ปริมาณดีเอ็นเอและซีซีซีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่มีแอนติบอดี้ต่อเอชบีคอร์แอนติเจนเป็นบวกและเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบ

นางสาวรุ่งฤดี ชัยธีรกิจ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INTRAHEPATIC HBV DNA AND COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA (CCCDNA) LEVELS OF PATIENTS WITH POSITIVE ANTI-HBC ANTIBODY AND NEGATIVE HBSAG

-

Miss Roongruedee Chaiteerakij

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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ปริมาณดีเอ็นเอและซีซีซีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยที่มีแอนติบอดี้ต่อเอชบีคอร์แอนติเจนเป็นบวกและเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบ
โดย	นางสาว รุ่งฤดี ชัยธีรกิจ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธนินทร์ อัศววิเชียรจินดา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ชุติมา ประมูลสินทรัพย์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์ชัย ชาลาประวรรตน์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รุ่งฤดี ชัยธีรกิจ : ปริมาณดีเอ็นเอและซีซีซีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยที่มีแอนติบอดี้ต่อเอชบีคอร์แอนติเจนเป็นบวกและเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบ (INTRAHEPATIC HBV DNA AND COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA (CCCDNA) LEVELS OF PATIENTS WITH POSITIVE ANTI-HBC ANTIBODY AND NEGATIVE HBSAG) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. นพ. ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ. 58 หน้า.

ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย ซีซีซีดีเอ็นเอเป็นส่วนที่มีบทบาทสำคัญของไวรัสตับอักเสบบีที่ทำให้เกิดการคงอยู่ของเชื้อไวรัสในตับเป็นเวลานาน และทำให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางการปลูกถ่ายอวัยวะ รวมถึงทำให้เกิดตับอักเสบกำเริบหลังจากได้ยาเคมีบำบัด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย เพื่อศึกษาหาซีซีซีดีเอ็นเอในเนื้อเยื่อตับของผู้ที่มีเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบและมีแอนติเอชบีคอร์แอนติบอดี้เป็นบวก

ระเบียบวิธีการวิจัย การศึกษานี้ทำการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซีซีซีดีเอ็นเอในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วย 35 รายที่มีเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบและมีแอนติเอชบีคอร์แอนติบอดี้เป็นบวก โดยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์และเซมิเนสพีซีอาร์

ผลการวิจัย ผู้ป่วยที่มีเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบและมีแอนติเอชบีคอร์แอนติบอดี้เป็นบวกจำนวน 4 รายพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเนื้อเยื่อตับโดยการตรวจด้วยวิธีเซมิเนสพีซีอาร์ ส่วนซีซีซีดีเอ็นเอนั้นตรวจไม่พบในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยที่ทำการศึกษาทุกราย

สรุป ในกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาซึ่งเป็นชาวเอเชียนี้ มีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเนื้อเยื่อตับในปริมาณน้อยมาก ส่วนซีซีซีดีเอ็นเอนั้นตรวจไม่พบในผู้ป่วยที่มีแอนติเอชบีคอร์แอนติบอดี้เป็นบวกทุกรายแม้ว่าจะทำการตรวจด้วยวิธีเซมิเนสพีซีอาร์ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต	รุ่งฤดี ชัยธีรกิจ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	
ปีการศึกษา	2550	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

4974773630 MAJOR MEDICINE

KEYWORD: HEPATITIS B VIRUS DNA/COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA

ROONGRUEDEE CHAITEERAKIJ: INTRAHEPATIC HBV DNA AND COVALENTLY CLOSED CIRCULAR DNA (CCCDNA) LEVELS OF PATIENTS WITH POSITIVE ANTI-HBC ANTIBODY AND NEGATIVE HBSAG. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PIYAWAT KOMOLMIT, M.D., THESIS COADVISOR : PROF. YONG POOVARAWAN, M.D. 58 pp.

Background covalently closed circular DNA (cccDNA) is a unique episomal replicative intermediate molecule of hepatitis B virus (HBV) which plays a key role for viral persistence.

Objective To prove the evidence of cccDNA persistence in the liver tissue of patients with negative hepatitis B surface (HBs) antigen (HBsAg) and positive antibody to hepatitis core antigen (anti-HBc).

Methods Intrahepatic HBV DNA and cccDNA were detected by real-time and semi-nested PCR assays in the liver tissues of 35 patients who were negative for HBsAg and positive for anti-HBc with or without antibody to HBs.

Results Liver tissues HBV DNA was detected in 4 of 35 patients who had positive for anti-HBc antibody. None of cccDNA amplifications were found in all samples.

Conclusions In this study population, which is an Asian origin, very low level of HBV DNA was detected in a small percentage of the anti-HBc positive patients. Even using the highly sensitive semi-nested PCR assay, HBV cccDNA was undetectable in all anti-HBc positive patients either with or without HBs antibody.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department	Medicine	Student's signature	Roongruedee Chaiteerakij
Field of study	Medicine	Advisor's signature	P. Komolmit
Academic year	2007	Co-advisor's signature	Yong Poovarawan

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของ ผศ. นพ. ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์, ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการทำวิจัย รวมถึงแพทย์และเจ้าหน้าที่หน่วยโรคระบบทางเดินอาหารที่ช่วยเก็บรวบรวมข้อมูลผู้ป่วย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องวิจัยของหน่วยโรคระบบทางเดินอาหารที่ช่วยเก็บรักษาชิ้นเนื้อตับ

ขอขอบพระคุณผู้ป่วยที่ให้ความร่วมมืออย่างดี

สุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจที่สำคัญ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
คำย่อ..... ฏ
บทที่
1 บทนำ..... 1
ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย..... 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
ข้อตกลงเบื้องต้น..... 3
ข้อจำกัดของการวิจัย..... 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3
2 ทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
3 วิธีการดำเนินการ..... 8
รูปแบบการวิจัย (Research design)..... 8
ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)..... 8
เกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)..... 8
เกณฑ์การตัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)..... 9
การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)..... 9
วิธีการศึกษา (Intervention)..... 9
การรวบรวมข้อมูล (Data collection)..... 23
ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations)..... 23
ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)..... 23
ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefit and application)..... 24

บทที่ หน้า

อุปสรรคที่ผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดขึ้นในขณะดำเนินการวิจัย และมาตรการในการแก้ไข (Obstacle)..... 24

การบริหารการวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and time schedule)..... 24

งบประมาณรายจ่ายของโครงการวิจัย (Budget)..... 25

4 ผลการวิจัย..... 26

5 อภิปรายผลวิจัย..... 33

6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 35

รายการอ้างอิง..... 36

ภาคผนวก..... 39

ภาคผนวก ก ข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมการศึกษาและใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษา..... 40

ภาคผนวก ข แบบบันทึกผู้ป่วย..... 43

ภาคผนวก ค บัฟเฟอร์และสารละลาย..... 44

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดง forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในปฏิกริยาทั้งหมดในการศึกษา……..……..27

2 แสดง reaction mixture สำหรับ real-time PCR ของการเพิ่มสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง 2814 ถึง 3094……...28

3 แสดงรอบปฏิกิริยาสำหรับ real-time PCR ของการเพิ่มสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง 2814 ถึง 3094…….……..28

4 แสดง reaction mixture สำหรับ semi-nested PCR ในการตรวจหา HBV DNA……29

5 รอบปฏิกิริยาของ semi-nested PCR ในการตรวจหา HBV DNA……29

6 reaction mixture สำหรับ real-time PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง 1662 ถึง 1922……30

7 รอบปฏิกิริยาสำหรับ real-time PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง 1662 ถึง 1922……31

8 reaction mixture สำหรับ semi-nested PCR ในการตรวจหา cccDNA……..…31

9 รอบปฏิกิริยาของ semi-nested PCR ในการตรวจหา cccDNA……32

10 reaction mixture สำหรับ real-time PCR สำหรับการเพิ่มจำนวน *ß-GLOBIN* gene.....32

11 รอบปฏิกิริยาสำหรับ real-time PCR สำหรับการเพิ่มจำนวน *ß-GLOBIN* gene……33

12 แสดงผลการตรวจหา HBV DNA, cccDNA และ *ß-GLOBIN* ในกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาและประชากรในกลุ่มควบคุมบวก……39

13 ผลการตรวจพบสารพันธุกรรม HBV DNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่ง S gene, C gene และ X gene จากชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมบวกและผู้ป่วยกลุ่มที่ศึกษา……40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะโครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบี…….....……15	
2	แสดงลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี…….. 16	
3	แสดงขั้นตอนการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี…….. 17	
4	แสดงผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณตำแหน่ง 2814 ถึง 348 ของ S gene ในเนื้อเยื่อตับ……...40	
5	แสดงตัวอย่าง chromatogram ที่ได้จากการทำ sequencing ของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HBV DNA…….41	
6	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ 280 bp จากตัวอย่างที่ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ 2814 ถึง 348 ของ S gene กับ Hepatitis B virus จาก clone UD-585 S protein gene, partial cds……..……42	
7	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ 280 bp จากตัวอย่างที่ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ 2814 ถึง 348 ของ S gene กับ Hepatitis B virus จาก clone CH-391S protein gene, partial cds…….……43	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

Anti HBc	Hepatitis B core antibody
Anti HBs	Hepatitis B surface antibody
BLAST	basic local alignment search tool
Bp	base pair
cccDNA	Covalently closed circular DNA
DNA	deoxynucleic acid
HBeAg	Hepatitis B e antigen
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HBV DNA	Hepatitis B virus Dexoynucleic acid
nt	nucleotide
min	minute
PCR	polymerase chain reaction
rpm	round per minute
sec	second
UV	ultraviolet

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

ปัจจุบันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus, HBV) ยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ เนื่องจากมีผู้ติดเชื้อเรื้อรังทั่วโลกกว่า 400 ล้านคนหรือคิดเป็นประมาณร้อยละ 5 ของประชากรทั่วโลก สำหรับประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อเรื้อรังประมาณร้อยละ 6-7 ภาวะนี้นำไปสู่โรคแทรกซ้อนคือตับแข็งและมะเร็งตับ อันเป็นเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด ผลตรวจทาง serology ของผู้ป่วยเหล่านี้จะพบ hepatitis B surface antigen (HBsAg) ร่วมกับ antibody ต่อ hepatitis B core antigen (anti-HBc) เป็นบวก ส่วนผู้ที่เคยติดเชื้อแต่สามารถกำจัดเชื้อได้และมีภูมิต้านทานเกิดขึ้น จะตรวจพบ HBsAg เป็นลบและมี anti-HBc ร่วมกับ antibody ต่อ hepatitis B surface antigen (anti-HBs) เป็นบวก ในบางครั้งอาจตรวจพบแต่ anti-HBc โดยที่ตรวจไม่พบทั้ง HBsAg และ anti-HBs ซึ่งมักเกิดจากการมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้น (Occult HBV infection) คือมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีปริมาณน้อยๆ จนตรวจไม่พบ HBsAg แต่ยังสามารถตรวจพบ HBV DNA ในเลือดได้ ดังนั้นการตรวจพบ anti-HBc เป็นบวก จึงบ่งถึงสภาวะที่ยังคงมีการติดเชื้อหรือเคยมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาก่อน การศึกษาจากประเทศต่างๆทั่วโลก พบความชุกของผลตรวจทาง serology ที่มี anti-HBc เป็นบวกโดยมี HBsAg เป็นลบในประชากรได้ตั้งแต่ร้อยละ 0.6-19.3 เมื่อตรวจเพิ่มเติม จะพบ HBV DNA ในเลือดประมาณร้อยละ 0.3 ถึง 38 [1] แสดงว่าประชากรเหล่านี้ส่วนหนึ่งมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้น อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าส่วนใหญ่ของประชากรเหล่านี้ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในเลือด จากการศึกษาในประเทศไทยเมื่อปีพ.ศ. 2532 และ 2548 [2] พบว่าความชุกของผลตรวจทาง serology ดังกล่าวสูงถึงร้อยละ 45.2 และ 73 ตามลำดับ

ก่อนหน้านี้มีการศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายตับ พบว่าเกิดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีขึ้นใหม่ (*de novo* HBV infection) หลังได้รับตับจากผู้บริจาคอวัยวะที่มี HBsAg เป็นลบแต่มี anti-HBc เป็นบวก ถึงร้อยละ 78 [3] และในประเทศไทย กว่าร้อยละ 90 ของตับที่ทำการปลูกถ่ายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้มาจากผู้บริจาคอวัยวะที่มีผลตรวจทาง serology ดังกล่าว จึงเกิดคำถามตามมาว่า ตับจากผู้บริจาคอวัยวะที่มี anti-HBc เป็นบวก HBsAg เป็นลบ และตรวจไม่พบ HBV DNA ในเลือด จะมีเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอยู่ในชิ้นเนื้อตับหรือไม่ แต่เนื่องจากจำนวนผู้บริจาค

ตับในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์มีจำนวนค่อนข้างน้อย ประมาณ 20 รายต่อปี จึงไม่สามารถทำการศึกษาเรื่องดังกล่าวในกลุ่มผู้บริจาคอวัยวะ ภายในระยะเวลาอันจำกัดได้ จำเป็นต้องทำการศึกษาในประชากรกลุ่มอื่นแทน

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเกิดตับอักเสบกำเริบจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในผู้ป่วยที่มี HBsAg เป็นลบแต่มี anti-HBc เป็นบวก หลังได้รับยาเคมีบำบัด [4]

จากความรู้เกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในปัจจุบัน พบว่า HBV DNA ในรูปที่เรียกว่า covalently closed circular DNA (cccDNA) มีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินของโรคตับอักเสบแบบเรื้อรัง โดยทำให้เกิดการคงอยู่ของเชื้อไวรัสนี้ในเซลล์ตับเป็นระยะเวลานาน (viral persistence) [5] เนื่องจาก cccDNA ทำหน้าที่เป็นต้นแบบ (transcriptional templates) ของการสร้าง pregenomic RNA (pgRNA) ซึ่งใช้ในการสร้าง structural และ nonstructural proteins ต่างๆ ของไวรัสตัวใหม่ต่อไป [6] ความรู้เกี่ยวกับ cccDNA ในปัจจุบันยังมีค่อนข้างน้อย ก่อนหน้านี้เคยมีการศึกษาเพื่อหาปริมาณของ cccDNA ในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังทั้งในกลุ่มที่ได้และไม่ได้รับยาต้านไวรัส [7-9] ในผู้ป่วยมะเร็งตับ [10] รวมไปถึงการตรวจพบ HBV DNA ในชิ้นเนื้อตับของผู้ที่เคยมีการติดเชื้อและมีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นแล้ว [11] แต่การศึกษาเพื่อหาปริมาณ cccDNA ในชิ้นเนื้อตับของผู้ที่มี anti-HBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบนั้นยังมีอยู่น้อยมาก

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อหาและวัดปริมาณของ HBV DNA และ cccDNA ในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่มีผลตรวจทาง serology ดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหา HBV DNA และ cccDNA ในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่มี anti-HBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบ
2. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ cccDNA ในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่มี anti-HBc เป็นบวก HBsAg เป็นลบและ anti-HBs เป็นบวก กับผู้ป่วยที่มี anti-HBc เป็นบวก HBsAg เป็นลบและ anti-HBs เป็นลบ

ข้อตกลงเบื้องต้น

เนื่องจากไม่มีข้อมูลว่าระดับปริมาณ HBV DNA, cccDNA ในตับหรือระดับ HBV DNA ในเลือดมีการเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาของวัน จึงกำหนดให้สามารถเจาะตรวจเวลาใดก็ได้ โดยจะทำการเจาะเลือดเพื่อทำการตรวจหาปริมาณ HBV DNA ภายในวันเดียวกับที่ทำการเจาะตับ

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากการสำรวจในประชากรไทยที่มี anti-HBc เป็นบวก HBsAg เป็นลบ และ anti-HBs เป็นลบในเลือด มีความชุกเพียงร้อยละ 11 และมีผู้ป่วยได้รับการเจาะตับเพื่อทำการวินิจฉัยโรคในภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีละประมาณ 50-80 ราย ทำให้อาจได้กลุ่มตัวอย่างที่มีผล anti-HBs เป็นลบ ไม่ครบตามจำนวนที่กำหนดไว้

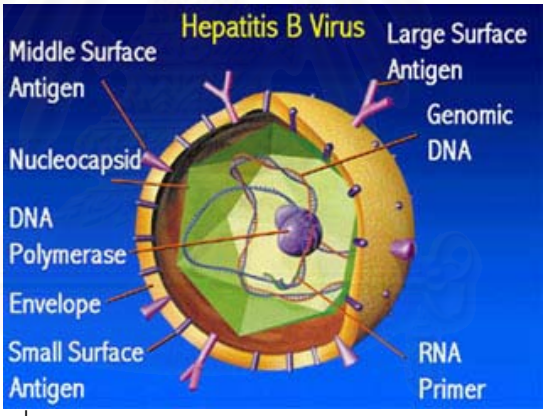
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบระดับปริมาณของ HBV DNA และ cccDNA ในเนื้อเยื่อตับของผู้ที่มี anti-HBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบ
2. ข้อมูลจากการศึกษานี้จะเป็นองค์ความรู้ในแนวลึกและเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นซึ่งจะนำไปใช้ในการศึกษาในกลุ่มผู้บริจาคอวัยวะหรือผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายตับต่อไป ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากเพื่อหาแนวทางและวิธีในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีผ่านทางการปลูกถ่ายอวัยวะในอนาคต
3. มีผลงานวิจัยที่มีคุณภาพเพื่อนำเสนอผลงานในการประชุมระดับชาติหรือนานาชาติและตีพิมพ์วารสารทางการแพทย์ระดับชาติหรือนานาชาติได้
4. สร้างความเป็นเลิศในทางวิชาการด้านไวรัสตับอักเสบให้ประเทศไทยในระดับนานาชาติ โดยเฉพาะการศึกษาแนวลึกทางด้านไวรัสอณูชีวโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบี

บทที่ 2

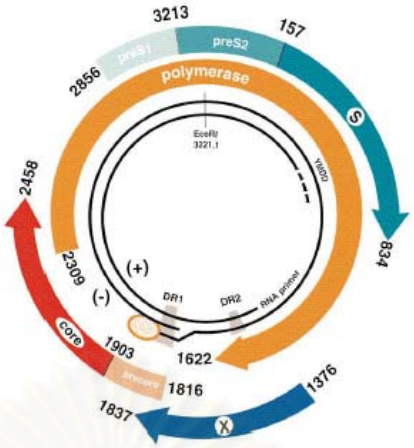
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ไวรัสตับอักเสบบี เป็นไวรัสในตระกูล *Hepadnaviridae* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 42-47 นาโนเมตร อนุภาคสมบูรณ์ (virion) ของไวรัสที่เรียกว่า Dane particle ประกอบโครงสร้างที่เป็นเปลือกหุ้ม 2 ชั้น เปลือกชั้นนอกเรียก envelope เป็นชั้นไขมันสองชั้นที่มี glycoprotein แทรกอยู่บนผิว glycoprotein เหล่านี้คือส่วนที่เรียกว่า hepatitis B surface antigen (HBsAg) ซึ่งเป็นสาย polypeptide ที่มีขนาดความยาวแตกต่างกันอยู่ 3 ขนาดได้แก่ small, middle และ large hepatitis B surface protein ส่วนเปลือกชั้นในคือ nucleocapsid หรือ core ภายในประกอบด้วย genome ของไวรัสซึ่งอยู่ในรูป partially double-stranded relaxed circular DNA จับอยู่กับเอนไซม์ DNA polymerase (ภาพที่ 1) โดย DNA สายลบจะมีความยาวประมาณ 3.2 กิโลเบส ส่วน DNA สายบวกจะมีขนาดความยาวไม่แน่นอนแตกต่างกันไปในไวรัสแต่ละตัว



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบี

DNA สายลบประกอบด้วย 4 open reading frame (ORF) ได้แก่ S, C, X และ P ซึ่งอยู่ซ้อนกันบางส่วน (ภาพที่ 2) ส่วน DNA สายบวกจะไม่มี ORF(12) S-ORF ประกอบด้วย S gene, PreS1 และ PreS2 region ทำหน้าที่สร้าง surface protein (HBsAg) P-ORF ใช้ในการสร้าง DNA polymerase/reverse transcriptase enzyme ส่วน C-ORF ทำหน้าที่สร้าง core protein (HBc Ag) และ precore protein โดย core protein จะรวมตัวกับ HBV DNA กลายเป็น nucleocapsid เพื่อป้องกันไม่ให้ DNA ของไวรัสถูกทำลายด้วยเอนไซม์ต่างๆ จากภายนอก ส่วน precore protein จะถูกย่อยและหลั่งออกจากเซลล์ตับในรูปที่เรียกว่า hepatitis B e antigen (HBeAg) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญทางคลินิกที่แสดงถึงการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส (active viral replication marker)

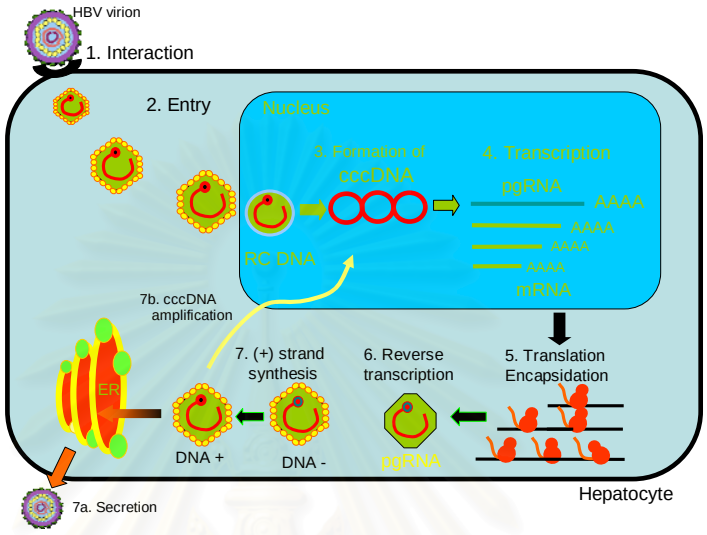


ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

ส่วนสุดท้ายคือ X-ORF ใช้ในการสร้าง X protein มีหน้าที่หลายอย่าง ที่สำคัญคือเป็น transcriptional transactivator และอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งตับ (hepatic carcinogenesis) [10]

เมื่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเข้าสู่ร่างกาย จะมีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน (ภาพที่ 3) โดยเริ่มต้นจากการที่อนุภาคไวรัสส่วนที่เป็น nucleocapsid เข้าสู่เซลล์ตับโดยอาศัย receptor ที่อยู่บนผิวไวรัส จากนั้น DNA ซึ่งอยู่ในรูป relax circular DNA จะเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ตับ แล้วทำการซ่อมแซม DNA สายบวกให้มีความยาวครบเต็มสายโดยอาศัยเอนไซม์ polymerase ของเซลล์ตับ ทำให้ได้ DNA สายคู่แบบสมบูรณ์ที่อยู่ในรูป supercoiled DNA เรียกว่า covalently closed circular DNA (cccDNA) ซึ่งเมื่อรวมกับ nucleosome จะกลายเป็น mini-chromosome ทำหน้าที่เป็นแม่แบบ (template) สำหรับการสร้าง DNA สายใหม่ โดยเริ่มจากขบวนการ transcription คือ DNA สายลบจะถูกเปลี่ยนเป็น RNA โดยอาศัยเอนไซม์ RNA polymerase II ของเซลล์ตับ ได้เป็น mRNA ออกมา เรียกว่า pregenomicRNA (pgRNA) จากนั้น pgRNA จะผ่านขบวนการ translation และ encapsidation คือรวมตัวกับ core protein และเอนไซม์ DNA polymerase/reverse transcriptase ที่สร้างจาก P-ORF และเข้าสู่ขั้นตอนต่อไปคือ reverse transcription โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase/reverse transcriptase ทำให้ได้เป็น DNA สายลบสายใหม่ออกมา จากนั้นจะมีการสร้าง DNA สายบวก โดยใช้ชิ้นส่วนสั้นๆ ของปลายด้าน 5’ ของ pgRNA เป็น primer ก่อนที่ DNA สายบวกจะสร้างเสร็จจะมีการ coating หรือ encapsidation ของ nucleocapsid เกิดขึ้น ทำให้ DNA สายบวกของเชื้อไวรัสมีความยาวไม่ครบเต็มสายและไม่เท่ากันในแต่ละตัว จากนั้น nucleocapsid ที่สร้างขึ้นส่วนหนึ่งจะเข้าสู่ endoplasmic reticulum เพื่อรวมกับ envelope กลายเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์แล้วออกนอกเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือดต่อไป nucleocapsid อีกส่วนหนึ่งจะกลับเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ตับเพื่อเปลี่ยนเป็น cccDNA ต่อไป ทำให้จำนวนของ

cccDNA ในนิวเคลียสค่อนข้างคงที่ตลอดเวลา ในช่วงที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง cccDNA จะสะสมอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ตับในรูป stable episome โดยมีจำนวนเฉลี่ยประมาณ 30-50 copies ต่อเซลล์ [6]



ภาพที่ 3 ขั้นตอนการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

จากขั้นตอนการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสดังกล่าว จะเห็นได้ว่า cccDNA เป็น active replicative form ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ตับ เชื่อว่าการที่ cccDNA จะเริ่มทำงานได้ต้องผ่านขบวนการ methylation ก่อน [6] อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่ทราบปริมาณสัดส่วนที่แน่นอนของ cccDNA ที่มี active transcription acitvitiy ในแต่ละเซลล์ รวมไปถึงกลไกและปัจจัยต่างๆที่ควบคุมจำนวนของ cccDNA [12-14] ข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับความสำคัญของ cccDNA เชื่อว่า cccDNA เป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง เนื่องจากมีการสะสม cccDNA ในนิวเคลียสของเซลล์ตับทำให้เกิดการคงอยู่ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ตับเป็นระยะเวลานาน (viral persistence) แม้ว่าอาจตรวจไม่พบ HBsAg ในเลือดแล้ว ซึ่งเรียกว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้ยังมีบทบาทในการเกิดการกำเริบของไวรัส (viral reactivation) หลังหยุดการรักษาด้วยยาต้านไวรัสหรือระหว่างที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันหรือยาเคมีบำบัดซึ่งอาจเกิดขึ้นได้แม้จะตรวจไม่พบ HBsAg ในเลือดแล้วเช่นกัน รวมไปถึงการเกิดการดื้อยาต้านไวรัส (drug resistance) ในผู้ป่วยบางรายได้ และที่สำคัญคือทำให้เกิดการถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปสู่ผู้รับอวัยวะจากผู้บริจาคที่มีผล HBsAg เป็นลบแต่มี antiHBc เป็นบวกในเลือด อย่างไรก็ตามการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับ cccDNA จากชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยยังมีน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ที่มี antiHBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบในเลือด คาดว่าจะมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆใน

อนาคตอันใกล้ เนื่องจากมีการพัฒนาวิธีการตรวจด้วยวิธี real-time PCR ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรวจวัดปริมาณ cccDNA ได้ดีมากขึ้น [8,15]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อหา HBV DNA และ cccDNA ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยที่มีผลตรวจเลือดพบว่ามี anti-HBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบ ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2548 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2550

รูปแบบการวิจัย (Research design)

เป็นการวิจัยแบบ cross sectional study

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)

ประชากรเป้าหมาย (Population) คือผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่ตรวจพบ anti-HBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบในเลือด

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) คือผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่มาทำการเจาะชิ้นเนื้อตับด้วยข้งบ่งชี้ต่างๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยมีผลตรวจเลือดพบว่ามี anti-HBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบ ในภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ได้รับการเจาะตับด้วยข้อบ่งชี้ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่
    - เพื่อทำการประเมินพยาธิสภาพในตับก่อนเริ่มการรักษาภาวะตับอักเสบจากไวรัสตับอักเสบซี

- มีตับอักเสบที่สงสัยว่าเกิดจาก autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis หรือ nonalcoholic steatohepatitis
- เพื่อหาสาเหตุอื่นๆ ของตับอักเสบ

2. มีผลตรวจเลือดพบ anti-HBc antibody เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบ

เกณฑ์การตัดออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

- ผู้ป่วยที่มีผลเลือดพบ HBsAg เป็นบวก
- เป็นมะเร็งในตับทั้งชนิดปฐมภูมิและทุติยภูมิ

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความรู้พื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ (Basic scientific research) และยังไม่มีข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการศึกษาหาปริมาณ cccDNA ในกลุ่มผู้ที่มี anti-HBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบในเลือดมาก่อน และการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการหาปริมาณ cccDNA ในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยในกลุ่มอื่น เช่นเป็นไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังหรือเป็นมะเร็งตับ โดยส่วนใหญ่ใช้ขนาดตัวอย่างไม่เกิน 40 ตัวอย่าง จึงกำหนดใช้กลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้ประมาณ 40 ตัวอย่าง

วิธีการศึกษา (Intervention)

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง (specimens)

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่ เนื้อเยื่อตับและซีรัมของผู้ป่วยเข้าเกณฑ์การคัดเลือกดังกล่าวข้างต้น, ผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบทั้ง HBsAg, anti-HBs และ anti-HBc ในเลือด และผู้ป่วยที่เป็นไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังซึ่งตรวจพบ HBsAg เป็นบวกในเลือด

เครื่องมือ (Materials)

Aluminum foil (Rainbow metal company, USA)

Barrier Tip: 200 µl (BioScience, USA)

Beaker: 5 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex, England)

Combs (Bio-RAD, USA)

Cylinder: 25 ml (Pyrex, England)

Flat-bottom ELISA plate (Costar, USA)

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

Parafilm (Penchiney plastic packaging, USA)

Pipette rack (Eppendorf, Germany)

Pipette Tips: 10 µl, 200 µl, 1000 µl (BioScience, USA)

Polypropylene conical tube: 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)

Reagent bottle: 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, Germany)

Sterile pasture pipette (Samco Scientific Corporation, USA)

Stirring magnetic bar (V&P scientific, USA)

อุปกรณ์ (Equipments)

Autoclave (Hydroclave MC 10 Harvey, USA)

Automatic adjustable micropipette: P2.5 (0.1-2.5 µl), P10 (0.5-10 µl), P200 (20-200 µl) (Eppendorf, Germany), P20 (2-20 µl) (Socorex, Switzerland), P1000 (0.1-1 ml) (Gilson, France)

Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)

Chemical safety carbinet (Toxicap, France)

Class II microbiological safety carbinet (Envair, England)

Cuvett: 5 µl, 10 µl (MiralBio, Japan)

Deep Freezer -20° C (Sanyo, Japan)

Deep Freezer -70° C (Forma Scientific, USA)

ELISA microplate reader (Bio-RAD model 3550, USA)

ELISA microplate washer (TECAN, Austria)

Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)

Incubator (Memmert, Germany)

Microcentrifuge 1.5 ml (Denver, USA)

Multi-block heater (Lab-line Instrument, USA)

Multi-channel pipette: P (Socorex, Switzerland)

PCR HEPA+ carbinet (LIO LAB, Thailand)

PCR safety carbinet (LIO LAB, Thailand)

Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)

Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)

Refrigerator 4°C (Mitsubishi, Japan)

Spectrophotometer (MiralBio, Japan)

Thermal cycler (Eppendorf, MasterCycler gradient, Germany)

UV transilluminator (Fotodyne, USA)

Vortex mixer (Scientific Industries, USA)

Water purification equipment (Yamato Scientific, Japan)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (Reagent)

1.สารเคมีทั่วไป (General reagent)

Agarose molecular grade (Promega, USA)

Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

Sucrose (USB, Hong Kong)

Diethyl pyrocarbonate (Sigma, Singapore)

Bromphenal blue (Pharmacia, Hong Kong)

Boric acid (USB, Hong Kong)

Tris (USB, Hong Kong)

Hydrochloric acid (Sigma, Singapore)

100 base pair DNA ladder (Biolabs, USA)

2. สารเคมีสำหรับสกัด DNA (DNA extraction)

Absolute ethanol (Sigma, Singapore)

Chloroform (Sigma, Singapore)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Isoamyl alcohol (Sigma, Singapore)

Magnesium chloride (Sigma, Singapore)

Phenol (Sigma, Singapore)

Proteinase K (Sigma, Singapore)

Sodium acetate (USB, Hong Kong)

Sodium chloride (USB, Hong Kong)

Sodium dodecyl sulfate (Sigma, Singapore)

Sodium hydroxide (USB, Hong Kong)

Tris-HCl (USB, Hong Kong)

3. สารเคมีสำหรับ Polymerase Chain Reaction (PCR)

Eppendorf MasterMix (2.5X) (Eppendorf, Germany): Taq DNA polymerase (62.5 U/ml) 125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl pH 8.3, 3.75 mM $Mg(OAc)_2$, 0.25% Igepal® - CA630, 500 µM of each dNTP and sterbilizer.

Genomic DNA sample

Oligonucleotide primers (Proligo, Singapore)

4. สารเคมีสำหรับ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Anti-HBs antibody kit test (Murex, England)

Anti-HBc antibody kit test (Murex, England)

Murex HBsAg version 3 kit test (Murex, England)

5. สารเคมีสำหรับโคลนนิ่ง (Cloning)

Ampicillin (Phamacia, Hong Kong)

Isopropyl-1-thio-ß-D-galactopyranoside: IPTG (Bio Basic, Germany)

Magnesium sulfate (Sigma, Singapore)

pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)

Tryptone (Giboco RBL, USA)

Yeast extract (Giboco BRL, USA)

5-bromo-4-chloro-3-inodlyl-ß-D-galactopyranoside:X-gal (Bio Basic, Germany)

ขั้นตอนวิธีการดำเนินการศึกษาวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อตับจากการเจาะตับ

เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อตับที่ได้จากการเจาะตับที่เหลือจากการใช้ตรวจวินิจฉัยของผู้ป่วยที่มี anti-HBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบในเลือด ซึ่งมาเข้ารับการเจาะตับเพื่อการตรวจวินิจฉัยตามข้อบ่งชี้ ประมาณ 1 มก. แช่แข็งเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวโดยเร็วที่สุด เพื่อทำการศึกษาหาและวัดปริมาณ HBV DNA และ cccDNA ของไวรัสตับอักเสบบี

2. การเก็บตัวอย่างซีรั่ม

เก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 10 มล.ใส่ไว้ใน clotted blood tube ปล่อยให้เลือดแข็งตัว จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณภูมิห้อง จากนั้นปิเปตซีรั่มส่วนบนนำไปใส่ในหลอด microcentrifuge tube แล้วแช่แข็งเก็บไว้ที่ -20^{0}c จนกระทั่งนำมาตรวจ anti-HBc, anti-HBs และ HBsAg และตรวจหาและวัดปริมาณ HBV DNA

3. การตรวจ anti-HBc, anti-HBs และ HBsAg

นำซีรั่มที่เก็บไว้ที่ -20^{0}c มาละลาย และทำการตรวจ anti-HBc, anti-HBs และ HBsAg ด้วยวิธี ELISA โดยปฏิบัติขั้นตอนตามที่ระบุไว้ในชุดตรวจ

4. การสกัดดีเอ็นเอจากซีรัม

ใส่ซีรั่มปริมาตร 100 µl ลงในหลอดที่มี 400 µl ของ lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS) และ 10 µl ของ proteinase K (20 mg/ml) ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการปิเปต นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50° C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อย่อยโปรตีน เมื่อครบกำหนดนำมาสกัดต่อด้วยวิธี phenol-chlorofrom extraction โดยการเติม 250 µl ของ Phenol และ 250 µl ของ chloroform : isoamyl (49:1) ลงในหลอดที่ผ่านการบ่มตามเวลา จากนั้นนำไป vortex แล้ว centrifugeโดยใช้ความเร็ว 13,500 rpm ที่ 4° C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสข้างบนมาเติม 500 µl ของ chloroform : isoamyl (49:1) นำไป centrifuge อีกครั้งที่ 4° C เป็นเวลา 5 นาทีโดยใช้ความเร็ว 13,500 rpm ดูดส่วนใสข้างบนที่ได้ทั้งหมดใส่ลงในหลอดใหม่ที่มี glycogen 4 µl absolute ethanol 800 µl และ sodium acetate 40 µl ผสมทั้งหมดให้เข้ากันจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 °C เพื่อตกตะกอน DNA เป็นเวลา 30 นาที นำไป

centrifuge ที่ 4° C ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ดูดของเหลวออกให้หมดให้เหลือเพียงตะกอน DNA ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปปั่นล้างตะกอนที่ 13,500 rpm 4 ° C เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวทั้งหมดทิ้งไป นำตะกอนที่ได้ไปเข้าเครื่อง speed vacuum เพื่อระเหย ethanol ออกให้หมด เมื่อตะกอนแห้งละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 30 µl

5. การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อตับ

ใส่ชิ้นเนื้อตับแช่แข็งลงในหลอดที่มี proteinase K (20 mg/ml) จำนวน 10 µl และ lysis buffer 400 µl (10 mMTris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS) จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเติม phenol 125 µl ร่วมกับ chloroform/isoamyl alcohol (อัตราส่วน 49:1) ปริมาตร 125 µl นำไปเขย่าอย่างแรงอีก 15 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องอีก 10 นาทีที่ 14,000 rpm ค่อยๆย้ายส่วนใสข้างบนแบ่งใส่ microcentrifuge tube ใหม่ขนาด 1.5 ml จำนวน 1 หลอด จากนั้นเติม 4 µg glycogen (20mg/ml), 800 µl 100 % ethanol และ 40 µl sodium acetate (2M) แล้วทำการแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 ° C เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตส่วนน้ำใสทิ้งจนหมดแล้วล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 1 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,500 rpm อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำตะกอน DNA ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง speed vacuum เพื่อระเหย ethanol ออกให้หมดเป็นเวลา 10 นาที (หรือจนกว่าจะแห้ง) จากนั้นละลาย DNA ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 30 µl แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° C

6. การทำโคลนนิ่งและการเตรียมพลาสมิดเพื่อใช้เป็น positive control และ DNA มาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณสำหรับ cccDNA และ *β-GLOBIN* gene

ทำการสกัด DNA จากชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แล้วทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในส่วนของ cccDNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธี PCR จากนั้นทำการเตรียม primary PCR product ที่ได้ให้มีความเข้มข้นโดยใช้วิธีของ Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppenforf, Germany) นำ PCR product solution ที่ได้มาแยกโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2%(w/v) gel* ใน 1X TBE* และใช้กระแสไฟความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็น

*ดูรายละเอียดในภาคผนวก

เวลา 60 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide (10 µg/ml) เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง นำเจลไปตรวจหาแถบของ DNA ภายใต้แสง UV และตัดชิ้นส่วนของเจลที่มี DNA ที่ต้องการจากเจลแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Germany) นำ primary PCR product ที่บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อเข้ากับ cloning vector (T-GEN-T easy vector, Promega) ด้วยเอนไซม์ Ligase แล้วเหนี่ยวนำให้ recombinant vector เข้าสู่เซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *E.Coli* ทำการบ่มเพาะเชื้อและคัดเลือก colony สีขาวที่มี recombinant vector เขี่ยเชื้อมาเลี้ยงใน LB broth เพื่อเพิ่มจำนวนโดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการแยกสกัด recombinant plasmid ให้บริสุทธิ์ ทำ plasmid ที่ได้วัดความเข้มข้นที่ OD_{260} แล้วคำนวณหาจำนวนโมเลกุลของ plasmid ที่แน่นอน เพื่อนำมาเจือจางครั้งละ 10 เท่าให้ได้ความเข้มข้นในขนาด $10^8 – 10^1$ copies/µL

สำหรับการทำโคลนนิ่งและการเตรียมพลาสมิดเพื่อใช้เป็น positive control และ DNA มาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณสำหรับ ***ß-GLOBIN*** gene นั้นทำโดยขั้นตอนลักษณะเช่นเดียวกับ cccDNA โดยเปลี่ยนเป็นสารพันธุกรรมของ ***ß-GLOBIN*** gene ในตำแหน่งที่ต้องการ

7. การออกแบบไพรเมอร์

Forward primer และ Reverse primer ที่ใช้ในการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดง forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในปฏิกริยาทั้งหมดในการศึกษา

PCR amplification	PCR technique	Forward primers	Reverse primers
HBV DNA (S gene)	Real-time	nt. 2814–2835: 5'-GGGTCACCATATTCTTGGGAAC-3'	nt 3094-3085: 5'-CCTGAGCCTGAGGGCTCCAC-3'
	Semi-nested	nt. 2814–2835: 5'-GGGTCACCATATTCTTGGGAAC-3'	nt.366-348: 5'-CCAGGACAAATTGGAGGAC-3' nt 3094-3085: 5'-CCTGAGCCTGAGGGCTCCAC-3'
HBV DNA (X gene)	Real-time	nt. 1287–1305: 5'-AGCTTGTTTTGCTCGCAGC-3'	nt. 1974-1957: 5'-GGAAAGAAGTCAGAAGGC -3'
	Semi-nested	nt. 1287–1305: 5'-AGCTTGTTTTGCTCGCAGC-3'	nt. 2476-2457: 5'-CCCACCTTATGAGTCCAAGG -3' nt. 1974-1957: 5'-GGAAAGAAGTCAGAAGGC -3'
HBV DNA (C gene)	Real-time	nt. 1551-1579: 5'-TCTGTGCCTTCTCATCTG -3'	nt. 2476-2457: 5'-CCCACCTTATGAGTCCAAGG -3'
	Semi-nested	nt. 1287–1305: 5'-AGCTTGTTTTGCTCGCAGC-3'	nt 2476-2457: 5'-CCCACCTTATGAGTCCAAGG -3' nt. 1551-1579: 5'-TCTGTGCCTTCTCATCTG -3'
cccDNA	Real-time	nt.1662-1682: 5'-ACTCTTGGACTCTCAGCAATG-3'	nt.1922-1901: 5'-CTTTATTCGGGTCAATGTGCA-3'
	Semi-nested	nt.1552-1569: 5'-TCTGTGCCTTCTCATCTG-3'	nt. 2053-2034: 5'-GTGAGGTGAACAATGTTCCG-3' nt.1883-1865: 5'-GGCACAGCTTGGAGGCTTG-3'
ß-GLOBIN gene	Real-time	5'-GTGCRYCTGACTCCTGAGGAGA-3'	5'-CCTTGRTACCAACCTGCCCAG-3'

สำนักวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.การตรวจหา HBV DNA ในซีรั่ม

ทำการตรวจหา HBV DNA ในซีรั่มด้วยการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมในบริเวณตำแหน่ง 2814 ถึงตำแหน่ง 3094 โดยใช้วิธี real-time PCR โดย reaction mixture และรอบปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 reaction mixture สำหรับ real-time PCR ของการเพิ่มสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง 2814 ถึง 3094

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (12.5 µl)
Eppendorf MasterMix (2.5X)	-	5 µl
25 µM forward primer	0.5 µM	0.25 µl
25 µM reverse primer	0.5 µM	0.25 µl
DNA template	-	1 µl
Distilled water	-	5.3 µl
Mg^{2+}	-	0.5 µl
Sybergreen	-	0.2 µl

ตารางที่ 3 รอบปฏิกิริยาสำหรับ real-time PCR ของการเพิ่มสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง 2814 ถึง 3094

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial denaturation	95°C	3 min
40 cycles of		
- Denaturation	95°C	10 sec
- Annealing	60°C	15 sec
- Extension	72°C	15 sec
- Final extension	78°C	15 sec

9.การตรวจหา HBV DNA ในเนื้อเยื่อตับ

ทำการตรวจหา HBV DNA ในเนื้อเยื่อตับสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกทำโดยวิธี real-time PCR โดยใช้ reaction mixture และรอบปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการตรวจหา HBV DNA ในซีรั่ม จากนั้นจะทำการตรวจหา HBV DNA ขั้นตอนที่ 2 โดยใช้วิธี semi-nested PCR ด้วยการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมครั้งที่ 1 ในบริเวณตำแหน่ง 2814 ถึงตำแหน่ง 366 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ S gene สารพันธุกรรมได้จากการเพิ่มจำนวนในครั้งแรก จะถูกเพิ่มจำนวนเป็นครั้งที่ 2 ในบริเวณตำแหน่ง 2814 ถึงตำแหน่ง 3094 ปริมาณสารพันธุกรรมของ HBV DNAจำนวนน้อยสุดที่จะตรวจพบโดยการตรวจด้วยวิธี real-time PCR และ semi-nested CPR คือ 10^2 และ 10^1 copies/µl ตามลำดับ โดย reaction mixture และรอบปฏิกิริยาทั้งสองแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 reaction mixture สำหรับ semi-nested PCR ในการตรวจหา HBV DNA

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา รอบแรก (25 µl)	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา รอบที่สอง (25 µl)
Eppendorf MasterMix (2.5X)	-	10 µl	10 µl
25 µM forward primer	0.5 µM	0.5 µl	0.5 µl
25 µM reverse primer	0.5 µM	0.5 µl	0.5 µl
DNA template	-	2 µl	1 µl
Distilled water	-	12 µl	13 µl

ตารางที่ 5 รอบปฏิกิริยาของ semi-nested PCR ในการตรวจหา HBV DNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial denaturation	94°C	3 min
35 cycles of		
- Denaturation	94°C	30 sec
- Annealing	60°C	30 sec
- Extension	72°C	90 sec
Final extension	72°C	10 min

หลังจากนั้นจะทำการตรวจหา HBV DNA ซ้ำอีกสองครั้งโดยสองขั้นตอนคือ real-time PCR และ semi-nested PCR แต่เปลี่ยนตำแหน่งของสารพันธุกรรมที่จะเพิ่มจำนวนเป็นบริเวณ X gene และ C gene ตามลำดับ โดยการเปลี่ยน forward และ reverse primer ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณดังกล่าวได้ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ reaction mixture และรอบปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ S gene โดยเปลี่ยนเฉพาะอุณหภูมิในขั้น annealing สำหรับ C gene และ X gene เป็น 55°C

9.การตรวจหา cccDNA ในเนื้อเยื่อตับ

ทำการตรวจหา cccDNA ในเนื้อเยื่อตับสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกทำการตรวจหาสารพันธุกรรมโดยวิธี real-time PCR โดยใช้ reaction mixture และรอบปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7

ตารางที่ 6 reaction mixture สำหรับ real-time PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง 1662 ถึง 1922

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (15 µl)
Eppendorf MasterMix (2.5X)	-	6 µl
25 µM forward primer	0.5 µM	0.75 µl
25 µM reverse primer	0.5 µM	0.75 µl
DNA template	-	1 µl
Distilled water	-	5.96 µl
Mg^{2+}	-	0.3 µl
Sybergreen	-	0.24 µl

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 รอบปฏิกิริยาสำหรับ real-time PCR สำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมที่ตำแหน่งระหว่าง 1662 ถึง 1922

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial denaturation	95°C	10 min
40 cycles of		
- Denaturation	95°C	15 sec
- Annealing	59°C	30 sec
- Extension	72°C	60 sec
- Final extension	80°C	15 sec

ขั้นที่สองทำการตรวจหา cccDNA โดยใช้วิธี semi-nested PCR ด้วยการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมครั้งที่ 1 ในบริเวณตำแหน่ง 1552 ถึงตำแหน่ง 2053 จากนั้นสารพันธุกรรมได้จากการเพิ่มจำนวนในครั้งแรก จะถูกเพิ่มจำนวนเป็นครั้งที่ 2 ในบริเวณตำแหน่ง 1552 ถึงตำแหน่ง 1883 ปริมาณสารพันธุกรรมของ cccDNA จำนวนน้อยสุดที่จะตรวจพบโดยการตรวจด้วยวิธี real-time PCR และ semi-nested CPR คือ 10^2 และ 10^1 copies/µl ตามลำดับ โดย reaction mixture และรอบปฏิกิริยาทั้งสองแสดงในตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 reaction mixture สำหรับ semi-nested PCR ในการตรวจหา cccDNA

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา รอบแรก (25 µl)	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยารอบที่สอง (25 µl)
Eppendorf MasterMix (2.5X)	-	10 µl	10 µl
25 µM forward primer	0.5 µM	0.5 µl	0.5 µl
25 µM reverse primer	0.5 µM	0.5 µl	0.5 µl
DNA template	-	2 µl	1 µl
Distilled water	-	12 µl	13 µl

ตารางที่ 9 รอบปฏิกิริยาของ semi-nested PCR ในการตรวจหา cccDNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial denaturation	94°C	3 min
35 cycles of		
- Denaturation	94°C	30 sec
- Annealing	60°C	30 sec
- Extension	72°C	90 sec
Final extension	72°C	10 min

10.การตรวจหา *ß-GLOBIN* gene ในเนื้อเยื่อตับ

ß-GLOBIN gene เป็นยีนที่มีอยู่ในเซลล์ตับเป็นจำนวน 1 copy ในแต่ละเซลล์ตับ ทำการตรวจหายีนนี้ในเนื้อเยื่อตับด้วยการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมที่ลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ โดยใช้วิธี real-time PCR โดย reaction mixture และรอบปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 10 และ 11

ตารางที่ 10 reaction mixture สำหรับ real-time PCR สำหรับการเพิ่มจำนวน *ß-GLOBIN* gene

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (10 µl)
Eppendorf MasterMix (2.5X)	-	5 µl
25 µM forward primer	0.5 µM	0.1 µl
25 µM reverse primer	0.5 µM	0.1 µl
DNA template	-	1 µl
Distilled water	-	3.55 µl
Sybergreen	-	0.25 µl

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 รอบปฏิกิริยาสำหรับ real-time PCR สำหรับการเพิ่มจำนวน *ß-GLOBIN* gene

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา
Initial denaturation	95°C	3 min
40 cycles of		
- Denaturation	95°C	10 sec
- Annealing	60°C	15 sec
- Extension	72°C	20 sec
- Final extension	78°C	20 sec

11. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย electrophoresis

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี semi-nested PCR จะถูกตรวจสอบโดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยนำมาผสมกับ loading buffer* ปริมาตร 4 µl แล้วนำไปแยกขนาดด้วย 2%(w/v) gel ใน 1X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer และใช้กระแสไฟความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide (10 µg/ml) นำเจลไปตรวจหาแถบของ DNA ภายใต้แสง UV แล้วทำการบันทึกภาพ

12. การหาขนาดของ DNA

คำนวณขนาดของ DNA จากการเปรียบเทียบระยะทางที่ DNA เคลื่อนที่ไปกับความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่ DNA มาตรฐานเคลื่อนที่กับขนาดของ DNA มาตรฐาน (100 base pair DNA ladder (Biolabs, USA)

13. การวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequence analysis)

ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ถูกทำให้บริสุทธิ์จาก 2% agarose gel โดยใช้ Perfectprep Gel Cleanup kit (Eppendorf, Germany) หรือสกัดสายพลาสมิดสายผสมจาก culture โดยใช้ FastrPlasmid Mini 100 preparation kit (Eppendorf, Germany) จากนั้นทำการส่งตรวจเพื่อตรวจสอบลำดับเบสต่อไป

---

*รายละเอียดดูในภาคผนวก

14. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลที่ได้มาทำการตรวจสอบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตชนิดใดบ้าง โดยใช้โปรแกรม Blast เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ที่มีอยู่ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI)

การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บในแบบเก็บรวบรวมข้อมูล (Record form) และลงข้อมูลไว้ในคอมพิวเตอร์

ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical considerations)

1. การเจาะชิ้นเนื้อตับนั้นก็ปฏิบัติตามมาตรฐานการปฏิบัติทั่วไปโดยมีการตรวจอัลตราซาวน์ก่อนการเจาะตับ และเป็นไปตามข้อบ่งชี้ในการตรวจดังกล่าวอยู่แล้ว
2. ผู้ที่เข้าร่วมในการวิจัยทุกคนจะได้รับข้อมูลโดยละเอียดถึงวิธีการตรวจ และได้ส่งรายละเอียดให้คณะกรรมการพิจารณาเพื่อขอความเห็นและต้องได้รับการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (inform consent) จากผู้ป่วยก่อน
3. เนื่องจากมีการเก็บข้อมูลผู้ป่วยของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วย จึงมีการเสนอโครงงานวิจัยต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งคณะกรรมการมีมติให้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยแล้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

เนื่องจากการสำรวจในประชากรไทยที่มี anti-HBc เป็นบวก HBsAg เป็นลบ และ anti-HBs เป็นลบในเลือด มีความชุกเพียงร้อยละ 11 และมีผู้ป่วยได้รับการเจาะตับเพื่อทำการวินิจฉัยโรคในภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีละประมาณ 50-80 ราย ทำให้ได้กลุ่มตัวอย่างที่มีผล anti-HBs เป็นลบ ไม่ครบตามจำนวนที่กำหนดไว้

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected benefit and application)

1. ทำให้ทราบระดับปริมาณของ HBV DNA และ cccDNA ในเนื้อเยื่อตับของผู้ที่มี anti-HBc เป็นบวกและ HBsAg เป็นลบ ซึ่งยังมีข้อมูลน้อยมากในมนุษย์

2. ข้อมูลจากการศึกษานี้จะเป็นองค์ความรู้ในแนวลึกและเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นซึ่งจะนำไปใช้ในการศึกษาในกลุ่มผู้บริจาคอวัยวะหรือผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายตับต่อไป ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากเพื่อหาแนวทางและวิธีในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีผ่านทางการปลูกถ่ายอวัยวะในอนาคต

3. มีผลงานวิจัยที่มีคุณภาพเพื่อนำเสนอผลงานในการประชุมระดับชาติหรือนานาชาติ และตีพิมพ์วารสารทางการแพทย์ระดับชาติหรือนานาชาติได้

4.สร้างความเป็นเลิศในทางวิชาการด้านไวรัสตับอักเสบให้ประเทศไทยในระดับนานาชาติ โดยเฉพาะการศึกษาแนวลึกทางด้านไวรัสอณูชีวโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบี

อุปสรรคที่ผู้วิจัยคาดว่าจะเกิดขึ้นในขณะดำเนินการวิจัย และมาตราการในการแก้ไข (Obstacle)

จำนวนผู้ป่วยที่เข้ามาร่วมในโครงการอาจจะมีจำนวนไม่เพียงพอ ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ในการเจาะตับ

การบริหารการวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and time schedule)

กิจกรรม	พ.ศ. 2549							พ.ศ. 2550											พ.ศ. 2551			
	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. รวบรวมข้อมูล					*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*						
3. วิเคราะห์ข้อมูล																		*					
4. เขียนรายงาน																			*				
5. รายงานผลการวิจัย																				*	*	*	*

งบประมาณรายจ่ายของโครงการวิจัย (Budget)

รายการ	ค่าใช้จ่าย
ค่าตรวจเลือดหา HBsAg, anti-HBc และ anti-HBs ประมาณ 750 บาทต่อคน	รวมเป็น 30,000 บาท
ค่าตรวจเลือดหา HBV DNA ประมาณ 2500 บาทต่อคน	รวมเป็น 100,000 บาท
ค่าตรวจชิ้นเนื้อตับวัดปริมาณ HBV DNA และ cccDNA ประมาณ 3500 บาทต่อคน	รวมเป็น 140,000 บาท
ค่าตรวจชิ้นเนื้อตับวัดปริมาณ pgRNA ประมาณ 3500 บาทต่อคน	รวมเป็น 140,000 บาท
ค่าถ่ายเอกสาร, ค่าหลอดเก็บเลือดและชิ้นเนื้อตับ, ค่าเจ้าหน้าที่พยาบาล, ค่าอุปกรณ์เครื่องใช้สำนักงานและค่าใช้จ่ายอื่นๆ	ประมาณ 10,000 บาท
รวมจำนวนเงินทั้งสิ้น	ประมาณ 420,000 บาท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษานี้เก็บรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยที่มารับการเจาะตับที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนมกราคม 2548 ถึงเดือนธันวาคม 2550 มีผู้ป่วยที่เข้ารับการศึกษาวิจัย 35 ราย

มีผู้ป่วยทั้งหมด 38 รายในการศึกษาที่มารับการเจาะตับด้วยข้อบ่งชี้ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและมี HBsAg เป็นลบที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีผู้ป่วย 35 รายที่มีชิ้นเนื้อตับปริมาณเพียงพอที่จะทำการตรวจหา HBV DNA และ cccDNA อยู่ในกลุ่มที่มี anti-HBc เป็นบวกและ anti-HBs เป็นลบ 16 คนจากผู้ป่วยทั้งหมด 18 คนและอยู่ในกลุ่มที่มี anti-HBc และ anti-HBs เป็นบวก 19 คนจากผู้ป่วยทั้งหมด 20 คน เป็นผู้ป่วยชายรวม 25 คน (อยู่ในกลุ่มที่มี anti-HBc เป็นบวกและ anti-HBs เป็นลบ 11 คนและอยู่ในกลุ่มที่มี anti-HBc และ anti-HBs เป็นบวก 14 คน) เป็นหญิง 10 คน (อยู่ในกลุ่มที่มี anti-HBc เป็นบวกและ anti-HBs เป็นลบและกลุ่มที่มี anti-HBc และ anti-HBs เป็นบวก กลุ่มละ 5 คนเท่ากัน) โดยมีค่าอายุเฉลี่ยเท่ากับ 47.1 (พิสัย 22-66) ปีและ 50.8 (พิสัย 22-77) ปีในกลุ่มที่มี anti-HBc เป็นบวกและ anti-HBs เป็นลบและกลุ่มที่มี anti-HBc และ anti-HBs เป็นบวกตามลำดับ โดยมีข้อบ่งชี้ในการเจาะตับดังนี้คือ เพื่อการประเมินลักษณะพยาธิภาพของตับก่อนการรักษาโรคตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสตับอักเสบซี, เพื่อหาสาเหตุของตับอักเสบ, สงสัยภาวะ autoimmune hepatitis และสงสัยภาวะ nonalcoholic steatohepatitis จำนวน 9 ราย (ร้อยละ 56.3), 1 ราย (ร้อยละ 6.3), 3 ราย (ร้อยละ 18.8) และ 3 ราย (ร้อยละ 18.8) ตามลำดับในกลุ่มที่มี anti-HBc เป็นบวกและ anti-HBs เป็นลบและ จำนวน 10 ราย (ร้อยละ 52.6), 5 ราย (ร้อยละ 26.3), 3 ราย (ร้อยละ 15.8) และ 1 ราย (ร้อยละ 5.3) ตามลำดับในกลุ่มที่มี anti-HBc และ anti-HBs เป็นบวก

ผลการตรวจหา HBV DNA ในซีรั่มพบว่า ผู้ป่วยที่อยู่ในการศึกษาทั้งสองกลุ่มตรวจไม่พบ HBV DNA ในเลือดด้วยวิธี real-time PCR ส่วนผู้ป่วยซึ่งเป็นกลุ่มที่เป็นควบคุมบวก จำนวน 2 คน ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มีตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสตับอักเสบบีชนิดที่มี HBeAg เป็นบวกและลบจำนวนอย่างละ 1 คน ตรวจพบ HBV DNA ปริมาณ $1.6x10^7$ copies/µl และ $2.0x10^7$ copies/µl ในซีรั่มของผู้ป่วยที่มี HBeAg เป็นบวกและลบตามลำดับ ส่วนการตรวจหา HBV DNA ในเนื้อเยื่อตับด้วยวิธี real-time PCR ผลคือตรวจไม่พบ HBV DNA ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยที่อยู่ในการศึกษาทั้งสองกลุ่ม ส่วนผู้ป่วยซึ่งเป็นกลุ่มที่เป็นควบคุมบวก ตรวจพบปริมาณ HBV DNA เท่ากับ $1.3x10^7$ และ $2.6x10^4$

copies/µl ในผู้ป่วยที่มี HBeAg เป็นบวกและลบตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณในแต่ละเซลล์ตับโดยคำนวณปริมาณเซลล์ตับจากจำนวน *ß-GLOBIN* ที่ตรวจได้ พบว่ามีจำนวนไวรัสในเซลล์ตับแต่ละเซลล์คิดเป็น 164.6 และ 21.5 copies ในผู้ป่วยที่มี HBeAg เป็นบวกและลบตามลำดับ และเมื่อทำการตรวจหา HBV DNA ในเนื้อเยื่อตับด้วยวิธี semi-nested PCR พบ HBV DNA ในกลุ่มผู้ป่วยที่มี anti-HBc เป็นบวกและ anti-HBs เป็นลบ รวมทั้งหมด 3 จาก 16 คน (คิดเป็นร้อยละ 18.8) ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่มี anti-HBc และ anti-HBs เป็นบวก พบ HBV DNA 1 คนจากผู้ป่วยทั้งหมด 19 คน (คิดเป็นร้อยละ 5.3)

เมื่อทำการตรวจหา cccDNA ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมบวกด้วยวิธี real-time PCR พบปริมาณ cccDNA เท่ากับ $1.7x10^6$ และ $3.2x10^4$ copies/µl ซึ่งคิดเป็นปริมาณต่อเซลล์ตับหนึ่งเซลล์เท่ากับ 21.5 และ 0.7 copies ในผู้ป่วยที่มี HBeAg เป็นบวกและลบตามลำดับ ส่วนการตรวจหา cccDNA ในกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการศึกษานั้น ผลไม่พบ cccDNA ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยในกลุ่มศึกษาทั้งจากการตรวจด้วยวิธี real-time PCR และ semi-nested PCR

ปริมาณ *ß-GLOBIN* ที่ตรวจได้ในกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการศึกษา มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1.0x10^5$ (พิสัย $3.6x10^3 – 5.8x10^5$) copies/assay

ผลการศึกษาทั้งหมดดังสรุปในตารางที่ 12

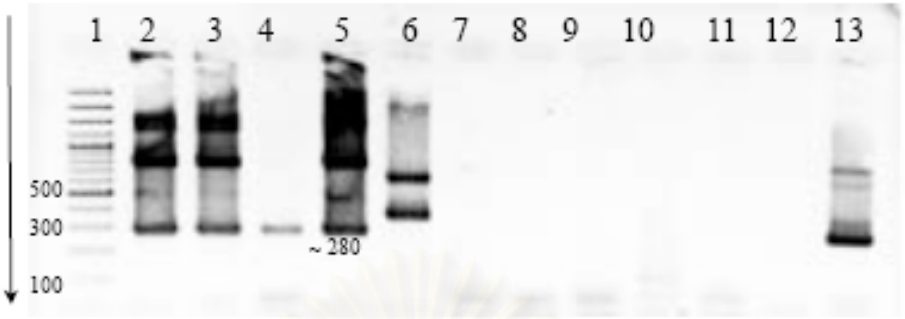
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจหา HBV DNA, cccDNA และ *ß-GLOBIN* ในกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษาและประชากรในกลุ่มควบคุมบวก

	PCR techniques	HBeAg+ CHB	HBeAg- CHB	Negative antiHBc and positive antiHBs	Positive antiHBc and antiHBs
Number of patients		1	1	16	19
Serum HBV DNA (copies/μL)	Real-time	$1.6x10^7$	$2.0x10^7$	undetectable	undetectable
Tissue HBV DNA (copies/cell)	Real-time	164.6	0.6	undetectable	undetectable
	Semi-nested	positive	positive	positive in 3 of 16	positive in 1 of 19
Tissue cccDNA (copies/cell)	Real-time	21.5	0.7	undetectable	undetectable
	Semi-nested	positive	positive	negative	negative
Tissue *ß-GLOBIN* (median,copies/assay)	Real-time	$7.9x10^4$	$4.4x10^4$	$1.2x10^5$	$7.8x10^4$

ผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HBV DNA

การศึกษานี้ ทำการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม HBV DNA ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณตำแหน่งของ S gene โดยพบแถบของสารพันธุกรรมขนาด 280 bp ดังแสดงในภาพที่ 4 จากชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยทั้ง 2 คนในกลุ่มควบคุมบวกและผู้ป่วยกลุ่มศึกษา 2 คน โดยตัวอย่างทั้งหมดที่สามารถเพิ่มสารพันธุกรรมได้จะนำไปตรวจสอบด้วยการตรวจลำดับเบสเปรียบเทียบกับยีนของ GenBank



ภาพที่ 4 แสดงผลการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณตำแหน่ง 2814 ถึง 348 ของ S gene ในเนื้อเยื่อตับที่ได้โดยวิธี semi-nested PCR โดยใช้ 2% agarose gel ช่องที่ 1 คือ 100bp DNA marker ช่องที่ 2-4 คือชุดควบคุมมาตรฐานที่มีปริมาณ HBV DNA เท่ากับ 10^3, 10^2 และ 10^1 copies/μl ตามลำดับ ช่องที่ 5 คือผู้ป่วยในกลุ่มควบคุมบวกซึ่งเป็นไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ช่องที่ 6 คือผู้ป่วยในกลุ่มควบคุมลบซึ่งมี HBsAg, anti-HBc และ anti-HBs เป็นลบทั้งหมด ช่องที่ 7 คือชุดควบคุมที่มี reagent โดยไม่มี DNA ช่องที่ 8-13 คือเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยรายที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 8 ตามลำดับ

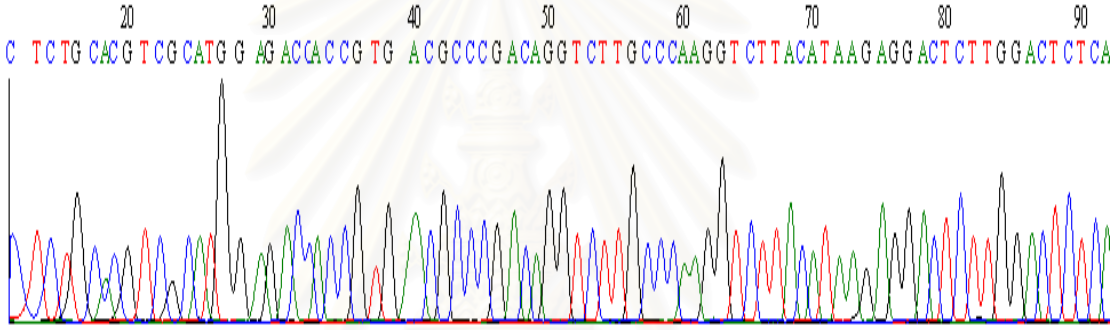
ชิ้นเนื้อตับจากผู้ป่วยในกลุ่มศึกษาพบสารพันธุกรรม HBV DNA จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณตำแหน่งของ C gene และ X gene จำนวน 2 และ 1 รายตามลำดับ ด้วยวิธีการตรวจดังในลักษณะเดียวกับ S gene ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจพบสารพันธุกรรม HBV DNA โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่ง S gene, C gene และ X gene ที่พบทั้งหมดในการศึกษา

ตารางที่ 13 ผลการตรวจพบสารพันธุกรรม HBV DNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่ง S gene, C gene และ X gene จากชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมบวกและผู้ป่วยกลุ่มที่ศึกษา

Patient Number	X gene	C gene	S gene
HBeAg+ CHB (positive control)	+	+	+
HBeAg- CHB (positive control)	+	+	+
8		+	+
11		+	
19	+		
22			+

ผลการตรวจยืนยันผลของสารพันธุกรรมของ HBV DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี semi-nested PCR

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 280 bp จากการทำ sequencing (ภาพที่ 5)มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blast จากฐานข้อมูลใน GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่ามีความเหมือนกับ Hepatitis B virus isolate from clone UD-585 S protein gene, partial cds มากที่สุด (97% identity; 234/239 bp) และเหมือนกับ Hepatitis B virus isolate from clone CH-391 S protein gene, partial cds (97% identitiy; 238/245 bp) รองลงมา ดังแสดงในภาพที่ 6 และ 7



ภาพที่ 5 แสดงตัวอย่าง chromatogram ที่ได้จากการทำ sequencing ของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HBV DNA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

gb|DQ361423.1| Hepatitis B virus isolate UD-585 S protein gene, partial cds
Length=1057

Score = 412 bits (223), Expect = 3e-112
Identities = 234/239 (97%), Gaps = 2/239 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  13
TGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCATGGGGACGAATCTTTCTGTTCCCAATCCTCTGGGA  72

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  10
TGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCATGGGGACGAATCTTTCTGTTCCCAATCCTCTGGGA  69

Query  73
TTCCTTCCCGGTCACCAGTTGGACCCTGCATTCGGAGCCAATTCAAACAATCCAGATTGG  132
||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  70
TTCTTTCCCGGTCACCAGTTGGACCCTGCATTCGGAGCCAATTCAAACAATCCAGATTGG  129

Query  133
GACTTCAACCCCAACAAGTATCAATGGCCTGCGGCAAACCAGGTAGGAGTGGGATCCTTC  192
|||||||||||||||||| |||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  130
GACTTCAACCCCAACAAGGATCAATGGCCAGCGGCAAACCAGGTAGGAGTGGGATCCTTC  189

Query  193
GGGCCAGGGTTCACTCCACCACACGGCGGTCTTTTGGGGTGGAGCC-TCGAGGCTCAGG  250
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || |||||||||
Sbjct  190
GGGCCAGGGTTCACTCCACCACACGGCGGTCTTTTGGGGTGGAGCCCTC-AGGCTCAGG  247
```

ภาพที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ 280 bp จากตัวอย่างที่ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ 2814 ถึง 348 ของ S gene กับ Hepatitis B virus จาก clone UD-585 S protein gene, partial cds

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

gb|DQ361436.1| Hepatitis B virus isolate CH-391 S protein gene, partial cds
Length=1056

Score = 411 bits (222), Expect = 9e-112
Identities = 238/245 (97%), Gaps = 3/245 (1%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  7
GAGAGTTGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCATGGGGACGAATCTTTCTGTTCCCAATCCT  66
||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  5
GAG-GTTGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCATGGGGACGAATCTTTCTGTTCCCAATCCT  63

Query  67
CTGGGATTCCTTCCCGGTCACCAGTTGGACCCTGCATTCGGAGCCAATTCAAACAATCCA  126
|||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  64
CTGGGATTCTTTCCCGGTCACCAGTTGGACCCTGCATTCGGAGCCAATTCAAACAATCCA  123

Query  127
GATTGGGACTTCAACCCCAACAAGTATCAATGGCCTGCGGCAAACCAGGTAGGAGTGGGA  186
|||||||||||||||||||||| |||||||||| |||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  124
GATTGGGACTTCAACCCCAACAAGGATCAATGGCCAGCGGCAAATCAGGTAGGAGTGGGA  183

Query  187
TCCTTCGGGCCAGGGTTCACTCCACCACACGGCGGTCTTTTGGGGTGGAGCC-TCGAGGC  245
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||
Sbjct  184
TCCTTCGGGCCAGGGTTCACTCCACCACACGGCGGTCTTTTGGGGTGGAGCCCTC-AGGC  242

Query  246  TCAGG  250
             |||||
Sbjct  243  TCAGG  247
```

ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของ 280 bp จากตัวอย่างที่ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณ 2814 ถึง 348 ของ S gene กับ Hepatitis B virus จาก clone CH-391S protein gene, partial cds

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

แม้ว่าบทบาทสำคัญของ cccDNA ต่อการคงอยู่ของไวรัสตับอักเสบบีในเซลล์ตับเป็นเวลานานจะเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง แต่ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับ cccDNA ซึ่งเป็น replicative form ของไวรัสตับอักเสบบีที่อาศัยอยู่ในเซลล์ตับนี้ ยังมีอยู่น้อยมากในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา และโดยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง มีข้อมูลความรู้เพียงส่วนน้อยที่ได้มาจากการศึกษาในมนุษย์ เหตุผลเนื่องจากการที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับ cccDNA ได้จำเป็นต้องทำการเจาะตับเพื่อให้ได้ชิ้นเนื้อตับมาเพื่อทำการตรวจหา cccDNA ต่อไป ดังนั้นจึงมีความยากลำบากในการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อตับโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแต่อยู่ในระยะที่โรคสงบ

ผลจากการศึกษานี้พบว่าปริมาณของ HBV DNA ในเซลล์ตับในกลุ่มควบคุมบวก ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [7] ส่วนการตรวจ HBV DNA จากชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยในกลุ่มศึกษานั้นพบว่าผู้ป่วยทุกรายไม่สามารถตรวจพบ HBV DNA ในตับได้ด้วยวิธีการตรวจมาตรฐาน real-time PCR ซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณ DNA ได้ในปริมาณต่ำสุดคือ 10^2 copies/assay แสดงว่าปริมาณไวรัสในตับของผู้ป่วยกลุ่มนี้อาจมีปริมาณน้อยกว่านี้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจหา HBV DNA อีกครั้งโดยใช้วิธี semi-nested PCR ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจพบ DNA ในปริมาณอย่างน้อย 10 copies/assay ในการตรวจครั้งแรกได้ใช้ primer ที่จำเพาะกับส่วนของ S gene ทำให้ตรวจพบ HBV DNA จากชิ้นเนื้อตับของเพียงผู้ป่วย 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.7 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาก่อนหน้านี้ [7,11,16-18]

จากการค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่า อัตราการตรวจพบ HBV DNA ในเนื้อเยื่อตับด้วยวิธี semi-nested PCR ของผู้ที่เคยมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะมีความแตกต่างกันขึ้นกับระยะของโรค [18] ทางผู้วิจัยจึงทำการตรวจหา HBV DNA ซ้ำอีกครั้งโดยเปลี่ยน primer ใหม่เป็น primer ที่มีความจำเพาะกับส่วนของ X gene และ C gene พบว่า มีผู้ป่วย 1 และ 2 รายพบ HBV DNA ในตับจากการตรวจด้วย primer ที่จำเพาะกับ X gene และ C gene ตามลำดับ โดยผู้ป่วย 1 รายที่พบ C gene เป็นรายเดียวกับที่ตรวจพบด้วย primer ที่จำเพาะกับ S gene ดังนั้นจึงมีผู้ป่วยในกลุ่มศึกษารวมทั้งหมด 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.4 ที่พบ HBV DNA ในเนื้อเยื่อตับโดยวิธี semi-nested PCR เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยในกลุ่มควบคุมบวกทั้งสองรายพบว่าสามารถตรวจพบ HBV DNA ในตับจากการตรวจด้วย primer ที่จำเพาะกับ gene ทั้ง 3 ส่วน ผู้เขียนตั้งสมมติฐานว่า HBV DNA ที่ตรวจ

พบในกลุ่มควบคุมน่าจะเป็นส่วนของสายพันธุกรรมของ HBV virion ที่อยู่ในเซลล์ตับ ในขณะที่ HBV DNA ที่ตรวจพบจากชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยกลุ่มศึกษาอาจจะเป็นส่วนของสายพันธุกรรมของ HBV DNA ส่วนที่เข้าไปแทรก (integrate) อยู่ในสายพันธุกรรมของคน ซึ่งตามลักษณะการดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อมีการติดเชื้อผ่านไปเป็นระยะเวลาหนึ่ง ไวรัสจะมีการแทรกสายพันธุกรรมบางส่วนเข้าไปอยู่ในสายพันธุกรรมของคนได้ ดังนั้นการตรวจพบสัดส่วนของผู้ที่มี anti-HBc เป็นบวกที่มี HBV DNA ในเนื้อเยื่อตับน้อย ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่า สาเหตุน่าจะเนื่องมาจากกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษามีความแตกต่างกัน กลุ่มประชากรที่เคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้เป็นกลุ่มประชากรที่อยู่ในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่ำ และส่วนใหญ่ติดเชื้อผ่านทางเพศสัมพันธ์หรือการได้รับเลือดหรือผลิตภัณฑ์เลือดในช่วงวัยผู้ใหญ่ ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มผู้ป่วยในการศึกษาครั้งนี้ ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสูง และวิธีการได้รับเชื้อมักผ่านทางแม่สู่ลูกเป็นส่วนใหญ่ ทำให้ระยะเวลาที่มีการติดเชื้อยาวนานกว่า ร่วมกับผลจากการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายในการกำจัดเชื้อมาเป็นระยะเวลานานกว่า ส่งผลให้ไวรัสที่ตรวจพบมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลจากการศึกษาอื่นๆ [7,11,16-18] การพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว คงต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติม โดยการทำการศึกษาในพื้นที่อื่นที่มีทั้งผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่ติดเชื้อตั้งแต่ในวัยเด็กและติดเชื้อในวัยผู้ใหญ่ และทำการตรวจวัดปริมาณ HBV DNA และ cccDNA ในเนื้อเยื่อตับเปรียบเทียบกัน

แม้มีผู้ป่วย 4 รายที่ยังตรวจพบ HBV DNA ในเนื้อเยื่อตับ แต่ผู้ป่วยเหล่านี้รวมถึงผู้ป่วยอื่นๆ ในการศึกษา กลับตรวจไม่พบ cccDNA ในเนื้อเยื่อตับทั้งจากการตรวจด้วยวิธี real-time PCR ตามมาตรฐานและ semi-nested PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง อย่างไรก็ตามคงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าไม่มี cccDNA ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยเหล่านี้ การตรวจไม่พบอาจเป็นผลเนื่องจาก cccDNA ในเนื้อเยื่อตับมีอยู่ในปริมาณที่น้อยมากจากผลของการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายที่กดการแบ่งตัวของไวรัสไว้จนอยู่ในระดับที่ต่ำมากเกินกว่าที่จะสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีดังกล่าว จนต่อเมื่อมีสภาวะที่การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลงมาก จึงจะพบการแบ่งตัวของไวรัสเพิ่มขึ้นจนทำให้มีตับอักเสบกำเริบขึ้นมา ดังเช่นที่พบในผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัด [4]

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้พบว่า ผู้ป่วยที่มี anti-HBc เป็นบวก มีจำนวนไวรัสตับอักเสบบีในเนื้อเยื่อตับเป็นปริมาณน้อยมาก โดยไม่พบ cccDNA ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยกลุ่มนี้เลย ซึ่งอาจเป็นเนื่องจากมีปริมาณ cccDNA ในระดับต่ำมากเกินกว่าที่การตรวจหาด้วยวิธี real-time PCR มาตรฐานและเทคนิค PCR ซึ่งมีความไวสูงที่เรียกว่า semi-nested จะสามารถตรวจพบได้ในกลุ่มประชากรที่มี anti-Hbc เป็นบวก ดังนั้นจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตในกลุ่มประชากรอื่นๆ เช่นกลุ่มประชากรที่มีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายลดลง เป็นต้น เพื่อนำไปสู่ความรู้ที่มีประโยชน์ ในการพัฒนาองค์ความรู้ เพื่อการดูแลรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ให้ได้ผลดียิ่งขึ้นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] Liu CJ, Chen DS, Chen PJ. Epidemiology of HBV infection in Asian blood donors: emphasis on occult HBV infection and the role of NAT. **J Clin Virol** 2006; 36 Suppl 1:S33-S44.

[2] Wiwanitkit V. An overview of hepatitis B serology screening check-up program among Thai workers. **Viral Immunol** 2002; 15(4):647-649.

[3] Dickson RC, Everhart JE, Lake JR, Wei Y, Seaberg EC, Wiesner RH et al. Transmission of hepatitis B by transplantation of livers from donors positive for antibody to hepatitis B core antigen. The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. **Gastroenterology** 1997; 113(5):1668-1674.

[4] Mindikoglu AL, Regev A, Schiff ER. Hepatitis B virus reactivation after cytotoxic chemotherapy: the disease and its prevention. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2006;4:1076-81.

[5] Caruntu FA, Molagic V. CccDNA persistence during natural evoluation of chronic VHB infection. **Rom J Gastroenterol** 2005;14:373-77.

[6] Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. **J Hepatol** 2005; 42(3):302-308.

[7] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. **Gastroenterology** 2004;126:1750-1758.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[8] Laras A, Koskinas J, Dimou E, Kostamena A, Hadziyannis SJ. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. **Hepatology** 2006;44:694-702.

[9] Yuen MF, Wong DK, Sum SS, Yuan HJ, Yuen JC, Chan AO et al. Effect of lamivudine therapy on the serum covalently closed-circular (ccc) DNA of chronic hepatitis B infection. **Am J Gastroenterol** 2005;100:1099-1103.

[10] Wong DK, Yuen MF, Poon RT, Yuen JC, Fung J, Lai CL. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 2006;45:553-559.

[11] Yuki N, Nagaoka T, Yamashiro M, Mochizuki K, Kaneko A, Mamamoto K et al. Long-term histologic and virologic outcomes of acute self-limited hepatitis B. **Hepatology** 2003;37:1172-79.

[12] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. **N Engl J Med** 2004; 350(11):1118-1129.

[13] Lee JY, Locarnini S. Hepatitis B virus: pathogenesis, viral intermediates, and viral replication. **Clin Liver Dis** 2004; 8(2):301-320.

[14] Locarnini S, Omata M. Molecular virology of hepatitis B virus and the development of antiviral drug resistance. **Liver Int** 2006; 26 Suppl 2:11-22.

[15] Dandri M, Petersen J. Hepatitis B virus cccDNA clearance: killing for curing? **Hepatology** 2005; 42(6):1453-1455.

[16] Kuhns M, McNamara A, Mason A, Campbell C, Perrillo R. Serum and liver hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B after sustained loss of surface antigen. **Gastroenterol** 1992;103;1649-56.

[17] Mason A, Xu L, Guo L, Kuhns M, Perrillo RP. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. **Hepatology** 1998;27:1736-42.

[18] Murakami Y, Minami M, Daimon Y, Okanoue T. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. **J Med Virol** 2004;72:203-214.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมการศึกษา

ชื่อโครงการ ปริมาณดีเอ็นเอและซีซีซีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่มีแอนติบอดี้ต่อเอชบีคอร์แอนติเจนเป็นบวกและเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบ

เรียนผู้เข้าร่วมการศึกษาทุกท่าน

ท่านเป็นผู้ได้รับเชิญจากแพทย์ให้เข้าร่วมการศึกษาหาปริมาณดีเอ็นเอและซีซีซีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในชิ้นเนื้อตับของผู้ที่มีแอนติบอดี้ต่อเอชบีคอร์แอนติเจนเป็นบวกและเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบ ก่อนที่ท่านจะตกลงเข้าร่วมการศึกษาดังกล่าว ขอเรียนให้ท่านทราบถึงวัตถุประสงค์และรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ในประเทศไทย มีความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีค่อนข้างสูง ผลจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนตามมาคือตับแข็งและมะเร็งตับ ทำให้เสียชีวิตในที่สุด การตรวจหาว่ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอยู่หรือไม่ ทำได้โดยการตรวจเลือดหาเอชบีเอสแอนติเจน หากผลเป็นบวกแสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี กรณีที่ผลเป็นลบแต่ตรวจพบมีแอนติบอดี้ต่อเอชบีคอร์แอนติเจนในเลือด แสดงว่าเคยมีการติดเชื้อมาก่อน จากการศึกษาในประเทศไทยพบว่า มีความชุกของผลเลือดลักษณะดังกล่าวถึงร้อยละ 45 -72 เมื่อทำการตรวจเพิ่มเติมพบว่าส่วนหนึ่งของผู้ที่มีผลเลือดแบบดังกล่าว จะตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสในเลือด แสดงว่ายังคงมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นอยู่ แต่อีกส่วนหนึ่งที่ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อในเลือดจะสามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อตับ

ข้อมูลในปัจจุบันพบว่า ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสในรูปที่เรียกว่าซีซีซีดีเอ็นเอ เป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญทำให้เกิดการดำรงอยู่ของเชื้อในเซลล์ตับเป็นระยะเวลานาน การทำให้เกิดการกำเริบของเชื้อหากได้รับยากดภูมิคุ้มกันหรือยาเคมีบำบัด รวมไปถึงการมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งตับ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้บริจาคอวัยวะที่มีผลเลือดดังกล่าวจะสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีไปสู่ผู้รับบริจาคอวัยวะได้ด้วย

<u>วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัย</u>

เพื่อศึกษาหาและวัดปริมาณดีเอ็นเอและซีซีซีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่มีแอนติบอดี้ต่อเอชบีคอร์แอนติเจนเป็นบวกและเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบ

<u>รายละเอียดของการศึกษาวิจัย</u>

ในการศึกษาวิจัยนี้ผู้ป่วยจะได้รับการตรวจเพื่อวินิจฉัยและรักษาไปตามขั้นตอนมาตรฐาน โดยจะชิ้นเนื้อตับส่วนที่เหลือจากการใช้ตรวจวินิจฉัยโรค มาทำการหาและวัดปริมาณดีเอ็นเอและซีซีซีดีเอ็นเอ และขอตัวอย่างเลือดประมาณ 10 ซีซี เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

การเข้าร่วมการศึกษานี้เป็นไปโดยสมัครใจ ท่านอาจจะปฏิเสธที่จะเข้าร่วมหรือถอนตัวจากการศึกษานี้ได้ทุกเมื่อ โดยไม่กระทบต่อการดูแลรักษาที่ท่านจะได้รับจากแพทย์ ประการสำคัญคือผลของการศึกษานี้ จะใช้สำหรับวัตถุประสงค์ทางวิชาการเท่านั้น โดยข้อมูลต่างๆจะถูกเก็บไว้ในคอมพิวเตอร์ และไม่มีการแพร่งพรายสู่สาธารณชน ขอรับรองว่าจะไม่มีการเปิดเผยชื่อของท่านตามกฎหมาย

หากท่านมีปัญหาหรือข้อสงสัยประการใด กรุณาติดต่อ พญ. รุ่งฤดี ชัยธีรกิจ หน่วยโรคระบบทางเดินอาหาร ตึกพร้อมพันธุ์ชั้น 1 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โทร 02-2564265 หรือ 086-9834721 ซึ่งยินดีให้คำตอบแก่ท่านทุกเมื่อ

ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใบยินยอมของผู้เข้าร่วมการศึกษาวิจัย

การศึกษาเรื่อง ปริมาณดีเอ็นเอและซีซีซีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยที่มีแอนติบอดี้ต่อเอชบีคอร์แอนติเจนเป็นบวกและเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบ

ชื่อ..... นามสกุล.....

ข้าพเจ้าได้รับทราบจากแพทย์ ซึ่งได้ลงนามด้านท้ายของหนังสือนี้ ถึงวัตถุประสงค์รายละเอียดของการศึกษาวิจัยเพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอและซีซีซีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยที่มีแอนติบอดี้ต่อเอชบีคอร์แอนติเจนเป็นบวกและเอชบีเอสแอนติเจนเป็นลบ และได้รับทราบถึงผลข้างเคียงที่อาจจะเกิดขึ้น ข้าพเจ้าได้ซักถาม ทำความเข้าใจเกี่ยวกับการศึกษาดังกล่าวนี้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว และยินยอมให้ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อตับที่เหลือจากการใช้วินิจฉัยโรคและตัวอย่างเลือดเพิ่มเพื่อทำการศึกษาวิจัยดังกล่าว

ข้าพเจ้ายินดีเข้าร่วมการศึกษาวิจัยครั้งนี้โดยสมัครใจ และอาจถอนตัวจากการเข้าร่วมศึกษานี้เมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และจะปฏิบัติตัวตามคำแนะนำของแพทย์ทุกประการ

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นผลสรุปจากการศึกษาวิจัย การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านและทำความเข้าใจในข้อความทั้งหมดของใบยินยอมครบถ้วนเป็นอย่างดีแล้ว ทั้งนี้ข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยด้วยความสมัครใจโดยไม่มีการบังคับใดๆ พร้อมทั้งลงลายมือชื่อเพื่อเป็นหลักฐานในการเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัยดังกล่าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

....

สถานที่/ วันที่ ( )

ลงนามผู้ป่วย

....

สถานที่ / วันที่ ( )

ลงนามแพทย์ผู้ให้การรักษา

ภาคผนวก ข
แบบบันทึกข้อมูลผู้ป่วย

Patient's data

Patient's code _____ Date _____

Age _____years

Sex: Male Female

Diagnosis of liver disease

1. HCV infection 2. NAFLD 3. AIH

4. PBC 5. hepatitis caused? 6. others

_____

LAB

Anti-HBc	1. positive	2. negative
Anti-HBs	1. positive	2. negative
Serum HBV DNA	1. positive	2. negative
No. of serum HBV DNA _____copies/µl		
HBV DNA in liver tissue	1. positive	2. negative
No. of HBV DNA in liver tissure _____copies/µl		
cccDNA in liver tissue	1. positive	2. negative
No. of cccDNA in liver tissure _____copies/µl		
ß-*GLOBIN* gene in liver tissue	1. positive	2. negative
No. of ß-*GLOBIN* in liver tissure _____copies/assay		

ภาคผนวก ค
บัฟเฟอร์และสารละลาย

1. Lysis buffer I

Sucrose	109.54	g
1.0 M Tris-Hcl (pH 7.5)	10	ml
1.0 M $MgCl_2$	5	ml
Triton X-100 (pure)	10	ml
Distilled water เป็น	1000	ml

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บในตู้เย็นที่ 4°C

2. Lysis buffer II

5.0 M NaCl	15	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	48	ml
Distilled water เป็น	1000	ml

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 20mg/ml Proteinase K

Proteinase K	2	ml
Distilled water เป็น	1000	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บในตู้เย็นที่ -20°C

4. 10%SDS solution

Sodium dodecyl sulfate	10	g
Distilled water เป็น	1000	ml

5. 49:1 (v/v) Phenol/chloroform/isoamyl alcohol

Phenol	49	volume
Chloroform	49	volume
Isoamyl alcohol	1	volume

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บใส่ขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วในตู้เย็นที่ 4°C

6. 7.5 M Ammonium acetate (CH_3COONH_4)

Ammonium acetate	57.81	g
Distilled water	80	ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave

7. 20 µg/ml glycogen

Glycogen	4	g
Distilled water	1	ml

8. 1.0 M Tris-Hcl

Tris base	12.11	g

เติม Distilled water และปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย HCl

Distilled water เป็น	100	ml

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

9. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Disodium ethylenediamine tetraacetate.$2H_2O$	186.6	g

เติม Distilled water และปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย NaOH

Distilled water เป็น	100	ml

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

10. 1.0 M $MgCl_2$ solution

Magnesium chloride.$6H_2O$	20.33	g
Distilled water เป็น	100	ml

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

11. 5 M NaCl solution

Sodium chloride	29.25	g
Distilled water เป็น	100	ml

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

12. 10X Tris borate buffer (10X TBE buffer)

Tris-base	100	g
Boric acid	55	g
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40	ml

ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

13. 6X loading dye

Bromphenol blue	0.25	g

Xylene cyanol	0.25	g
Glycerol	50	ml
1M Tris (pH 8.0)	1	ml
Distilled water เป็น	100	ml

ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในตู้เย็นที่ 4°C

14. 2% Agarose gel (w/v)

Agarose	2	g
1X TBE เป็น	100	ml

ละลายด้วยการอุ่นในเตาไมโครเวฟจากนั้นผสมให้เข้ากันจนเจลละลายหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	แพทย์หญิง รุ่งฤดี ชัยธีรกิจ
ภูมิลำเนา	กรุงเทพมหานคร
การศึกษา	แพทยศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 1
	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2543
พ.ศ. 2544-2546	แพทย์ใช้ทุนแผนกอายุรกรรม โรงพยาบาลอุตรดิตถ์
พ.ศ. 2547-2549	แพทย์ประจำบ้านแผนกอายุรศาตร์ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
พ.ศ. 2550-ปัจจุบัน	กำลังฝึกอบรมหลักสูตรแพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาอายุรศาสตร์ โรคระบบทางเดินอาหาร ที่หน่วยทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย