น

- Virological breakthrough: มีการเพิ่มขึ้นของ HBV DNA มากกว่า 1 log₁₀ จากระดับ nadir หลังจากได้ virological response หรือขณะที่กำลังได้รับการรักษาอยู่
- Viral rebound: มีการเพิ่มขึ้นของ HBV DNA มากกว่า 20,000 IU/mL หรือมากกว่าระดับก่อนการรักษาหลังจากได้ virological response หรือขณะที่กำลังได้รับการรักษาอยู่
- Primary drug failure: มีการลดลงของ HBV DNA น้อยกว่า 1 log₁₀ ภายใน 3 เดือนหลังจากเริ่มการรักษา
- Biochemical breakthrough: มีการเพิ่มขึ้นของ ALT ขณะที่ได้รับการรักษาหลังจากที่เคยลดลงเป็นปกติ

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวรัสตับอักเสบบีเมื่อเกิดการดื้อยา [11] ได้แสดงไว้ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวรัสตับอักเสบบีเมื่อเกิดการดื้อยา [11]

ปัจจุบันมีข้อมูลสนับสนุนว่าโครงสร้างของ HIV polymerase และ HBV polymerase มีลักษณะคล้ายคลึงกัน [3] และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับ Ribonuclease H (RNase H) Domain ในผู้ป่วย HIV infection ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับ HIV อาจจะนำมาประยุกต์ใช้ใน HBV ได้ ปัจจุบันข้อมูล

เกี่ยวกับการศึกษาเกี่ยวกับ HBV RNase H domain นั้นมีน้อย และมักเกี่ยวกับการทดลองเป็นหลัก ดังการศึกษาต่อไปนี้

- Liu J และคณะ [13] ได้ทำการทดลองถึงผลของ targeted ribonuclease (fusion protein ของ HBV c protein และ ribonuclease human eosinophil-derived neurotoxin) โดยวิธี transfection ของ cell culture พบว่ามีการลดลงร้อยละ 58 ของ HBsAg concentration ในกลุ่มที่เป็น transfected cell และสรุปว่า targeted ribonuclease อาจจะเป็นยาตัวใหม่ในการรักษาไวรัสตับอักเสบบี
- Cheng H และคณะ [14] ได้ทำการ cloning ส่วนของ HBV RNase H ในแบคทีเรีย Escherichia coli. ได้สำเร็จ ซึ่งจะเป็ประโยชน์ต่อการศึกษาอื่นๆเกี่ยวกับ anti-RNase H antibody ต่อไป
- Potenza N และคณะ [7] สามารถสังเคราะห์และสกัดเอ็นไซม์ HBV RNase H ได้สำเร็จ และพบว่า HBV RNase H domain สามารถทำงานได้อย่างเป็นอิสระต่อส่วนอื่นๆของ HBV polymerase

ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับ mutation ในส่วน RNase H domain ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี มีแต่การศึกษาในผู้ป่วยที่มี HIV infection ดังการศึกษาของ Roquebert B และคณะ [15] ที่กล่าวไปแล้วข้างต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการ

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (descriptive study) ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง (cross sectional design)

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

ประชากร (population) และตัวอย่าง (sample)

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามามีการศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีภาวะ NA resistance ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีภาวะ Virological breakthrough, Viral rebound, Primary drug failure หรือ Biochemical breakthrough [8, 16] ข้อใดข้อหนึ่งตามนิยามดังต่อไปนี้

- Virological breakthrough: มีการเพิ่มขึ้นของ HBV DNA มากกว่า 1 log₁₀ จากระดับ nadir หลังจากได้ virological response หรือขณะที่กำลังได้รับยารักษาอยู่
- Viral rebound: มีการเพิ่มขึ้นของ HBV DNA มากกว่า 20,000 IU/mL หรือมากกว่าระดับก่อนการรักษาหลังจากได้ virological response หรือขณะที่กำลังได้รับยารักษาอยู่
- Primary drug failure: มีการลดลงของ HBV DNA น้อยกว่า 1 log₁₀ ภายใน 3 เดือนหลังจากเริ่มการรักษา
- Biochemical breakthrough: มีการเพิ่มขึ้นของ ALT ขณะที่ได้รับการรักษาหลังจากที่เคยลดลงเป็นปกติ

2. ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่ยังไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน (Naïve cases)

กฎเกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

ผู้ป่วยที่เป็น HIV/ HBV coinfection

ขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

เนื่องจากยังไม่มีข้อมูล เกี่ยวกับการศึกษาความชุกของ mutation ใน RNase H Domain ของไวรัสตับอักเสบบีมาก่อน ดังนั้นรูปแบบการศึกษาจึงเป็นแบบ Pilot study จำนวนกลุ่มประชากร (sample size) จะรวบรวมจากผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การศึกษาดังกล่าว ระหว่างช่วงวันที่ 1 กรกฎาคม 2552 จนถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2552 คาดว่าน่าจะมีผู้ป่วยอย่างน้อย 100 คน

การสังเกตและการวัด (Observation and measurement)

ตัวแปรอิสระคือ ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่ไม่เคยได้รับการรักษาและผู้ป่วยที่เกิดภาวะดื้อยา ตัวแปรตามคือ HBV genotypes, Resistance genotypes, RNase H domain sequence เก็บข้อมูลและวัดผลโดยใช้แบบบันทึกข้อมูล และบันทึก nucleotide และ amino acid sequences

ขั้นตอนดำเนินการวิจัย

- เริ่มทำการศึกษาวิจัยหลังจากได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย
 - ชี้แจงวัตถุประสงค์ ขั้นตอนการวิจัย และประโยชน์ที่ผู้ป่วยอาจจะได้รับ
 - ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่สงสัยว่ามีภาวะดื้อยาในกลุ่ม NA ที่เข้าเกณฑ์การศึกษาวิจัยและผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษา จะได้รับการเจาะเลือด 10 CC และปั่นแยกเพื่อเก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20 °C
 - นำซีรัมที่ได้ไปตรวจยืนยันว่ามีภาวะดื้อยาจริงด้วยวิธี Direct sequencing HBV polymerase gene ตามตำแหน่งดังภาพที่ 2 โดยใช้ Polymerase Chain Reaction (PCR) technique ตามการศึกษาของ Sa-nguanmoo และคณะ [17] นอกจากนี้ยังตรวจเพิ่มเติมเกี่ยวกับ HBV genotypes, RNase H Domain sequence ด้วยวิธี PCR
 - นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ดื้อยาและกลุ่มปกติ กับรหัสที่เป็นมาตรฐาน (reference sequence) อ้างอิงมาจากฐานข้อมูล (NCBI databases) หมายเลขแอกเซสชัน (accession no.) NC_003977 ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ในแต่ละตำแหน่ง
 - ซีรัมที่เหลือจะเก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 ปี และจะถูกทำลายทิ้งด้วยวิธีมาตรฐาน
- แผนงานการดำเนินงานการวิจัยได้แสดงไว้ในภาพที่ 7

3.3 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

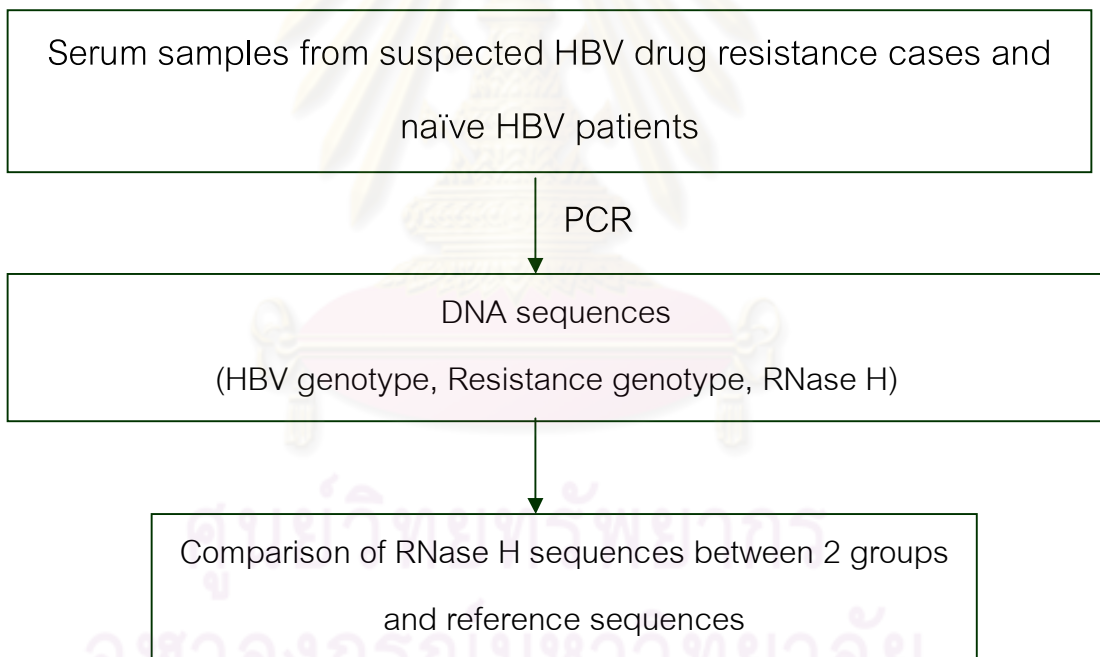
เก็บข้อมูลจากหน่วยระบบทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
ผู้เก็บข้อมูล ผู้ดำเนินการวิจัย และผู้บันทึกข้อมูลคือ ผู้ดำเนินการวิจัย

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ข้อมูลที่ได้เป็นเชิงคุณภาพ การรายงานผลเกี่ยวกับ HBV genotype, การดื้อยากลุ่ม NA และ ตำแหน่ง mutation ในส่วน RNase H Domain จะเป็นรูปแบบจำนวนและเปอร์เซ็นต์ ส่วนการหาความสัมพันธ์ของตำแหน่ง mutation กับการดื้อยาในแต่ละชนิด จะใช้วิธีทางสถิติแบบ Chi Square Test

3.5 ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations)

งานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ต่อการวางแผนการรักษาของผู้ป่วยต่อไปในภายภาคหน้า ผู้ป่วยให้ความร่วมมือเพียงการเจาะเลือด ไม่ต้องออกค่าใช้จ่ายใดๆในการตรวจการดื้อยา คาดว่าไม่น่าจะมีปัญหาทางด้านจริยธรรม



ภาพที่ 7 แผนงานการดำเนินงานการวิจัย

3.6 ข้อจำกัดทางการวิจัย (Limitation)

การวิจัยนี้ศึกษาเปรียบเทียบผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดการดื้อยากับผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษา โดยที่ผู้ป่วยก่อนการรักษาและเกิดการดื้อยาไม่ใช่คนคนเดียวกัน ดังนั้นจึงอาจมีความผันแปร

(variation) ของพันธุกรรมที่มีโอกาสเกิดได้เองมาเกี่ยวข้อง แล้วทำให้เกิดความแตกต่างในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอช (Ribonuclease H domain) โดยบังเอิญ ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา

3.7 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefit and Application)

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับการตรวจหาการดื้อยาโดยไม่เสียค่าใช้จ่ายใดๆ ถ้าผลการศึกษาออกมาว่ามีความสำคัญของ mutation ในส่วน RNase H Domain ในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มีการดื้อยา ก็จะเป็นการค้นพบความรู้ใหม่ขึ้นมา และถ้า mutation ในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอชนี้มีสัมพันธ์กับการดื้อยาตัวใดตัวหนึ่งขึ้นมา ก็อาจจะเปลี่ยนแปลงวิธีการตรวจการดื้อยาที่ทำอยู่ในปัจจุบัน อาจจะต้องตรวจ mutation ในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอชนี้เพิ่มเติม เพื่อยืนยันเรื่องการดื้อยา

3.8 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการแก้ไข (Obstacles)

การที่จะได้ผู้ป่วยเข้าร่วมในการศึกษานี้ จำเป็นต้องได้รับความร่วมมือจากแพทย์ท่านอื่นๆ เพื่อส่งต่อผู้ป่วยมาพบผู้ดำเนินการวิจัย อาจจะได้จำนวนผู้ป่วยน้อยกว่าที่กำหนดไว้ และเนื่องจากการดื้อยาในกลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ของแต่ละชนิดจะไม่เท่ากัน ยาบางชนิดเพิ่งจะเริ่มใช้ในการรักษา อาจจะไม่มียาผู้ป่วยดื้อยาครบทุกประเภท แนวทางการแก้ไขนั้น ต้องมีการประชาสัมพันธ์ที่ดี และอาจจะขอความร่วมมือจากแพทย์โรงพยาบาลอื่นๆ ให้ส่งตัวอย่างเลือดมาให้

3.9 การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and time schedule)

| กิจกรรม | พ.ศ.2552 | | | | | | | | | | | | พ.ศ.2553 | | | | |
|--------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----------|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 1.ศึกษาเตรียมงาน | X | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | |
| 2.รวบรวมข้อมูล | | | | | | X | X | X | X | X | X | X | | | | | |
| 3.วิเคราะห์ข้อมูล | | | | | | | | | | | | X | X | X | | | |
| 4.รายงานผลการวิจัย | | | | | | | | | | | | | | | | X | X |

3.10 งบประมาณที่ใช้ในการวิจัย (Budget)

- แหล่งทุนวิจัยได้มาจากสมาคมระบบทางเดินอาหารแห่งประเทศไทย
- ผู้ป่วยทั้งหมดประมาณ 100 คน

- ค่าใช้จ่ายในการตรวจ HBV DNA ด้วยวิธี PCR ต่อผู้ป่วยหนึ่งราย ประมาณ 1,500 บาท
ค่าใช้จ่ายทั้งหมดประมาณ $100 \times 1,500 \sim 150,000$ บาท
- ค่าอุปกรณ์การเจาะเลือดประมาณ 1,200 บาท
- ค่าใช้จ่ายอุปกรณ์ในการเก็บเลือดประมาณ 900 บาท
- ค่าอุปกรณ์เอกสารสำนักงานประมาณ 1,000 บาท

รวมค่าใช้จ่ายทั้งหมดประมาณ 153,100 บาท

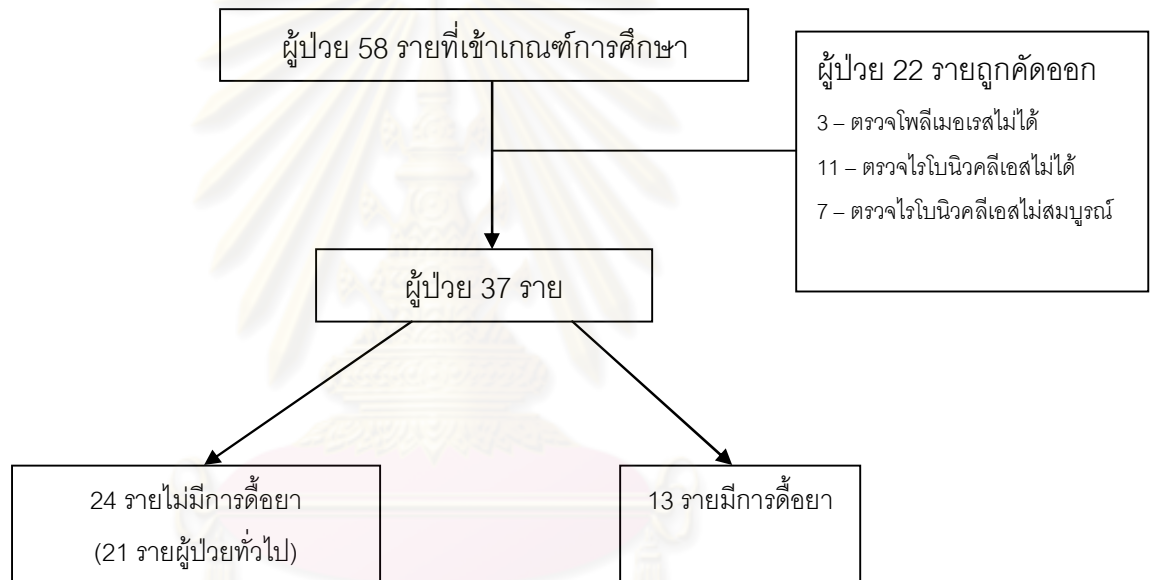


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ผู้ป่วยจำนวน 58 รายที่เข้าเกณฑ์คัดเลือกการศึกษา โดยตัดผู้ป่วยจำนวนทั้งหมด 22 ราย ออกไปเนื่องจาก 3 รายไม่สามารถตรวจโพลีเมอเรส (HBV polymerase), 11 รายไม่สามารถตรวจโรโบนิวคลีเอสโดเมน (RNase H domain) และ 7 รายตรวจโรโบนิวคลีเอสได้ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงมีผู้ป่วยทั้งสิ้น 34 รายที่สามารถวิเคราะห์ผลการศึกษาในครั้งนี้ ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 สรุปจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการ

ผู้ป่วย 21 ราย (ร้อยละ 56.8) ที่อยู่ในกลุ่มไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป (Naïve group) และผู้ป่วย 13 ราย (ร้อยละ 35.1) ที่ตรวจพบยืนยันว่ามีการดื้อยาจริง (NA drug resistance group) ในจำนวนนี้มีผู้ป่วย 3 ราย (ร้อยละ 8.1) ที่ตรวจไม่พบการดื้อยาแต่เคยได้รับการรักษามาก่อนจึงตัดออกไปจากการวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างผู้ป่วย 2 กลุ่ม ผู้ป่วยทั้งหมดแบ่งเป็นเพศชาย 26 รายและเพศหญิง 11 ราย อายุเฉลี่ยคือ 48.95 ± 14.68 ปี (24-75 ปี) พบเป็นจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบี (HBV genotype) ดังนี้ จีโนไทป์ 1 (B2 genotype) 11 รายและ จีโนไทป์ 2 (C1 genotype) 26 ราย ค่ามัธยฐานและค่าเฉลี่ยของปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (median HBV DNA level and mean HBV DNA level) เท่ากับ 5,494,080 copies/mL และ 6.33 logC/mL ตามลำดับ ค่าเฉลี่ย ALT คือ 190.06

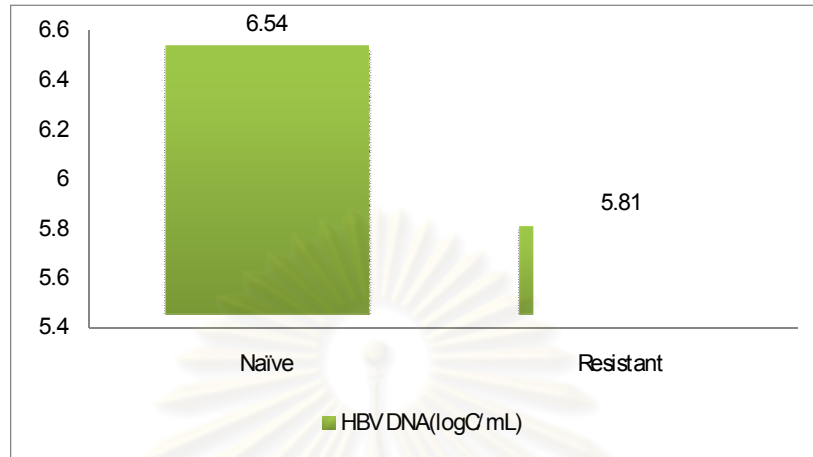
IU/mL สามารถตามผล HBeAg ก่อนการรักษาได้ทั้งหมด 35 รายจากผู้ป่วยทั้งหมด 37 ราย ในจำนวนนี้ให้ผลบวก 21 ใน 32 ราย (ร้อยละ 65.6) และผลลบ 11 ใน 32 ราย (ร้อยละ 34.4) ภาพที่ 9 และ 10 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณไวรัสตับอักเสบบีในเลือด (HBV DNA) และระดับ ALT ระหว่างผู้ป่วยทั่วไปและผู้ป่วยที่ดื้อยา

ในกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบการดื้อยา พบว่าดื้อยาลามิวูดีน (Lamivudine) 11 ราย (ร้อยละ 84.6) ดื้อยาอดีโฟเวียร์ (Adefovir) 1 ราย (ร้อยละ 7.7) และดื้อยาเทลบิวูดีน (Telbivudine) 1 ราย (ร้อยละ 7.7) ในการศึกษาไม่พบผู้ป่วยที่ดื้อยาเอนตีคาเวียร์ (Entecavir) และ ทีโนโฟเวียร์ (Tenofovir) ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย (Demographic data) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 และไม่พบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ป่วยทั่วไปและกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบการดื้อยา

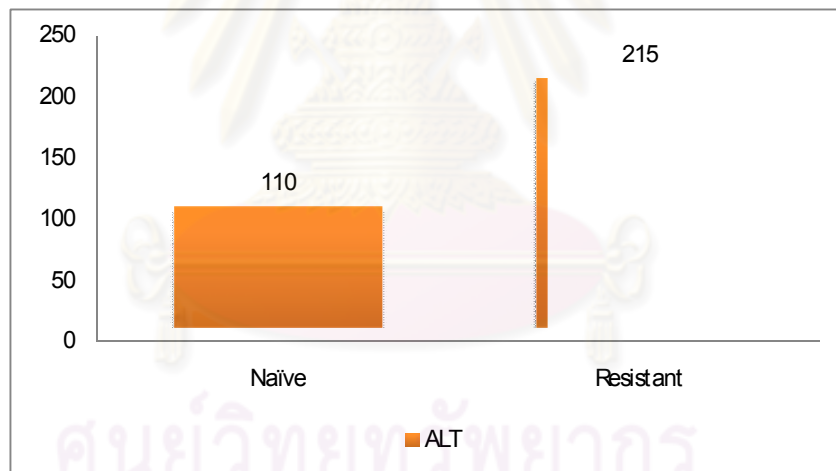
ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

| | ผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษา (Naïve group) | ผู้ป่วยที่ตรวจพบการดื้อยา (NA drug mutation) | P-value |
|---|---|---|---------|
| จำนวน (ร้อยละ) | 21(61.8) | 13(38.2) | |
| อายุ* (ปี) | 45.8 (SD 13.7) | 52.5 (SD 15.2) | 0.19 |
| เพศ | | | 0.36 |
| ชาย (ร้อยละ) | 13(56.5) | 10(43.5) | |
| หญิง (ร้อยละ) | 8(72.7) | 3(27.3) | |
| จีโนไทป์ไวรัสตับอักเสบบี HBV genotypes | | | 0.36 |
| B2 (ร้อยละ) | 5(50) | 5(50) | |
| C1 (ร้อยละ) | 16(66.7) | 8(33.3) | |
| ปริมาณไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA)* | | | |
| C/mL | 15,200,000 | 10,100,000 | 0.50 |
| logC/mL | 6.54 | 5.81 | 0.14 |
| สถานภาพ HBeAg | | | 0.10 |
| ผลลบ (%) | 9(81.8) | 2(18.2) | |
| ผลบวก (%) | 11(52.4) | 10(47.6) | |
| ค่าเอนไซม์ตับ (ALT level, IU/L)* | 110.2 (SD 150.2) | 215.2 (SD 496.1) | 0.42 |

*ค่าเฉลี่ย (mean value), SD - ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 9 ปริมาณไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA) ระหว่างผู้ป่วยทั่วไป (Naïve) กับผู้ป่วยที่ดื้อยา (Resistant)



ภาพที่ 10 ระดับ ALT ระหว่างผู้ป่วยทั่วไป (Naïve) กับผู้ป่วยที่ดื้อยา (Resistant)

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเรียงลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) 153 ตัวในส่วนไรโบนิวคลีโอไทด์ระหว่างลำดับของกรดอะมิโนมาตรฐาน (reference sequence) สำหรับไวรัสตับอักเสบบีจีโนไทป์และซีกับลำดับของกรดอะมิโนจากกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 2 พบว่ามีความผันแปรของลำดับกรดอะมิโน (polymorphism) ใกล้เคียงกันระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับของกรดอะมิโน 21 ตำแหน่ง (ร้อยละ 13.7) ในกลุ่มผู้ป่วยทั่วไปและมีการเปลี่ยนแปลง 15 ตำแหน่งในกลุ่มผู้ป่วยที่ดื้อยา (ร้อยละ 9.8) และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนในส่วนโบริบนิวคลีโอไซด์โดเมนผู้ป่วยที่ไม่เคย
รับการรักษากับผู้ป่วยที่ตรวจพบการดื้อยา

| ตำแหน่งของ กรดอะมิโน ในสายโบริบ นิวคลีโอไซด์ เลข | ลำดับ กรดอะมิโน มาตรฐาน (Reference sequence) | ผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษา (Naïve group) | | ผู้ป่วยที่ตรวจพบการดื้อยา (NA Drug resistance group) | | P-value |
|--|--|---|--------|---|--------|---------|
| | | กรดอะมิโนที่มาแทนที่ (Substitutions) | ร้อยละ | กรดอะมิโนที่มาแทนที่ (Substitutions) | ร้อยละ | |
| 1 | R | - | - | L(1) | 7.7 | 0.20 |
| 2 | S | P(6) | 28.6 | P(2) | 15.4 | 0.38 |
| 12 | T | - | - | P(1) | 7.7 | 0.20 |
| 19 | A | V(1) | 4.8 | - | - | 0.43 |
| 20 | I | M(2) | 9.5 | - | - | 0.25 |
| 23 | R | Q(24) | 100 | Q(13) | 100 | N/A |
| 30 | V | L(1), A(1) | 9.5 | - | - | 0.25 |
| 31 | A | S(5) | 23.8 | S(5) | 38.5 | 0.36 |
| 38 | A | E(1) | 4.8 | - | - | 0.43 |
| 50 | S | - | - | T(1) | 7.7 | 0.20 |
| 53 | K | R(1) | 4.8 | N(1) | 7.7 | 0.72 |
| 55 | I | X(1) | 4.8 | - | - | 0.43 |
| 113 | H | H(1) | 4.8 | - | - | 0.43 |
| 115 | P | L(4) | 19 | E(1),L(1),V(2),W(1) | 38.5 | 0.43 |
| 116 | F | Y(5) | 23.8 | Y(5) | 38.5 | 0.36 |
| 117 | R | - | - | Q(1) | 7.7 | 0.20 |
| 122 | R | A(1) | 4.8 | - | - | 0.43 |
| 124 | S | F(1) | 4.8 | - | - | 0.43 |
| 125 | L | I(1) | 4.8 | - | - | 0.43 |
| 128 | V | D(5) | 23.8 | D(4) | 30.7 | 0.66 |
| 134 | S | F(1) | 4.8 | F(1) | 7.7 | 0.72 |
| 135 | H | - | - | R(1) | 7.7 | 0.20 |
| 136 | L | P(3) | 14.3 | - | - | 0.15 |
| 138 | D | V(1) | 4.8 | A(1) | 7.7 | 0.72 |
| 147 | H | Q(1) | 4.8 | - | - | 0.43 |
| 151 | R | K(5) | 23.8 | K(2) | 15.4 | 0.56 |

N/A – ไม่สามารถคำนวณได้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

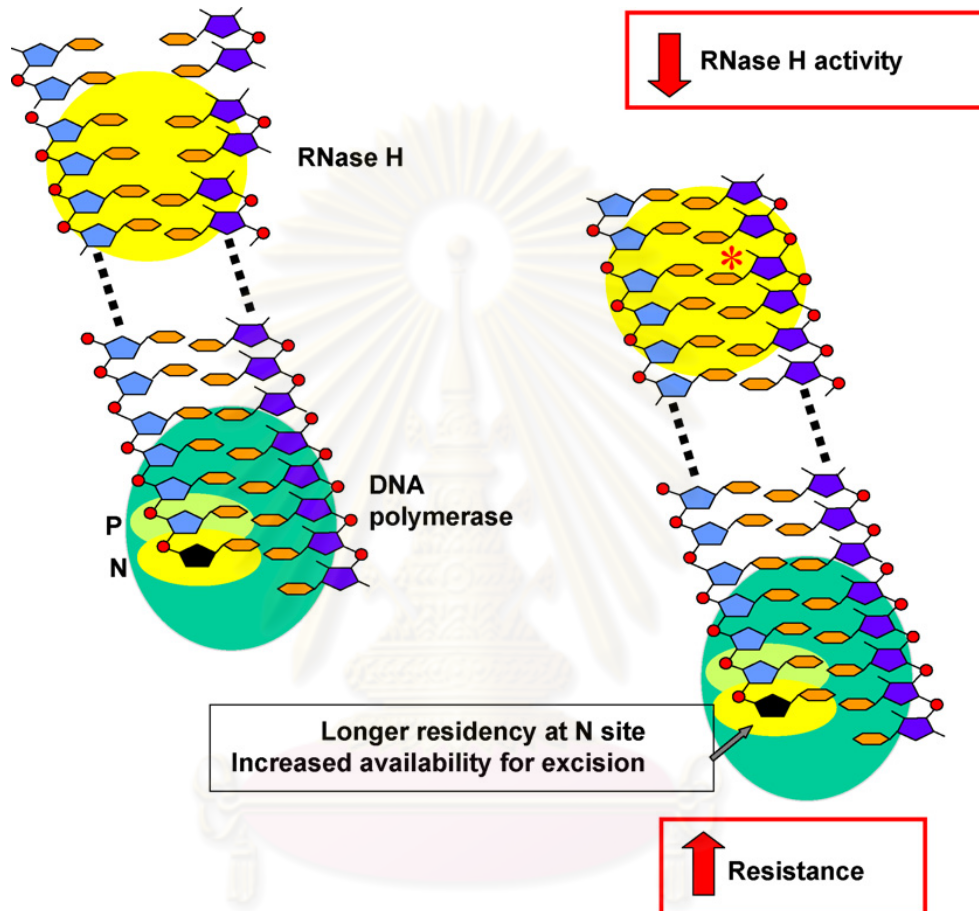
อภิปรายผลการวิจัย

ยาที่ใช้รักษาไวรัสตับอักเสบบีแบ่งเป็น 2 ชนิด คือยากลุ่มอินเตอร์เฟอรอนและยากลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ ซึ่งข้อดีของยาประเภทหลังคือบริหารง่ายและไม่ค่อยมีผลข้างเคียงใดๆ แต่การใช้ยากลุ่มนี้ไปนานๆ จะพบปัญหาเรื่องการดื้อยาบางตัวในกลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์มากขึ้นเรื่อยๆ แล้วเนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์โพลีเมอเรสของไวรัสตับอักเสบบีและเอนไซม์รีเวิร์สทรานสคริปเทสของไวรัสเอชไอวีมีความคล้ายคลึงกัน และมีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวางในส่วนของนิวคลีโอไซด์เอสเตอเรสของไวรัสเอชไอวีในด้านต่างๆ จากการศึกษาของ Roquebert และคณะ พบว่าในผู้ป่วยเอชไอวีที่มีภาวะดื้อยาจะมีเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมในบางตำแหน่งของส่วนไรโบนิวคลีโอไซด์เอสเตอเรสโดเมนของไวรัสเอชไอวีในด้านต่างๆ จากการศึกษาของ Roquebert และคณะ พบว่าในผู้ป่วยเอชไอวีที่มีภาวะดื้อยาจะมีเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมในบางตำแหน่งของส่วนไรโบนิวคลีโอไซด์เอสเตอเรสโดเมนบ่อยขึ้นกว่าผู้ป่วยที่ยังไม่ได้รับการและยังสัมพันธ์กับการดื้อยาไซโดวูดีนและสตาวูดีน (Zidovudine and Stavudine) ซึ่งสมมุติฐานของกลไกที่ทำให้เกิดการดื้อยากลุ่ม NRTI (NRTI resistance) ในผู้ป่วยเอชไอวีที่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนไรโบนิวคลีโอไซด์เอสเตอเรสนั้น อาจเกิดจากเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของไรโบนิวคลีโอไซด์เอสเตอเรสจะทำให้การทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไซด์เอสเตอเรสลดลง ทำให้การสลายสาย RNA ออกจาก DNA-RNA complex ช้าลง จึงทำให้ยานิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไซด์ที่ต่อเข้ากับสาย DNA แล้วนั้น มีโอกาสหลุดออกจากสาย DNA เนื่องจากเวลาเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 11 [18] ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่พยายามศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่จะมีการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมในบางตำแหน่งของส่วนไรโบนิวคลีโอไซด์เอสเตอเรสโดเมนเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั่วไปกับผู้ป่วยที่ดื้อยา ซึ่งข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มนั้น มีความคล้ายคลึงกันและไม่พบการเปลี่ยนแปลงในส่วนของไรโบนิวคลีโอไซด์เอสเตอเรสโดเมนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ยาที่พบว่ามี การดื้อยาเป็นส่วนใหญ่ในการศึกษานี้ยามิวิดูดีน (Lamivudine) คิดเป็น 11 ราย และส่วนน้อยที่ดื้อยาดีโฟเวียร์ (Adefovir) และยาเทลบิวูดีน (Telbivudine) ในการศึกษานี้ไม่พบว่ามี การดื้อยาเอนตีคาเวียร์ (entecavir) และยาทีโนโฟเวียร์ (tenofovir) เนื่องจากโอกาสการดื้อยาทั้ง 2 นั้นมี น้อย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาต่างๆ [10] และสาเหตุประการหนึ่งที่พบว่ามี การดื้อยามิวิดูดีน (Lamivudine) มากที่สุด เพราะเป็นยาที่นิยมใช้มากที่สุดและมีราคาต่ำกว่ายาตัวอื่นๆ ส่วนยาเทลบิวู ดีน (Telbivudine) แม้ว่าจะเป็นยาที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมี(6)จัดอยู่กลุ่มเดียวกับยามิวิดูดีน

(Lamivudine) แต่เนื่องจากเป็นยาตัวใหม่เพิ่งมีการอนุญาตให้ใช้ในโรงพยาบาลที่ทำการรักษาเมื่อปี พ.ศ. 2552 และยังมีการใช้ในปริมาณน้อย จึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่พบผู้ป่วยดื้อยาเทลบิวดีน (Telbivudine) น้อยกว่าความเป็นจริง



ภาพที่ 11 กลไกการดื้อยาของการกลายพันธุ์ในส่วนของไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมน [18]

ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลที่สนับสนุนว่าการกลายพันธุ์ในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชจะสัมพันธ์กับการดื้อยานิวคลีโอไทด์หรือยานิวคลีโอไซด์ เช่นการศึกษาในผู้ป่วยเฮชไอวีดังกล่าวไปแล้วข้างต้น ทั้งนี้ อาจจะอธิบายจากจำนวนผู้ป่วยที่ดื้อยานั้นมีน้อย, มีความหลากหลายในชนิดของยาที่เกิดการดื้อนั้นน้อย ส่วนมากเป็นยาลามิวดีน (Lamivudine) ดังนั้นจึงไม่สามารถบอกได้ว่าการกลายพันธุ์ในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชจะไม่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยานิวคลีโอไทด์หรือยานิวคลีโอไซด์ตัวอื่นๆ และส่วนของไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมนเป็นส่วนที่มีความคงตัว (conserved region) [7] การกลายพันธุ์อาจทำให้เกิดสถานะที่ไม่เหมาะสมในการดำรงชีวิตต่อไป ดังนั้นถ้ามีการกลายพันธุ์ในส่วนไรโบนิวคลีเอสเอสเอชโดเมน อาจทำให้ไวรัสดับอีกเสบปีดำรงชีวิตต่อไปไม่ได้ จึงทำให้ตรวจไม่พบ

ข้อจำกัดอื่นๆ ในการศึกษานี้ คือ การเปรียบเทียบการกลายพันทางพันธุกรรม ควรจะใช้ตัวอย่างเลือดจากคนๆเดียวกัน โดยเปรียบเทียบตัวอย่างระหว่างก่อนและหลังการรักษา ซึ่งเป็นไปได้ยากในการศึกษาช่วงสั้นๆ อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบรหัสพันธุกรรมมาตรฐานของจีโนมไทยต่างๆ เช่นการศึกษานี้ ก็เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับ [11]

ยังไม่ทราบสาเหตุที่ไม่สามารถตรวจส่วนโพลีเมอเรสและไรโบนิวคลีโอไทด์ในผู้ป่วยบางรายได้ โดยทั่วไปสาเหตุเกิดจากปริมาณไวรัสในตัวอย่างน้อย, การเก็บตัวอย่างไม่ถูกวิธี, เทคนิคการตรวจไม่ถูกวิธี แต่ไม่น่าจะเป็นคำอธิบายในการศึกษานี้ คงต้องอาศัยการศึกษาที่ตัวอย่างกลุ่มประชากรที่มากขึ้นและมีตัวอย่างที่ดื้อยานิวคลีโอไทด์หรือยานิวคลีโอไซด์ชนิดอื่นๆ จึงจะช่วยบอกถึงถึงความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุในส่วนไรโบนิวคลีโอไทด์และการดื้อยากลุ่มนิวคลีโอไทด์หรือยานิวคลีโอไซด์



ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยนี้แม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างในส่วน Ribonuclease H Domain ระหว่างผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีดื้อยาและผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป คงจะยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอนว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีดื้อยาและ mutation ในส่วน Ribonuclease H Domain จริง เนื่องจากขนาดตัวอย่างน้อยและไม่มีความหลากหลายของชนิดของยาที่ใช้รักษา คงต้องการศึกษาที่ขนาดตัวอย่างมากขึ้น จึงจะสรุปได้อย่างชัดเจน

ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี ที่เริ่มการรักษาด้วยยากลุ่มนิวคลีโอไทด์ หรือนิวคลีโอไซด์ ควรเก็บตัวอย่างเลือดไว้เป็นพื้นฐาน เพื่อเป็นประโยชน์ต่อตัวผู้ป่วยเองไปในอนาคต เมื่อจำเป็นต้องตรวจการดื้อยาด้วยวิธี Genotypic resistance จะได้มีค่าอ้างอิง แต่คงจะทำให้มีปัญหาในการจัดเก็บและดูแลรักษาตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- [1] Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997 Dec 11;337(24):1733-45.
- [2] Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology* 2008 Feb;134(2):405-15.
- [3] Bartholomeusz A, Tehan BG, Chalmers DK. Comparisons of the HBV and HIV polymerase, and antiviral resistance mutations. *Antivir Ther* 2004 Apr;9(2):149-60.
- [4] Schultz SJ, Champoux JJ. RNase H activity: structure, specificity, and function in reverse transcription. *Virus Res* 2008 Jun;134(1-2):86-103.
- [5] Roquebert B, Wirden M, Simon A, Deval J, Katlama C, Calvez V, et al. Relationship between mutations in HIV-1 RNase H domain and nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations in naïve and pre-treated HIV infected patients. *J Med Virol* 2007 Mar;79(3):207-11.
- [6] Ghany M, Liang TJ. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007 Apr;132(4):1574-85.
- [7] Potenza N, Salvatore V, Raimondo D, Falanga D, Nobile V, Peterson DL, et al. Optimized expression from a synthetic gene of an untagged RNase H domain of human hepatitis B virus polymerase which is enzymatically active. *Protein Expr Purif* 2007 Sep;55(1):93-9.
- [8] Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007 Jul;46(1):254-65.

- [9] Scherer LJ, Rossi JJ. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. **Nat Biotechnol** 2003 Dec;21(12):1457-65.
- [10] Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. **Hepatology** 2009 May;49(5 Suppl):S174-S184.
- [11] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. **Gastroenterology** 2009 Nov;137(5):1593-608.
- [12] Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. **Hepatology** 2007 Feb;45(2):507-39.
- [13] Liu J, Li YH, Xue CF, Ding J, Gong WD, Zhao Y, et al. Targeted ribonuclease can inhibit replication of hepatitis B virus. **World J Gastroenterol** 2003 Feb;9(2):295-9.
- [14] Cheng H, Zhang HZ, Shen WA, Liu YF, Ma FC. Expression of RNase H of human hepatitis B virus polymerase in Escherichia coli. **World J Gastroenterol** 2003 Mar;9(3):513-5.
- [15] Roquebert B, Wirden M, Simon A, Deval J, Katlama C, Calvez V, et al. Relationship between mutations in HIV-1 RNase H domain and nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations in naïve and pre-treated HIV infected patients. **J Med Virol** 2007 Mar;79(3):207-11.
- [16] Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. **Hepatology** 2007 Feb;45(2):507-39.
- [17] Sa-nguanmoo P, Thongmee C, Ratanakorn P, Pattanarangsarn R, Boonyarittichaijij R, Chodapisitkul S, et al. Prevalence, whole genome characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in captive orangutan and gibbon. **J Med Primatol** 2008 Dec;37(6):277-89.
- [18] Menendez-Arias L. Mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. **Virus Res** 2008 Jun;134(1-2):124-46.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก แบบบันทึกการศึกษา

เลขที่.....

แบบบันทึกข้อมูลส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วยเพศ 1.ชาย 2.หญิง

อายุ ปี

โรคประจำตัวที่มีได้แก่ (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)

- No underlying disease Current alcohol use
 Cirrhosis HCV
 Hepatocellular carcinoma (HCC) Others.....

ยาที่ใช้ในปัจจุบัน (ตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)

- None Lamivudine
 Adefovir Entecavir
 Telbivudine Tenofovir
 Others

ประเภทของผู้ป่วย

- 1.ผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน (Naïve cases)
 2.ผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีภาวะดื้อยา (Suspected drug resistance cases)

เกณฑ์การวินิจฉัยกรณีสงสัยผู้ป่วยมีภาวะดื้อยารักษาไวรัสตับอักเสบบี

- 1.ปริมาณเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA Viral Load) ลดลงน้อยกว่า 1 log₁₀ จากระดับก่อนการรักษาภายในช่วงเวลา 3 เดือน ในผู้ป่วยรายใหม่ que เริ่มการรักษา [Primary Drug Failure]
 2.ปริมาณเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA Viral Load) เพิ่มขึ้นมากกว่า 1 log₁₀ จากระดับที่เคยรักษาจนควบคุมได้ [Virological Breakthrough]
 3.ปริมาณเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA Viral Load) เพิ่มขึ้นมากกว่า 20,000 IU/mL หรือมากกว่าระดับก่อนเริ่มการรักษา [Viral Rebound]
 4.การเพิ่มขึ้นของ ALT ภายหลังจากที่ได้รับการรักษาจนระดับ ALT ลดลงเป็นปกติ [Biochemical Breakthrough]

ท่านกินยารักษาได้ครบถ้วนหรือไม่ (Good drug compliance)

1. ไม่ใช่

2. ใช่

ส่วนที่ 2 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

CBC: Hb Hct

WBC PMN % L % Eo%

Plt

LFT: Total bilirubinDirect bilirubin

AST ALT ALP

Albumin Globulin Total protein

PT INR

Viral hepatitis Markers

HBsAg: Negative Positive Unknown

HBeAg: Negative Positive Unknown

AntiHBc: Negative Positive Unknown

AntiHBe: Negative Positive Unknown

AntiHBs: Negative Positive Unknown

AntiHCV: Negative Positive Unknown

HBV DNA copies/mL

ผลการตรวจ HBV genotype

1.A 2.B 3.C 4.D

5.E 6.F 7.G 8.H

ผลการตรวจตำแหน่งที่มีการดื้อยา (มีได้มากกว่า 1 ข้อ)

None rtL180M

rtA181T rtA181V

rtS184G rtA194T

rtS202I rtM204I

rtM204V rtI233V

rtN236T rtM250V

ภาคผนวก ข ใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา

ข้อมูลสำหรับผู้ป่วยหรือผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ท่านได้รับเชิญเข้าร่วมโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบ ไรโบนิวคลีเอสเอชโดเมนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดการดื้อยากับกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป (Comparison of HBV Ribonuclease H Domain in Naïve and Drug Resistance Patients: A Pilot Study)

แพทย์ผู้ทำวิจัยชื่อ นพ.สุรัชย์ อมรสวัสดิ์วัฒนา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.นพ.ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์

หน่วยระบบทางเดินอาหาร ตึกประสิทธิ์-ตู้ พร้อมพันธ์ ชั้น 1 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โทรศัพท์ 02-2564356

เบอร์โทรศัพท์ที่ติดต่อได้ 24 ชั่วโมง โทร. 086-3216496

สำนักงานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ตึกอานันทมหิดล ชั้น 3 คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4493 ต่อ 14,15

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

การกลายพันธุ์ในส่วน ไรโบนิวคลีเอสเอชโดเมน (Ribonuclease H Domain) ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่เกิดการดื้อยากับผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่ยังไม่เคยได้รับการรักษา

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

ผู้เข้าร่วมการวิจัยจะได้รับการทบทวนประวัติการรักษาไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเข้าเกณฑ์การวิจัยและยินยอมเข้าร่วมโครงการ ท่านจะได้รับการเจาะเลือดปริมาณ 10 cc เพื่อนำไปสกัดสารพันธุกรรมไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA) หลังจากที่ได้สารพันธุกรรมแล้วนั้น จะนำไปตรวจไรโบนิวคลีเอสเอชโดเมน (Ribonuclease H domain), จีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบี (HBV genotype) และตำแหน่งการดื้อยา (Resistance genotype) ด้วยวิธี polymerase chain reaction โดยผู้เข้าร่วมโครงการไม่เสียค่าใช้จ่ายใดๆและไม่จำเป็นต้องมาติดตามตรวจซ้ำอีกครั้ง ตัวอย่างเลือดที่เหลือจะเก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 ปีและจะถูกทำลายทิ้งด้วยวิธีมาตรฐาน คาดว่าจะมีผู้เข้าร่วมโครงการประมาณ 100 คน

ความเสี่ยงที่อาจจะได้รับ

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ซ้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือ
หน้ามืดและโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

การเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จะได้รับการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งมีความยุ่งยากในการ
ตรวจ และสามารถตรวจได้แค่บางสถานที่ นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายสูง โดยผู้เข้าร่วมการวิจัยไม่ต้อง
เสียค่าใช้จ่ายใดๆ ข้อมูลที่ได้ อาจจะช่วยในการพิจารณาเรื่องการเลือกการรักษา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อ
การศึกษาวินิจฉัย และวางแผนการวินิจฉัยภาวะไวรัสตับอักเสบบีต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ผู้เข้าร่วม
โครงการยังจะได้รับค่าตอบแทนรายละ 200 บาท

คำชี้แจงเกี่ยวกับสิทธิผู้ป่วย

การเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษา
แล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษา
โรคของท่านแต่อย่างใด

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่ เนื่องจาก
มีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษากับแพทย์ผู้ให้
การรักษาท่านก่อนตัดสินใจ

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่ การเปิดเผยตัวของท่าน จะได้รับการปกปิด และจะไม่เปิดเผยแก่
สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ
โดยจะชี้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมในโครงการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบ ไรโบนิวคลีเอสเอชโดเมนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่
เกิดการติดต่อกับกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป (Comparison of HBV Ribonuclease H Domain
in Naive and Drug Resistance Patients: A Pilot Study)

วันที่ทำคำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว..... รายละเอียดจาก
เอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่..... และ
ข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาใบแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่
พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการ
วิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับ การอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย
วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย หรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้น
จากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการ
ซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบัง
ซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ผู้เข้าร่วมวิจัยจะ
ได้รับการรักษาพยาบาลโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล
และการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับ
ต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อ
ได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการ
พิจารณาจริยธรรมการวิจัยหรือผู้ได้รับอำนาจมอบหมายให้เข้ามาตรวจสอบและประมวลข้อมูลของ
ผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดย
การตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทาง
การแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบ หรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้านเภสัชภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในใบยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม
(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นพ. สุรชัย อมรสวัสดิ์วัฒนา

วันเดือนปีเกิด 2 ธันวาคม 2520

ที่ทำงาน โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระรามที่ 4 แขวงลุมพินี เขตปทุมธานี กทม. 10330

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

| | |
|---|-----------|
| ระดับอุดมศึกษา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล | 2538-2545 |
| แพทย์ใช้ทุนโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จ.ปทุมธานี | 2545-2548 |
| แพทย์ประจำบ้านภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | 2548-2551 |
| แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาอายุรศาสตร์ระบบทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ | 2551-2553 |
| คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | |

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกสมาคมทางเดินอาหารแห่งประเทศไทย

ศูนย์วิทยพัชร์พยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย