

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคตับอักเสบเป็นปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศในเอเชียและแอฟริกา เนื่องจากมีอัตราการติดเชื้อและการเป็นพาหะเรื้อรังสูง มีประชากรเป็นพาหะไวรัสตับอักเสบบีจำนวนมาก และสามารถแพร่เชื้อไปสู่บุคคลอื่นได้ โรคตับอักเสบดีเกิดได้หลายสาเหตุ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis virus) เป็นสาเหตุที่สำคัญพบมากกว่าร้อยละ 70-80 ของโรคตับอักเสบบี การติดเชื้ออาจทำให้เกิดติดเชื้อเฉียบพลัน เช่น ตับเหลือง ตาเหลือง ซึ่งเมื่อหายแล้วผู้ป่วยจะมีภูมิคุ้มกันและไม่เป็นโรคตับอักเสบบีจากเชื้อชนิดนั้นอีก หรือการติดเชื้อเรื้อรัง และมีเชื้อไวรัสบางชนิด ในกลุ่มไวรัสตับอักเสบบีและซี สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังเกิดตับอักเสบบีเรื้อรังตับแข็งและโรคมะเร็งตับ⁽¹⁾ การประเมินอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งตับในปี พ.ศ. 2528 พบว่ามีประชากรทั่วโลกประมาณ 315,000 รายต่อปีที่เป็นโรคมะเร็งตับ มะเร็งตับเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดเป็นอันดับ 3 ในประเทศกำลังพัฒนา ประเทศไทยมีอุบัติการณ์โรคมะเร็งตับสูงประมาณ 60-150 ต่อ 100,000 คนต่อปี⁽²⁾ โดยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยพบประมาณ 60 ในผู้ชาย 100,000 รายและ 40 ในผู้หญิง 100,000 ราย ในปัจจุบันมีผู้ติดเชื้อเรื้อรังทั่วโลกมากกว่า 350 ล้านคน อุบัติการณ์ของโรคสูงในประเทศกำลังพัฒนา และมีอัตราการตายจากโรคที่เกี่ยวข้องกับไวรัสตับอักเสบบี ไม่ต่ำกว่าปีละ 1 ล้านคน ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความชุกของโรคไวรัสตับอักเสบบี สูงถือเป็นแหล่งระบาดของโรคเช่นเดียวกับประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน และแอฟริกา⁽³⁾ ประเทศมีความชุกของไวรัสตับอักเสบบี สูง จะพบผู้ป่วยมะเร็งตับในเด็กหรือผู้ป่วยที่มีอายุน้อยได้ ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับมักจะติดเชื้อไวรัสมาจากมารดามากกว่าบิดา⁽⁴⁾ ในประเทศไทยพบว่ามีมารดาเป็นพาหะถึงร้อยละ 40-50 ซึ่งถ้าติดต่อไปยังลูกสาวและเติบโตไปเป็นมารดาที่เป็นพาหะถ่ายทอดการติดเชื้อไปให้บุตรที่เป็นวงจรโดยไม่สิ้นสุด ดังนั้นการป้องกันในทารกแรกเกิดไม่ให้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จึงเป็นวิธีที่ดีที่สุด ในการตัดวงจรการแพร่ระบาดของไวรัสตับอักเสบบี ลงไปได้

การติดต่อของไวรัสตับอักเสบบี สามารถติดต่อได้ โดยทางเลือดและผลิตภัณฑ์ของเลือด การติดต่อวิธีนี้รวมถึงการสัก การเจาะหู การใช้เข็มร่วมกัน

การติดต่อจากมารดาสู่ลูก พบมีถ่ายทอดไปสู่ลูกได้มากถึงร้อยละ 85 ในมารดาที่ตรวจพบ HBsAg และ HBeAg ในกระแสโลหิต

การติดต่อทางเพศสัมพันธ์ การติดต่อทางนี้พบมากในผู้ที่มีพฤติกรรมทางเพศแบบสำส่อน และไม่ป้องกัน และในชายรักร่วมเพศ⁽⁵⁾

การติดต่อโดยทางอื่น เช่นในคนที่อาศัยในบ้านเดียวกับผู้ที่มีการติดเชื้อยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอน

การรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบี

รักษาตามอาการ โดยมีเป้าหมายคือทำให้ไม่มีเซลล์ติดเชื้อไวรัสในระยะที่กำลังแบ่งตัว ปัจจุบันมีการใช้ยา อินเตอร์เฟอรอน และมีการพัฒนาการรักษาด้วยยาชนิดใหม่ เช่น lamivudin ซึ่งการใช้ยา จะมีผลข้างเคียง และอาจไม่สามารถกำจัด เชื้อไวรัสตับอักเสบบีหมดไปได้ ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีนอกจากจะเป็นการป้องกันภาวะตับอักเสบบีเฉียบพลัน ยังเป็นการป้องกันผลจากการติดเชื้อในระยะยาว รวมทั้งโรคมะเร็งตับได้ด้วย ปัจจุบันไวรัสตับอักเสบบี สามารถป้องกันได้ด้วยวัคซีน

วัคซีนในปัจจุบันประกอบด้วยส่วนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบบี เป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในทางปฏิบัตินำส่วน major surface antigen จากยีนโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบบี โคลนเข้าสู่สิ่งมีชีวิต แอนติเจนที่ได้ขนาด 22 นาโนเมตรและมีคุณสมบัติไม่แตกต่างจากอนุภาคที่ได้จากเลือดผู้ป่วยที่เป็นพาหะ

ไวรัสตับอักเสบบี เป็นไวรัสในแฟมิลี *Hepadnaviridae* ใน จีโนส *Orthohepadnavirus*⁽⁶⁾ รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 42 นาโนเมตร เป็นไวรัสที่มี envelope จีโนมของไวรัสตับอักเสบบี มีขนาดประมาณ 3200 คู่เบส ประกอบไปด้วย ส่วนที่แสดงออกเป็นยีน 4 ส่วน คือ S, C, X, และ P

ส่วน C ยีน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 183 ตัวและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21 kDa มีบทบาทในการรวมตัวกันเป็นโมเลกุลใหญ่ หรือ polymerization ให้เกิดเป็นรูปร่าง มีบทบาทสำคัญในการเกิดตับอักเสบบีเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี⁽⁷⁾

ส่วน P ยีน เป็นรหัสในการสร้างเอนไซม์ DNA polymerase โดยทำหน้าที่เป็น reverse transcriptase activity⁽⁸⁾ เป็น ส่วนที่มีการแสดงที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของ จีโนมยาว 2496 นิวคลีโอไทด์

ส่วน X ยีน เป็นรหัสในการสร้างส่วนโปรตีนซึ่งประกอบด้วย อะมิโน 154 ตัวทำหน้าที่เป็น transcriptional tran-activator มีความสำคัญในการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสภายในเซลล์⁽⁹⁾ X ยีน มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดมะเร็งตับภายหลังที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรัง โดยสร้าง โปรตีน ที่เรียกว่า HBxAg ไม่ทราบหน้าที่แต่อาจมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดมะเร็ง

ส่วน S ยีน สร้างโปรตีนสำหรับโปรตีนผิวไวรัส ประกอบไปด้วย S gene, PreS2 และ PreS1 โครงสร้างโปรตีน HBs จะมีแอนติเจนร่วมหรือ determinant เป็น "a" และมี subdeterminant ออกเป็น y หรือ d และ w หรือ r ทำให้จึงแบ่งชนิดได้เป็น adr ,adw ,ayr ,ayw พบว่าในคนไทยส่วนใหญ่จัดเป็น ad โดยพบเป็น adr ร้อยละ 58.1 adw2 ร้อยละ 41.9⁽¹⁰⁾ การให้วัคซีนป้องกัน ซึ่งมีประโยชน์มาก กับผู้ที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดโรคสูง ในประเทศไทยซึ่งเป็นแหล่งที่มีความชุกของโรคไวรัสตับอักเสบบีสูงโดยเฉพาะในเด็กและทารกแรกเกิด การให้ยีนจำเป็น วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบีที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน มี 2 ชนิด ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบบี ที่ได้จากพลาสมา (plasma derived vaccine)⁽¹¹⁾ และวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ที่ผลิตโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (recombinant DNA vaccine)

วัคซีนที่ได้จากพลาสมา ผลิตครั้งแรกในปี 1970 โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่มีเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มาทำให้เจือจางแล้วทำลายด้วยความร้อนสูงที่ 98 องศาเซลเซียส นาน 1 นาทีแล้วนำมาฉีดให้อาสาสมัคร วัคซีนชนิดนี้ได้รับการรับรองให้ใช้เป็นครั้งแรกและได้รับการจดทะเบียนในประเทศสหรัฐอเมริกาในปีพ.ศ 2524

plasma derived vaccine มีข้อจำกัดคือ

1. อาจมีเชื้ออื่น ที่ยังมีชีวิตปะปนมาในวัคซีน ซึ่งต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายเพื่อทดสอบความปลอดภัยก่อนนำไปใช้ ทำให้มีต้นทุนการผลิตที่สูง
2. แหล่งโลหิตจากผู้ป่วยที่เป็นพาหะโรคน้อย ซึ่งในปัจจุบันมีแนวโน้มที่ใช้น้อยลง และคาดว่าจะเลิกผลิตไปในที่สุด .

วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ที่ผลิตโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (recombinant DNA vaccine) เป็นวัคซีนที่ผลิตโดยการนำยีนส่วนที่ควบคุมการสร้าง HBsAg สอดใส่ในเวกเตอร์ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมซึ่งเรียกว่า recombinant DNA แล้วถ่ายใส่ในกลุ่ม แบคทีเรีย หรือ ยีสต์⁽¹²⁾ โดยให้แบคทีเรียหรือยีสต์สร้างสารตามที่ต้องการตามรหัสพันธุกรรม วัคซีนดังกล่าวที่ใช้ในการป้องกัน

กันไวรัสตับอักเสบบี ในปัจจุบัน โดยประกอบด้วย ส่วน major S antigen มีกรดอะมิโน 226 ตัว ซึ่งส่วนของ major protein นี้มี รูปแบบ 2 รูปแบบคือรูป nonglycosilat มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kDa และ รูปแบบ glycosilat มีน้ำหนักโมเลกุล 27 kDa ทั้งสองรูปแบบมีคุณสมบัติไม่แตกต่างจาก โปรตีนผิวที่พบในอนุภาคที่ได้จากโลหิตของผู้เป็นพาหะที่นำมาใช้เตรียม วัคซีนที่ได้จากพลาสมา recombinant DNA vaccine มีข้อดี เช่น ช่วย หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากโรคติดเชื้อชนิดอื่น และสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก แต่ วัคซีนดังกล่าวมีราคาแพงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้รัฐ ต้องเสียรายได้ นอกจากนี้ยังมีวัคซีนที่ได้จากการสร้างสายเปปไทด์ของ HBsAg มาทดลองใช้เป็น วัคซีน มีน้ำหนักโมเลกุล 25000 วัคซีนนี้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีในสัตว์ทดลอง⁽¹³⁾ ซึ่งส่วนยีน ที่ใช้สำหรับผลิตวัคซีนคือ ส่วน S

เมื่อพิจารณาระบบในการผลิตวัคซีนไม่ว่าจะเป็นระบบใดก็ตามจะพบว่าส่วนของ โปรตีนผิวไวรัสตับอักเสบบีมีความสำคัญ ดังนั้นการพัฒนาเพื่อผลิตวัคซีนในประเทศทดแทนการนำ เข้าผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูงกว่า นอกจากจะช่วยให้ประหยัดเงินตราและพึ่งพาตัว เองได้แล้วยังสามารถให้วัคซีนที่มีต้นทุนต่ำกว่านี้กับทุกคนได้ จึงไม่จำเป็นต้องจัดลำดับความ สำคัญของกลุ่มผู้เสี่ยงอย่างที่ทำกันอยู่ในปัจจุบัน ประเด็นสำคัญอยู่ที่การพัฒนา การผลิตวัคซีน โดยใช้โปรตีนผิวเป็นแอนติเจน ของไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ของคนไทย และการสร้างระบบ การแสดงออก โดยถ่ายยีนเข้าสู่ *E.coli* โดยส่วน DNA ที่โคลนเข้าไปมีรูปแบบการสร้าง HBsAg เหมือนในธรรมชาติ และมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี โดยไม่มีส่วน ของ HBcAg หรือ HBeAg ที่อาจทำให้เกิดโรคได้

ยีนที่โคลนได้ดังกล่าวใช้เป็นวัสดุวิจัยพื้นฐานในการศึกษาคุณลักษณะของยีน และโปรตีน ที่ได้ สามารถนำไปใช้ร่วมในการตรวจสอบวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังให้ความสำคัญ กับการศึกษาความเป็นไปได้เบื้องต้นในการผลิตวัคซีนในระบบใหม่ เช่น ในระบบพีชชั้นต่ำ ในที่นี้ คือ สาหร่าย ซึ่งสาหร่ายที่ใช้เป็น สาหร่ายสีเขียว มีเซลล์เดียวไม่มีผนังเซลล์ ภายในเซลล์มี คลอโรฟิล เอ และคลอโรฟิล บี เช่นเดียวกับพีช จึงเป็นระบบใกล้เคียงกับพีชมากที่สุด^(14,15) สาหร่ายเซลล์ เดียวเจริญเติบโตได้รวดเร็ว โดยอาศัยพลังงานจากการสังเคราะห์แสง

นอกจากนี้สาหร่ายโครงสร้างไม่ซับซ้อน จึงทำให้การฝากถ่ายยีนและการตรวจสอบทำได้ ง่ายโอกาสประสบความสำเร็จสูงและการเพาะเลี้ยงสาหร่ายในน้ำเค็ม สามารถควบคุมให้เป็น pure culture ทำได้ง่าย โอกาสการปนเปื้อนต่ำมาก โดยเฉพาะสาหร่ายน้ำเค็มที่มาเลี้ยงในห้อง ปฏิบัติการ การพัฒนาระบบวัคซีนในสาหร่าย ยังมีการศึกษาที่น้อยมาก จึงเป็นระบบการผลิต แอนติเจนที่น่าสนใจ และที่สำคัญถ้าประสบความสำเร็จเกษตรกรสามารถนำสาหร่ายมาเลี้ยงโดย

วิธีที่ง่ายกว่าและช่วยกระจายรายได้ การศึกษาในสวนนี้เป็นการศึกษาแนวทางเริ่มต้นเพื่อนำไปสู่การถ่ายฝากยีนซึ่งเชื่อมโยงไปสู่การจดสิทธิบัตรได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.โคลนยีนส่วน โปรตีนผิวไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์คนไทยในระบบของ *E.coli* ที่เป็นระบบมาตรฐานทั่วไป
- 2.ศึกษาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของคนไทย และสายพันธุ์จากต่างประเทศ
- 3.ศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาระบบการแสดงออกโปรตีนในระบบสาหร่าย

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการโคลนดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี เข้า *E.coli* ศึกษาลำดับพันธุกรรมและพัฒนา ระบบการแสดงออกพร้อมตรวจสอบโดยใช้วิธี dot blot และ western blot ทำการ ศึกษาความเป็นไปได้ในการถ่ายยีน ดีเอ็นเอลูกผสมของไวรัสตับอักเสบบี เข้าสู่สาหร่าย

ข้อตกลงเบื้องต้น

ผู้ป่วย HBsAg บวก คือผู้ป่วยที่ตรวจโรคโดยวิธี ELISA ซึ่งหมายถึงผู้ป่วยมีเชื้อ HBV อยู่ในร่างกาย

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากระบบการผลิตวัคซีนในสาหร่าย ยังมีผู้ศึกษากันน้อยมาก โอกาสที่จะประสบความสำเร็จหรืออาจจะไม่ประสบผลไม่สามารถคาดเดาได้ อย่างไรก็ตามผลที่ได้จะเป็นแนวทางการศึกษาเบื้องต้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานจะช่วยให้สามารถวางแผนทางการศึกษาต่อไปในอนาคตได้

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- HBsAg
- Cloning
- ELISA
- dot blot
- western blot
- Algae
- *E.coli*

- GFP

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ชิ้นส่วนของโปรตีนผิวไวรัสตับอักเสบบี ที่เชื่อมโยงไปสู่การผลิตวัคซีนหรือเป็นส่วนร่วมใน
2. ผลิตน้ำยาตรวจแอนติบอดีหรือศึกษาการแสดงออกของไวรัส
3. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์จากต่างประเทศ
4. ได้ระบบการผลิตใน *E.coli* ต้นแบบซึ่งอาจจะพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในการผลิตวัคซีนต่อไป
5. ได้ข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาระบบการผลิตวัคซีนในสาหร่าย เพื่อปูทางไปสู่งานวิจัยนวัตกรรมในอนาคต

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

ขั้นตอนในการเสนอผล

1. แสดงผลการโคลนยีน HBs ในระบบแบคทีเรียและการตรวจพิสูจน์ว่ามียีน HBs จากไวรัสตับอักเสบบี เชื่อมอยู่กับเวกเตอร์ โดยใช้วิธี PCR และ Sequencing
 2. ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน HBs จากไวรัสตับอักเสบบี โดยจะแสดงผล
 - 2.1 เวลาที่เริ่มมีการแสดงออกของโปรตีน ด้วยการทำให้ SDS PAGE
 - 2.2 คุณสมบัติโปรตีน HBs ซึ่งเป็น แอนติเจนสามารถจับกับแอนติบอดี ของ HBs ได้โดยใช้วิธี dot blot ทดสอบคุณสมบัติโปรตีน HBs หลังจากตัดโปรตีนเชื่อมออกแล้ว โดยใช้ Thrombin แล้วนำมาทดสอบโดยวิธี western blot
3. ศึกษาความเป็นไปได้ในการฝากถ่ายยีนโปรตีนผิวจากไวรัสตับอักเสบบี เข้าสู่ระบบสาหร่าย *Dunaliella sp*
 - 3.1 ฝากถ่ายยีนจากไวรัสตับอักเสบบี เข้าสู่สาหร่าย
 - 3.2 การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการฝากถ่ายยีนเข้าสู่ระบบสาหร่ายโดยการใช้นิวคลีโอไทด์ GFP ฝากถ่ายเข้าสู่สาหร่าย *Dunaliella sp*