

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4*
และ *IP-10* กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่มเพคอินเตอร์เฟอรอน
ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง



นางสาวอุมาพร ลิ้มทัฬห

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Associations of *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* and *IP-10* gene polymorphisms
with PEG-interferon-based treatment in Thai patients with chronic hepatitis B

Miss Umaporn Limothai



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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>HLA-DPA1</i> , <i>IL28B</i> , <i>IFNL4</i> และ <i>IP-10</i> กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากุ่มเพคตินเตอร์เฟอร์อนในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง |
| โดย | นางสาวอุมาพร ลิ้มทัย |
| สาขาวิชา | ชีวเคมีทางการแพทย์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ |

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันชัย พยุงภร)
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร ชินชัย)

อุมาพร ลิ้มทัฬหี : ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* และ *IP-10* กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่มเพคอินเตอร์เฟอรอนในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (Associations of *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* and *IP-10* gene polymorphisms with PEG-interferon-based treatment in Thai patients with chronic hepatitis B) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ. พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, 65 หน้า.

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (Chronic Hepatitis B, CHB) เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญ ปัจจุบันยาหลักที่ใช้ในการรักษา CHB คือ pegylated interferon (PEG-IFN) มีหลักฐานจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองต่อการรักษาสัมพันธ์กับปัจจัยทางพันธุกรรมของผู้ป่วย การวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของผู้ป่วย (single nucleotide polymorphisms ,SNPs) และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วย CHB โดยทำการตรวจวิเคราะห์ SNPs ในบริเวณยีน *Human leukocyte antigen-DPA1 (HLA-DPA1)* ตำแหน่ง rs3077 และยีน *Interferon lambda 4 (IFNL4)* ตำแหน่ง ss469415590 ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR และตรวจวิเคราะห์ SNPs บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *IFN- γ induces protein 10 (IP-10)* ตำแหน่ง G-201A และยีน *Interleukin-28B (IL28B)* ตำแหน่ง rs12979860 ด้วยวิธี Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ในกลุ่มผู้ป่วย CHB ที่ได้รับการรักษาด้วยยา PEG-IFN เป็นเวลา 48 สัปดาห์ โดยผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB การตอบสนองต่อการรักษา (Virological response, VR) หมายถึง การเกิด HBeAg seroconversion และระดับ HBV DNA <2,000 IU/mL ที่ 24 สัปดาห์หลังจากหยุดยา และในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB การตอบสนองต่อการรักษาหมายถึง ระดับ HBV DNA <2,000 IU/mL ที่ 48 สัปดาห์หลังจากหยุดยา จากการวิเคราะห์ข้อมูลผู้ป่วยทั้งหมด 254 ราย โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ HBeAg-positive CHB จำนวน 107 ราย และ HBeAg-negative CHB จำนวน 147 ราย พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB SNP บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการเกิด VR และระดับ IP-10 ในซีรัมก่อนการรักษา ในขณะที่ SNPs ในบริเวณยีน *HLA-DPA1*, *IL28B* และ *IFNL4* ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิด VR จากการวิเคราะห์ที่ในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB พบว่า SNP ในบริเวณยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการเกิด VR และการเกิด HBsAg clearance ในขณะที่ SNP บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A จีโนไทป์ GG ไม่สัมพันธ์กับการเกิด VR แต่สัมพันธ์กับระดับ Alanine Aminotransferase (ALT) ก่อนการรักษา และพบว่า SNPs ในบริเวณยีน *IL28B* และ *IFNL4* ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิด VR ดังนั้นการค้นพบเหล่านี้จึงเป็นหลักฐานสำคัญที่บ่งชี้ว่า SNP ตำแหน่ง G-201A ของยีน *IP-10* สัมพันธ์กับ VR ในผู้ป่วย HBeAg-positive CHB และ SNP ตำแหน่ง rs3077 ของยีน *HLA-DPA1* สัมพันธ์กับ VR ในผู้ป่วย HBeAg-negative CHB ซึ่งอาจช่วยในการระบุตัวพยากรณ์ (predictors) ผลการรักษาซึ่งเป็นการลดค่าใช้จ่ายและผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ได้

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5674097030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: CHRONIC HEPATITIS B (CHB) / SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) / HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN-DPA1 (HLA-DPA1) / INTERLEUKIN-28B (IL28B) / INTERFERON LAMBDA 4 (IFNL4) / INTERFERON-GAMMA-INDUCIBLE PROTEIN 10 / PEGYLATED INTERFERON (PEG IFN) / TREATMENT RESPONSE

UMAPORN LIMOTHAI: Associations of *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* and *IP-10* gene polymorphisms with PEG-interferon-based treatment in Thai patients with chronic hepatitis B. ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., CO-ADVISOR: PROF. PISIT TANGKIJVANICH, M.D., 65 pp.

Chronic Hepatitis B (CHB) is an importance health problem. At present, the major drug for CHB is pegylated interferon (PEG-IFN). Several evidences indicated that host genetic factors associated with response to PEG-IFN treatment. This study aims to demonstrate the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and PEG-IFN treatment response in CHB patients. The SNPs rs3077 in the *Human leukocyte antigen-DPA1 (HLA-DPA1)* gene and ss469415590 in the *Interferon lambda 4 (IFNL4)* gene were identified by TaqMan probe real-time PCR, whereas the SNPs G-201A in the promoter region of *IFN- γ induces protein 10 (IP-10)* gene and rs12979860 in the *Interleukin-28B (IL28B)* gene were identified by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). We retrospectively analyzed data of Thai patients with CHB treated with PEG-IFN for 48 weeks. Virological response (VR) for HBeAg-positive CHB was defined as HBeAg seroconversion plus HBV DNA level <2,000 IU/mL at 24 weeks post treatment. VR for HBeAg-negative CHB was defined as HBV DNA level <2,000 IU/mL at 48 weeks post treatment. A total 254 patients (107 HBeAg-positive and 147 HBeAg-negative) were enrolled in the study. In HBeAg-positive CHB, the GG genotype of G-201A in *IP-10* was significantly associated with VR and pretreatment serum IP-10 level, whereas the other SNPs were not associated with VR. In HBeAg-negative CHB, the GG genotype of rs3077 in *HLA-DPA1* was significantly associated with VR and HBsAg clearance. Besides, the GG genotype of G-201A in *IP-10* was associated with baseline serum Alanine Aminotransferase (ALT) level but not associated with VR. There was no significant correlation between the *IL28B* or *IFNL4* SNP genotypes and VR in both groups of patients. Therefore, these findings provided important evidence that SNP G-201A in *IP-10* was associated with VR in HBeAg-positive CHB patients and SNP rs3077 in *HLA-DPA1* was associated with VR in HBeAg-negative CHB patients and may help to identify predictors of treatment outcome, which will in turn significantly reduce the cost/effect of PEG-IFN therapy.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไม่ได้หากขาด ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโทและได้ทำการศึกษาร่วมกันในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์เพียบพร้อมและทันสมัย ท่านได้ชี้แนะแนวความคิดของการเป็นนักวิจัยที่ดี พร้อมทั้งให้คำปรึกษาแนะนำอันมีประโยชน์และคุณค่าอย่างยิ่งต่อผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยถ่ายทอดวิชาความรู้ ให้คำปรึกษา อีกทั้งยังช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา รวมทั้งช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอระลึกถึงความกรุณาของท่านตลอดไป

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิญชัย พยุงภกร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย และรองศาสตราจารย์ ดร.ธีรพร ชินชัย กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้สละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ อีกทั้งกรุณาให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ พร้อมทั้งปลูกฝังคุณงามความดีให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาระดับปริญญาโทและปริญญาตรีในครั้งนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่กรุณาช่วยเหลือในด้านต่างๆมาโดยตลอด

ขอขอบคุณเจ้าของตัวอย่างเลือดทุกท่านที่ยินยอมให้ใช้ตัวอย่างเพื่องานวิจัยนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และสมาชิกในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิกที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนแนะนำเทคนิคในการทำงานวิจัย และช่วยเหลือในด้านต่างๆเสมอมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัย Research Unit of Hepatitis and Liver Cancer ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ นายกิตติ และ นางชลธิชา ลิ้มทัย บิดาและมารดาผู้ให้กำเนิด รวมทั้งสมาชิกในครอบครัวทุกท่าน ที่ได้วางรากฐานชีวิตและมอบโอกาสที่ดีในการศึกษา พร้อมทั้งให้ความรักความอบอุ่นและเป็นกำลังใจที่สำคัญยิ่งต่อผู้วิจัยเสมอมา คุณค่าและคุณประโยชน์ของงานวิจัยเล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ทุกท่านที่มีส่วนร่วมในความสำเร็จครั้งนี้ ขอขอบพระคุณค่ะ

สารบัญ

| | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | จ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฉ |
| สารบัญ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฅ |
| สารบัญรูป..... | ฉ |
| สารบัญแผนภาพ..... | ช |
| บทที่ 1 บทนำ..... | 1 |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... | 1 |
| คำถามของการวิจัย..... | 3 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... | 3 |
| สมมติฐานของการวิจัย..... | 4 |
| ข้อจำกัดของการวิจัย..... | 5 |
| คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย..... | 5 |
| คำสำคัญ..... | 6 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 6 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 7 |
| สารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี..... | 7 |
| Hepatitis B e Antigen (HBeAg) และ Hepatitis B e antibody (anti-HBe)..... | 7 |
| ระยะของการติดเชื้อ CHB..... | 8 |
| การแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามผลการตรวจของ HBeAg..... | 9 |
| การรักษาผู้ป่วย CHB..... | 9 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Human leukocyte antigen (HLA)-DPA1</i> และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN..... | 12 |
| <i>Interleukin-28B (IL28B)</i> และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN..... | 14 |
| <i>Interferon lambda 4 (IFNL4)</i> และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN | 17 |
| <i>IFN-γ induces protein 10 (IP-10)</i> | 18 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... | 20 |
| รูปแบบการวิจัย | 20 |
| ประชากรที่ศึกษา..... | 20 |
| กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population) | 20 |
| เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)..... | 20 |
| เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดออก (Exclusion criteria) | 20 |
| การคำนวณขนาดของกลุ่มประชากรตัวอย่าง (Sample size) | 21 |
| วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... | 22 |
| อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย | 22 |
| สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย | 23 |
| โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ | 24 |
| วิธีดำเนินการวิจัย | 25 |
| 1. การสกัด DNA..... | 25 |
| 2. การตรวจความหลากหลายของยีน <i>HLA-DPA1</i> rs3077 โดยเทคนิค <i>TaqMan</i> probe real-time PCR..... | 26 |
| 3. การตรวจความหลากหลายของยีน <i>IFNL4</i> ss469415590 โดยเทคนิค <i>TaqMan</i> probe real-time PCR..... | 27 |
| 4. การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860 โดยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)..... | 28 |

| | | |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. | การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A โดยเทคนิค PCR-RFLP..... | 31 |
| 6. | การวัดปริมาณ <i>IP-10</i> ในซีรัมของผู้ป่วยก่อนการรักษา..... | 33 |
| 7. | การรวบรวมข้อมูล (Data collection)..... | 34 |
| 8. | การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) | 34 |
| บทที่ 4 ผลการทดลอง..... | | 35 |
| 1. | ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน <i>HLA-DPA1</i> rs3077 | 35 |
| 2. | ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน <i>IFNL4</i> ss469415590..... | 36 |
| 3. | ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860..... | 37 |
| 4. | ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A | 38 |
| 5. | ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มประชากรที่ใช้ในงานวิจัย | 39 |
| 6. | ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>HLA-DPA1</i> , <i>IL28B</i> , <i>IFNL4</i> และ <i>IP-10</i> กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่มเพคอินเตอร์เฟอรอนในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง | 42 |
| 6.1 | ยีน <i>HLA-DPA1</i> ตำแหน่ง rs3077 | 42 |
| 6.2 | ยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860..... | 43 |
| 6.3 | ยีน <i>IFNL4</i> ตำแหน่ง ss469415590..... | 43 |
| 6.4 | ยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A | 43 |
| 7. | การวัดปริมาณ <i>IP-10</i> ในซีรัมของผู้ป่วย HBeAg positive CHB ก่อนการรักษา..... | 46 |
| บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง | | 47 |
| | ยีน <i>HLA-DPA1</i> ตำแหน่ง rs3077 ในผู้ป่วย HBeAg positive CHB | 47 |
| | ยีน <i>HLA-DPA1</i> ตำแหน่ง rs3077 ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB | 48 |
| | ยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860 และ <i>IFNL4</i> ตำแหน่ง ss469415590 ในผู้ป่วย HBeAg-positive CHB และ HBeAg-negative CHB..... | 49 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| ยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A ในผู้ป่วย HBeAg positive CHB | 52 |
| ยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB | 53 |
| รายการอ้างอิง | 54 |
| ภาคผนวก..... | 63 |
| การเตรียมสารเคมี | 63 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ | 65 |



สารบัญตาราง

| | | |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ตารางที่ 1 | สารที่ใช้ในการทำ TaqMan probe real-time PCR สำหรับยีน <i>HLA-DPA1</i> rs3077.. | 26 |
| ตารางที่ 2 | สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ TaqMan probe real-time PCR สำหรับยีน <i>HLA-DPA1</i> rs3077 | 26 |
| ตารางที่ 3 | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ probe และ primer ที่ใช้ในการทำ TaqMan probe real-time PCR สำหรับยีน <i>IFNL4</i> ss469415590..... | 27 |
| ตารางที่ 4 | สารที่ใช้ในการทำ TaqMan probe real-time PCR สำหรับยีน <i>IFNL4</i> ss469415590 | 27 |
| ตารางที่ 5 | สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ TaqMan probe real-time PCR สำหรับยีน <i>IFNL4</i> ss469415590 | 28 |
| ตารางที่ 6 | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860 | 29 |
| ตารางที่ 7 | สารที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860..... | 29 |
| ตารางที่ 8 | สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR สำหรับยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860 | 30 |
| ตารางที่ 9 | ขนาดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR-RFLP ของยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ | 30 |
| ตารางที่ 10 | สารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR สำหรับยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860 | 30 |
| ตารางที่ 11 | ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A..... | 31 |
| ตารางที่ 12 | สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR สำหรับยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A | 31 |
| ตารางที่ 13 | สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A..... | 32 |
| ตารางที่ 14 | ขนาดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR-RFLP ของยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ | 32 |

ตารางที่ 15 สารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR สำหรับยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A..... 32

ตารางที่ 16 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย HBeAg-positive CHB ซึ่งแบ่งกลุ่มตามการตอบสนองต่อการรักษา..... 40

ตารางที่ 17 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย HBeAg-negative CHB ซึ่งแบ่งกลุ่มตามการตอบสนองต่อการรักษา..... 41

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ (Logistic regression analysis) ปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการรักษา (virological response)..... 45

ตารางที่ 19 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในประเทศต่างๆ..... 51



สารบัญรูป

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| รูปที่ 1 | ระยะต่างๆของ CHB | 8 |
| รูปที่ 2 | การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อการติดเชื้อ HBV..... | 13 |
| รูปที่ 3 | การเหนี่ยวนำให้เกิดวิถี Janus kinase (JAK/STAT) โดย IFN- λ และ IFN- α | 15 |
| รูปที่ 4 | ตัวอย่างผล real-time RCR ของยีน <i>HLA-DPA1</i> ตำแหน่ง SNP rs3077 | 35 |
| รูปที่ 5 | ตัวอย่างผล real-time RCR ของยีน <i>IFNL4</i> ตำแหน่ง ss469415590..... | 36 |
| รูปที่ 6 | ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860 | 37 |
| รูปที่ 7 | ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน <i>IP-10</i> ตำแหน่ง G-201A..... | 38 |
| รูปที่ 8 | ระดับ HBsAg ระหว่างการรักษาและระหว่างการติดตามการรักษา ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB ที่มีจีโนไทป์ของ <i>HLA-DPA1</i> rs3077 แตกต่างกัน | 42 |
| รูปที่ 9 | ระดับ HBsAg ระหว่างการรักษาและระหว่างการติดตามการรักษา ในผู้ป่วย HBeAg positive CHB ที่มีจีโนไทป์ของ <i>IP-10</i> G-201A แตกต่างกัน..... | 44 |
| รูปที่ 10 | ระดับ IP-10 ในซีรัมของผู้ป่วย HBeAg positive CHB ก่อนการรักษาในผู้ป่วยกลุ่ม จีโนไทป์ GG และ non-GG | 46 |

สารบัญแผนภาพ

| | |
|-------------------------------------------|---|
| แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย..... | 4 |
|-------------------------------------------|---|



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus, HBV) เป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญ ปัจจุบันพบว่ามีผู้ติดเชื้อประมาณ 350 ล้านคนทั่วโลก (1) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (Chronic Hepatitis B, CHB) จะมีความเสี่ยงในการดำเนินโรคที่นำไปสู่การเป็นตับแข็ง มะเร็งตับ และเสียชีวิตในที่สุด โดยยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วย CHB ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ pegylated interferon (PEG-IFN) และ nucleos(t)ide analogs (NA) ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัสต่างกัน (2) ยากลุ่ม NA ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase เป็นการต้านการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยตรง ในขณะที่ยากลุ่ม PEG-IFN ออกฤทธิ์กระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune modulatory effect) โดยเฉพาะการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cellular immune response) ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาผลการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วย CHB ในประเทศไทย พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB มีการตอบสนองต่อการรักษาเพียงร้อยละ 36 ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB มีการตอบสนองต่อการรักษาเพียงร้อยละ 35 (3) นอกจากนี้ข้อจำกัดของยากลุ่มนี้ คือ มีราคาแพง ต้องบริหารยาโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และมีผลข้างเคียงต่างๆ จากการรักษา ในทางตรงข้าม ยากลุ่ม NA เป็นยารับประทาน มีผลข้างเคียงน้อย มีประสิทธิภาพมากในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส แต่มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานานและมีโอกาสดื้อยาสูง (2)

ผู้ติดเชื้อ HBV แต่ละคนมีการดำเนินโรคและความรุนแรงของโรคตับอักเสบบีแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยแต่ละคน ผู้ที่มีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพียงพอและเหมาะสมจะสามารถควบคุมและขจัดเชื้อไวรัสให้หมดไปได้ แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวผู้ป่วย เช่น ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา PEG-IFN ยังคงเป็นสิ่งที่สำคัญ (4) ดังนั้นการศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมของผู้ป่วยที่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อไวรัส อาจช่วยในการระบุตัวพยากรณ์ (predictors) ผลการรักษาซึ่งเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายและผลข้างเคียงจากการรักษาได้ (5, 6)

การศึกษาความสัมพันธ์ของทั้งจีโนม (genome-wide association study หรือ GWAS) และการศึกษาความสัมพันธ์อื่นๆ ได้ระบุว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (single nucleotide

polymorphisms หรือ SNPs) ในยีน *Human leukocyte antigen (HLA)-DP* สัมพันธ์กับ CHB โดยพบ SNP ตำแหน่ง rs3077 อยู่บนยีน *HLA-DPA1* ซึ่งเป็นหนึ่งใน SNPs ที่มีความสัมพันธ์อย่างมากกับการหายจากการติดเชื้อหรือการคงอยู่ของเชื้อ HBV (7-9) โดย *HLA-DPA1* เป็นยีนที่ควบคุมและกำหนดการสร้าง HLA class II บนผิวเซลล์ของ Antigen presenting cell (APC) ต่างๆ HLA class II มีหน้าที่สำคัญในการนำเสนอเปปไทด์ของแอนติเจนให้แก่ CD4+ T cell ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ HBV (10, 11)

การศึกษาด้านไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C Virus, HCV) ได้มีการค้นพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *interleukin-28B (IL28B)* ที่ตำแหน่ง rs12979860 มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรัง (Chronic Hepatitis C, CHC) (12) โดยผู้ป่วยที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมบนตำแหน่ง rs12979860 เป็นแบบจีโนไทป์ CC มีอัตราการตอบสนองทางไวรัสวิทยา (virological response) และการหายขาดจากการติดเชื้อ (Sustained virologic response, SVR) สูงกว่าจีโนไทป์อื่น (13, 14)

IL28B เป็นไซโตไคน์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส ทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เกิดวิถี Janus kinase (JAK/STAT) การเหนี่ยวนำวิถีดังกล่าวส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนกลุ่ม interferon-stimulated genes (ISG) มากขึ้นจนนำไปสู่การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส (15) แต่ความเข้าใจในแง่การติดเชื้อ CHB ในปัจจุบันยังคงไม่ชัดเจน โดยมีหลายงานวิจัยที่ทำการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ในผู้ติดเชื้อ CHB กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN และมีบางงานวิจัยที่ให้ผลขัดแย้งกัน

นอกจากนี้การศึกษาด้าน HCV ล่าสุดได้มีการค้นพบความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณเหนือ (upstream) ยีน *IL28B* คือ ตำแหน่ง ss469415590 ซึ่งมี 2 รูปแบบ คือ delete G (ΔG) และ TT โดยรูปแบบ ΔG เกิดจากการขาดหายไปของเบส 1 เบส (one-base deletion) ทำให้กรอบการอ่านรหัสพันธุกรรมบนดีเอ็นเอเลื่อนไปจากเดิม (frame shift) ส่งผลให้เกิดการผลิตโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งให้ชื่อว่า interferon lambda 4 (IFNL4) แบบเต็มความยาว (full-length protein) ในขณะที่รูปแบบ TT จะไม่สร้าง IFNL4 จากนั้นได้มีการศึกษาพบว่า รูปแบบ ΔG ของ *IFNL4* สัมพันธ์กับความบกพร่องในการขจัดเชื้อ HCV และการตอบสนองการรักษาด้วยยา PEG-IFN ร่วมกับ ribavirin โดย IFNL4 เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ ISG และส่งผลให้เซลล์ตับเกิดการตอบสนองต่อไวรัส ซึ่งมีรูปแบบที่คล้ายกับการเหนี่ยวนำโดย IL28B แต่ทำให้การขจัดเชื้อ HCV แย่ลง อย่างไรก็ตามก็ตีกลไกดังกล่าวในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งจากหลายงานวิจัยที่ระบุว่า rs12979860 บริเวณ *IL28B*

สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ทั้งในผู้ป่วย CHC และ CHB ดังนั้นการรักษาโดยการยับยั้ง *IFNL4* จึงอาจใช้เป็นเป้าหมายทางชีวภาพใหม่ ในการรักษาผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวได้ นอกจากนี้ จีโนไทป์ของ *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590 สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกผู้ป่วยที่เหมาะสมกับรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN (16, 17)

มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบจะมีระดับ IFN- γ induces protein 10 (IP-10) ในเลือดสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HCV และ HBV จากการศึกษาในผู้ป่วย CHC พบว่าการแสดงออกของ IP-10 สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค และการอักเสบของตับ (18) โดยในปัจจุบันการแสดงออกของ IP-10 ในเลือดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *IL28B* จัดว่าเป็นตัวพยากรณ์การรักษาที่ดีที่สุด ซึ่งใช้ข้อมูลร่วมกันทำนายความเป็นไปได้ในการขจัดไวรัสโดยธรรมชาติในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HCV (19) ซึ่ง IP-10 เป็นคีโมไคน์ ที่ทำหน้าที่กระตุ้น (chemo-attracts) NKT cell โดยการจับกับ CXCR3 ligand ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (52) สำหรับการศึกษาด้าน HBV พบว่า SNP ตำแหน่ง G-201A ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *IP-10* (อยู่ระหว่างลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจับของ nuclear factor $\kappa\beta 1$ และ nuclear factor $\kappa\beta 2$) สัมพันธ์กับความไวต่อการดำเนินโรค CHB นอกจากนี้ยังพบว่า SNP ตำแหน่ง G-201A รูปแบบอัลลีล A และจีโนไทป์ AA สามารถกระตุ้น (enhancer) กระบวนการถอดรหัสพันธุกรรมของโปรโมเตอร์ ส่งผลให้กระตุ้นการแสดงออกของ *IP-10* ได้สูงกว่าจีโนไทป์อื่น (20)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 ยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 ยีน *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590 และ ยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ CHB

คำถามของการวิจัย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* และ *IP-10* มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ CHB หรือไม่

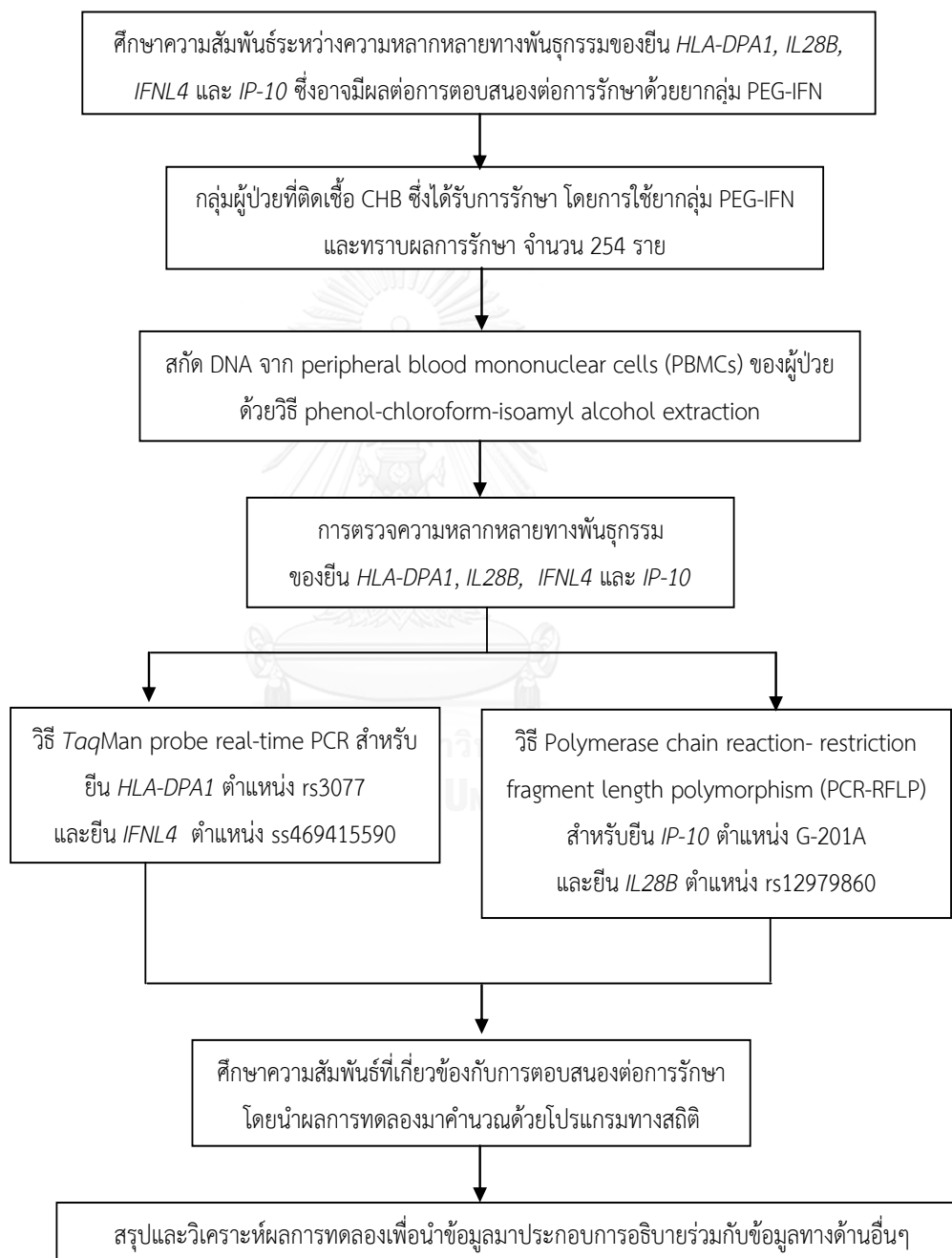
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* และ *IP-10* กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ CHB

สมมติฐานของการวิจัย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* และ *IP-10* มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ CHB

กรอบแนวความคิดในการวิจัย



แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

ข้อจำกัดของการวิจัย

ตัวอย่างซีรัมก่อนการรักษาของผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB มีไม่ครบทุกราย จึงไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ IP-10 ในผู้ป่วยบางรายได้

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

1. ผู้ป่วยติดเชื้อ CHB หมายถึง
 - บุคคลผู้มี HBsAg ในกระแสโลหิตนานกว่า 6 เดือน และตรวจไม่พบ anti-HBs antibody
 - มีระดับ HBV DNA ในกระแสโลหิตมากกว่า 2,000 IU/ml
 - มีระดับเอนไซม์ ALT ในเลือดเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ
 - ไม่มีอาการของโรคตับอื่น ๆ รวม
2. HBeAg-positive CHB หมายถึงผู้ที่ตรวจพบ HBeAg และมีระดับ HBV DNA ในเลือดมากกว่า 20,000 IU/ml
3. HBeAg-negative CHB หมายถึงผู้ที่ตรวจไม่พบ HBeAg และมีระดับ HBV DNA ในเลือดมากกว่า 2,000 IU/ml
4. การตอบสนองต่อการรักษา (Virological response, VR)
 - ผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB การตอบสนองต่อการรักษา หมายถึง การเกิด HBeAg seroconversion และระดับ HBV DNA <2,000 IU/mL ที่ 24 สัปดาห์หลังจากหยุดยา
 - ผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB การตอบสนองต่อการรักษาหมายถึง ระดับ HBV DNA <2,000 IU/mL ที่ 48 สัปดาห์หลังจากหยุดยา
5. การไม่ตอบสนองต่อการรักษา (Non-Virological response, Non-VR) หมายถึงผู้ป่วยที่ไม่เกิดผลการรักษาตามนิยามในข้อ 4

คำสำคัญ

Hepatitis B virus (HBV)

Single nucleotide polymorphism (SNP)

Human leukocyte antigen (HLA)-DP

Interleukin-28B (IL28B)

Interferon lambda 4 gene (IFNL4)

Interferon-gamma (IFN- γ)-inducible protein-10 (IP-10)

PEG-interferon-based therapy (PEG-IFN)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* และ *IP-10* กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ CHB และอาจใช้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนเหล่านี้เป็น predictor เพื่อใช้ในการคัดเลือกผู้ป่วยในการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus, HBV) มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่แบบวงกลม ไม่สมบูรณ์ (partially double-stranded DNA) ซึ่งมีสายลบที่มีความยาวเต็มตลอดยีนโนมขนาดประมาณ 3200 นิวคลีโอไทด์ และสายบวกที่มีขนาดไม่แน่นอน สายลบประกอบด้วย 4 open reading frames (ORFs) ทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีนต่างๆของไวรัส ได้แก่ (21)

1. S-ORF ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่ผิว (surface protein) หรือ HBsAg
2. C-ORF ทำหน้าที่สร้าง HBcAg หรือโปรตีน core และ Hepatitis B e antigen (HBeAg)
3. P-ORF ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ DNA polymerase หรือ reverse transcriptase
4. X-ORF ทำหน้าที่สร้าง Hepatitis B x antigen (HBxAg)

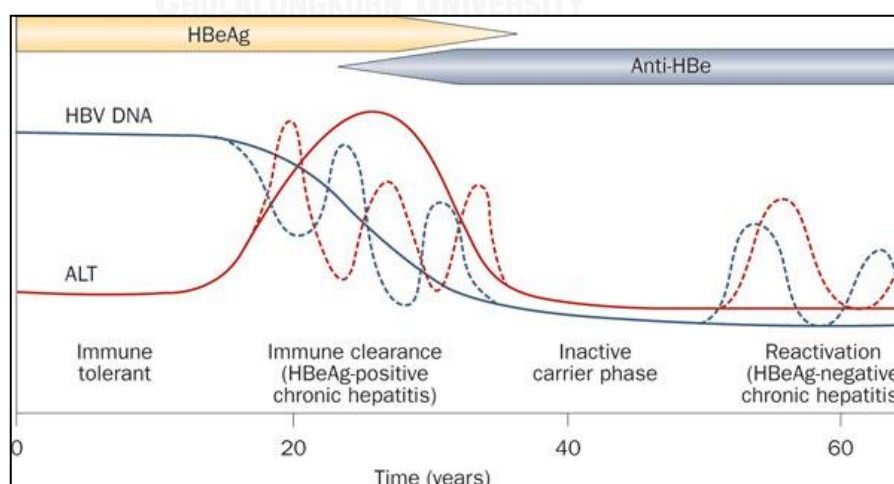
Hepatitis B e Antigen (HBeAg) และ Hepatitis B e antibody (anti-HBe)

HBeAg เป็นโปรตีนที่สร้างจากส่วน precore ของ HBV ในระหว่างที่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ตับ โดยจัดเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีไวรัสในเลือดจำนวนมากและมีโอกาสแพร่เชื้อไปสู่ผู้อื่นสูง สามารถตรวจพบ HBeAg ในระยะเวลาสั้นๆหลังจากตรวจพบ HBsAg คือประมาณ 6-12 สัปดาห์ของการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน หลังจากนั้นปริมาณ HBeAg จะค่อยๆลดลงจนหายไปและตรวจพบ anti-HBe แทน เรียกกระบวนการนี้ว่า HBeAg seroconversion พร้อมกับมีระดับ HBV DNA ในเลือดลดต่ำลง หากมีการตรวจพบ HBeAg ได้นานกว่า 4 เดือนของการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน แสดงว่ามีโอกาสดำเนินโรคต่อไปเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรังสูง ในผู้ป่วย CHB หากตรวจพบ HBeAg (HBeAg-positive CHB) โดยทั่วไปมักมีระดับ HBV DNA สูงกว่ากรณีตรวจไม่พบ HBeAg (HBeAg-negative CHB) โดย HBeAg-negative CHB เกิดจากการกลายพันธุ์ของไวรัส HBV ในส่วน precore ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1896 (G1896A) หรือมีการกลายพันธุ์ที่ basic core promoter (BCP) ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1762 ร่วมกับ 1764 (A1762T และ G1764A) ทำให้ไวรัสไม่สามารถสร้าง HBeAg ได้ หรือสร้างได้ปริมาณน้อยจนตรวจไม่พบ HBeAg ในเลือด แต่ยังคงตรวจพบ HBV DNA ในระดับสูงเนื่องจากรังยังมีจำนวนของไวรัสได้ตามปกติ (22)

ระยะของการติดเชื้อ CHB

ระยะของโรคในผู้ป่วย CHB แบ่งออกเป็น 4 ระยะ (phase) ดังรูปที่ 1 คือ

1. Immune tolerant phase เป็นระยะแรกของ CHB ซึ่งระยะนี้อาจนานกว่า 10 ปีขึ้นไป มักพบในผู้ป่วยที่อายุน้อย เช่นในเด็กและวัยรุ่น เป็นระยะที่ตรวจพบ HBeAg มีระดับ HBV DNA ในเลือดสูงและมีระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ซึ่งบ่งบอกถึงการอักเสบของตับอยู่ในเกณฑ์ปกติ และเมื่อตรวจทางพยาธิวิทยาของตับพบว่าการอักเสบของตับน้อยหรืออยู่ในเกณฑ์ปกติ
2. Immune clearance phase เป็นระยะที่ตรวจพบ HBeAg ร่วมกับมีระดับ HBV DNA ในเลือดสูงและมีระดับเอนไซม์ ALT สูงกว่าปกติเป็นระยะๆหรืออาจติดต่อกันเป็นเวลานาน เมื่อตรวจทางพยาธิวิทยาของตับพบว่าการอักเสบของตับอย่างชัดเจน ในระยะนี้จะเกิด HBeAg seroconversion โดยเป็นการเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (spontaneous HBeAg seroconversion)
3. Inactive phase เป็นระยะที่ตรวจไม่พบ HBeAg แต่ตรวจพบ anti-HBe แทน มีระดับ HBV DNA ในเลือดต่ำหรืออาจตรวจไม่พบ มีระดับเอนไซม์ ALT ลดลงสู่ปกติและมีการอักเสบของตับลดลง
4. Reactivation phase หรือ HBeAg-negative CHB เป็นระยะที่ตรวจไม่พบ HBeAg แต่ตรวจพบ anti-HBe มีระดับ HBV DNA และระดับเอนไซม์ ALT สูง ซึ่งเปลี่ยนแปลงขึ้นลงเป็นระยะๆ มีการอักเสบและทำลายเซลล์ตับเป็นระยะอย่างต่อเนื่อง



รูปที่ 1 ระยะต่างๆของ CHB (23)

การแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามผลการตรวจของ HBeAg

ในทางปฏิบัติเมื่อตรวจพบว่ามีระดับเอ็นไซม์ ALT สูงขึ้นกว่าปกติ สามารถแบ่งกลุ่มผู้ป่วยตามผลการตรวจ HBeAg ในเลือดได้ดังนี้

1. HBeAg-positive CHB ผู้ป่วยส่วนใหญ่อายุประมาณ 20-40 ปี ซึ่งอยู่ในระยะ Immune clearance phase โดยทั่วไปจะมี HBeAg seroconversion เกิดขึ้นประมาณร้อยละ 8-12 ต่อปี และเข้าสู่ระยะ low replicative หรือ Inactive carrier state บางรายอาจมีการกำเริบและมี HBeAg reversion หรือบางรายอาจเปลี่ยนไปเป็นระยะ HBeAg-negative CHB เนื่องจากมีการกลายพันธุ์ในส่วน precore หรือ BCP เกิดขึ้น มีการศึกษาพบว่าระดับของ covalently closely circular DNA (cccDNA) ในเซลล์ตับของผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB โดยเฉลี่ยสูงกว่าผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB (24)
2. HBeAg-negative CHB ผู้ป่วยกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีอายุเฉลี่ยสูงกว่าผู้ป่วยกลุ่มแรกและมักมีการดำเนินโรคต้ออักเสบรุนแรงกว่าโดยมีระดับ HBV DNA และระดับเอ็นไซม์ ALT แปรปรวนขึ้นลง นอกจากนี้โอกาสที่จะมีระยะสงบของโรคอย่างต่อเนื่องได้เองในระยะยาว (sustained spontaneous remission) โดยไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสพบได้น้อยและรักษายากกว่ากลุ่มแรกเนื่องจากมีการกำเริบ (relapse) ค่อนข้างสูงหลังจากหยุดยาต้านไวรัส (25)

อุบัติการณ์การเกิดตับแข็งในผู้ป่วย CHB พบประมาณร้อยละ 2-6 ต่อปีสำหรับผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB และร้อยละ 8-10 ต่อปีสำหรับผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB สาเหตุที่ผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB มีอุบัติการณ์การเกิดตับแข็งสูงกว่าอาจเป็นเพราะผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอายุเฉลี่ยสูงกว่าและมีความรุนแรงของต้ออักเสบมากกว่า ซึ่งผู้ที่เป็นตับแข็งแล้วมีโอกาสเข้าสู่ระยะตับวาย (decompensated cirrhosis) ประมาณร้อยละ 3 ต่อปี โดยทั่วไปอุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ไม่มีตับแข็ง (non-cirrhosis) พบน้อยกว่าร้อยละ 1 ต่อปี ในขณะที่ผู้ป่วยที่เป็นตับแข็งแล้วมีอุบัติการณ์ของการเป็นมะเร็งตับประมาณร้อยละ 2-3 ต่อปี (22, 26)

การรักษาผู้ป่วย CHB

การรักษาผู้ป่วย CHB ด้วยยาต้านไวรัสชนิดต่างๆในปัจจุบัน ส่วนใหญ่ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสให้หมดจนหายขาด (eradication) เนื่องจากเชื้อไวรัสอยู่ในรูปเฉพาะที่เรียกว่า covalently closely circular DNA (cccDNA) ซึ่งสามารถอยู่ในเซลล์ตับได้เป็นเวลานาน ดังนั้นการรักษาจึงมีจุดมุ่งหมายในระยะสั้นเพื่อ

1. การตอบสนองทางไวรัสวิทยา (virological response, VR) หมายถึงสามารถควบคุมระดับ HBV DNA ในเลือดให้อยู่ในระดับที่ต่ำและมี HBeAg seroconversion เกิดขึ้นสำหรับกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB นอกจากนี้ผู้ป่วยบางรายอาจมี HBsAg seroconversion เกิดขึ้น ซึ่งในทางปฏิบัติหมายถึงการหายขาดจากการติดเชื้อ HBV
2. การตอบสนองทางชีวเคมี (biochemical response, BR) หมายถึง มีระดับเอ็นไซม์ alanine aminotransferase (ALT) อยู่ในเกณฑ์ปกติ
3. การตอบสนองทางพยาธิวิทยา (histological response, HR) หมายถึงมีพยาธิสภาพของตับอักเสบดีขึ้นหลังการรักษา เช่น มี histological activity index (HAI) ลดลงอย่างน้อย 2 คะแนน และไม่มี fibrosis score เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนได้รับการรักษา

จุดมุ่งหมายของการรักษาในระยะยาวเพื่อชะลอการดำเนินของโรค ป้องกันการเกิดตับแข็ง ภาวะตับวายและมะเร็งตับที่อาจเกิดขึ้นในอนาคต ยาด้าน HBV ในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส คือ interferon (IFN) และ nucleos(t)ide analogues (NA)

ยากลุ่ม IFN ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่อยู่ในระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นกลไกหลักในการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้ จึงเป็นการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune modulatory effect) โดยเฉพาะการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cellular immune response) ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการขจัดเชื้อไวรัสออกจากเซลล์ตับ เช่น cccDNA นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เสริมการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ HBV (antiviral effect) ข้อดีของการรักษาด้วยยากลุ่มนี้ คือ มีระยะเวลาของการรักษาแน่นอน ไม่มีการดื้อยาเกิดขึ้นและมีโอกาสที่ HBsAg (HBsAg loss) หายไปประมาณร้อยละ 3-8 นอกจากนี้ยังมีโอกาสเป็นซ้ำหลังหยุดยา (relapse) น้อยกว่าและมีผลต่อเนื่องหลังหยุดการรักษา (off-treatment response) เช่น มีโอกาสหายของ HBsAg และ HBeAg มากกว่ายากลุ่ม NA ข้อจำกัดของยากลุ่มนี้ คือ มีราคาแพง ต้องบริหารยาโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังและมีผลข้างเคียงต่างจากการรักษา เช่น อารมณ์ซึมเศร้า อ่อนเพลีย ปวดเมื่อย ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร น้ำหนักลด ผมร่วง กัดกร่อนของไขกระดูก การทำงานของต่อมไทรอยด์ผิดปกติและยังมีผลด้านอารมณ์และจิตใจ เช่น กังวลและซึมเศร้า นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีระดับ HBV DNA สูงอาจไม่ได้รับผลการรักษาที่ดี เนื่องจากลดระดับ HBV DNA ได้น้อยกว่ายากลุ่ม NA ต่อมาได้มีการพัฒนาประสิทธิภาพของยา IFN โดยการนำโมเลกุลของ polyethylene glycol (PEG) มาเติมเข้าไปในโมเลกุลของ IFN เรียกว่า pegylated interferon (PEG-IFN) ซึ่งทำให้มีการขับออกจากไตช้าลง ส่งผลให้มีคุณสมบัติทางเภสัช

พลศาสตร์และเภสัชจลศาสตร์ของยาตีขึ้น มีค่าครึ่งชีวิตยาวนานขึ้นแต่มีผลข้างเคียงของยาไม่ต่างจาก IFN

ยากลุ่ม NA ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ lamivudine, adefovir, telbivudine, entecavir และ tenofovir ซึ่งออกฤทธิ์ด้านการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยตรง โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polymerase ข้อดีของการรักษาด้วยยากลุ่มนี้ คือ เป็นยารับประทาน มีผลข้างเคียงน้อยและราคาถูกกว่ายากลุ่ม PEG-IFN สามารถใช้ในผู้ป่วยที่เป็นตับแข็งในระยะต่างๆได้ ข้อจำกัดของยากลุ่มนี้คือ ต้องใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานานและมีโอกาสดื้อยาสูงรวมทั้งมีโอกาสหายของ HBeAg และ HBsAg น้อยกว่ายากลุ่ม IFN

เนื่องจากยาทั้งสองกลุ่มมีข้อดีและข้อด้อยต่างกัน ดังนั้นการเลือกให้ยาให้เหมาะสมต่อผู้ป่วยแต่ละรายจึงมีความสำคัญ ซึ่งมีข้อเสนอแนะว่าควรเลือกให้ยากลุ่ม PEG-IFN สำหรับผู้ป่วยที่มีอายุไม่มากและมีสุขภาพดีเพราะมีผลข้างเคียงมากกว่า นอกจากนี้ระดับ HBV DNA ในเลือดไม่ควรสูงเกิน $\log_{10}10^9$ copies/ml เนื่องจากระดับไวรัสที่สูงมากมักทำให้มีผลการตอบสนองต่อการรักษาต่ำ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส genotype A และ B มีโอกาสรักษาด้วยยากลุ่มนี้ได้ผลดีกว่าการติดเชื้อไวรัส genotype C และ D นอกจากนี้ระดับ ALT ควรสูงกว่าค่าปกติตั้งแต่ 2-3 เท่าขึ้นไปและไม่ควรมีตับแข็งร่วมด้วย ในขณะที่การรักษาด้วยยากลุ่ม NA มีข้อจำกัดของการใช้ยาน้อยกว่า สามารถใช้รักษาผู้ป่วยกลุ่มต่างๆได้อย่างกว้างขวาง เช่น ผู้ป่วยที่สูงอายุ ผู้ป่วยตับแข็ง หรือผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวอื่น ๆ ร่วมด้วย นอกจากนี้ยังเป็นยาที่ใช้ในการป้องกันการกำเริบของตับอักเสบสำหรับผู้ป่วยที่ต้องรักษาด้วยยากดภูมิคุ้มกันหรือยาเคมีบำบัด ข้อควรระวัง คือ อาจจำเป็นต้องใช้ยาในกลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นเวลานานหลายปีทำให้มีความเสี่ยงต่อการดื้อยาสูง (27, 28)

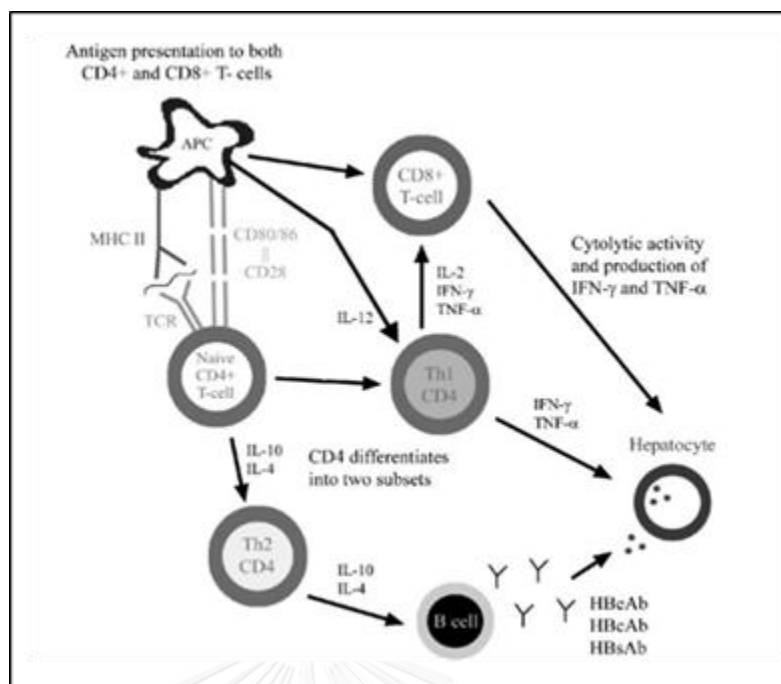
ลักษณะการดำเนินโรคของการติดเชื้อ CHB ในผู้ป่วยแต่ละคนมีความแตกต่างกัน โดยผู้ป่วยบางคนมีการดำเนินโรคของตับอักเสบที่ไม่รุนแรงและหายขาดจากการติดเชื้อได้เอง ในขณะที่ผู้ป่วยอีกจำนวนหนึ่งมีการดำเนินโรคของตับอักเสบแบบเรื้อรังที่รุนแรงจนนำไปสู่การเป็นตับแข็งและมะเร็งตับในที่สุด ความแตกต่างของการดำเนินโรสดังกล่าวขึ้นกับปัจจัยต่างๆได้แก่ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วย เช่น พันธุกรรม และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ HBV เช่น ปริมาณไวรัสในเลือด (viral load) และความแตกต่างของสายพันธุ์ (genotype) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น สารอาหาร การรักษา และการได้รับวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี (29)

เป็นที่รู้กันดีว่า พื้นฐานทางพันธุกรรมของผู้ป่วย (genetic background) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างผู้ป่วยกับเชื้อไวรัส (host-pathogen interactions) มีผลต่อการดำเนินโรคของการติดเชื้อ HBV (30, 31) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน หรือ single nucleotide polymorphism

(SNP) เป็นการแทนที่นิวคลีโอไทด์หนึ่งไปเป็นอีกนิวคลีโอไทด์หนึ่ง ซึ่งอาจส่งผลให้โครงสร้างและการทำงานทางชีวภาพของโปรตีนนั้นๆเปลี่ยนแปลงไป โดยหาก SNP นั้นอยู่ภายในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนอาจส่งผลให้มีการผลิตโปรตีนที่เกี่ยวข้องเพิ่มมากขึ้นหรือลดลงจากเดิม การถ่ายทอดรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมดังกล่าวนี้อาจส่งผลให้บุคคลนั้นมีความไวต่อการเกิดโรค (susceptible) หรือต้านทานการเกิดโรคได้ (resistant) (32)

***Human leukocyte antigen (HLA)-DPA1* และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN**

HLA-DPA1 เป็นยีนที่ควบคุมและกำหนดการสร้าง HLA class II บนผิวเซลล์ของ Antigen presenting cell (APC) ต่างๆ ได้แก่ B lymphocyte, macrophage, และ dendritic cells (DC) รวมทั้งบน activated T lymphocyte ด้วย โดย HLA class II มีหน้าที่สำคัญในการนำเสนอเปปไทด์ของแอนติเจนให้แก่ CD4+ T cell ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ HBV โดย CD4+T cell สามารถรับรู้แอนติเจนของไวรัสได้โดยเฉพาะเจาะจงกับเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของ HBcAg และ HBeAg เมื่อ CD4+ T cell ถูกกระตุ้นกลายเป็น activated CD4+ helper T cell (activated CD4+ Th cell) ซึ่งมีการตอบสนองได้ 2 แบบ แล้วแต่ชนิดของไซโตไคน์ที่หลั่งโดย APC หรือเซลล์อื่นๆที่อยู่ในบริเวณที่มีการกระตุ้น การตอบสนองแบบแรก คือ CD4+ T cell กลายเป็น Th1 CD4 มีการหลั่ง IL-12, IFN- γ และ TNF- α ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำและรักษาระดับการตอบสนองของ CD8+T-cell การตอบสนองแบบที่ 2 คือ CD4+ T cell กลายเป็น Th2 CD4 มีการหลั่ง IL-10 และ IL-4 ซึ่งช่วยกระตุ้น B-lymphocytes ในการสร้างแอนติบอดีชนิดต่างๆ ได้แก่ anti-HBs, anti-HBc และ anti-HBe (10, 11)



รูปที่ 2 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อการติดเชื้อ HBV (33)

ในปี 2009 Kamatani Y. และคณะได้ทำการศึกษา genome-wide association studies (GWAS) พบว่า SNPs ในยีน *Human leukocyte antigen (HLA)-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ CHB ในประชากรญี่ปุ่นและประชากรไทย (7) ซึ่งต่อมาได้มีงานวิจัยที่สนับสนุนข้อมูลดังกล่าว โดยพบว่า SNP ตำแหน่ง rs3077 สัมพันธ์กับการติดเชื้อ CHB ในประชากรจีนฮั่น (Han-Chinese) (8) นอกจากนี้ยังพบว่า rs3077 สัมพันธ์กับทั้งการกำจัดเชื้อ HBV และการพัฒนาเป็นมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma, HCC) (9)

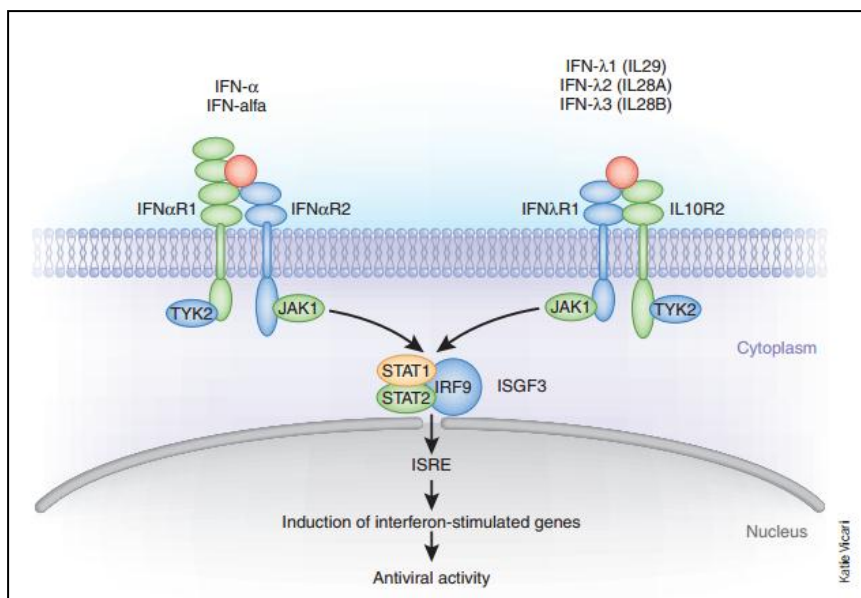
ในปี 2011 Tseng TC. และคณะได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ตำแหน่ง rs3077 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB ชาวไต้หวัน จำนวน 115 คน พบว่ามีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่มดังกล่าว โดยผู้ป่วยที่มี rs3077 จีโนไทป์ GG มีอัตราการเกิด HBeAg-seroconversion สูงกว่าจีโนไทป์อื่นหลังจากหยุดการรักษาแล้ว 6 เดือน (odds ratio (OR)=3.49, 95% confident interval (CI)=1.12-10.84) (34) ต่อมาในปี 2014 Cheng L. และคณะศึกษาในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB ชาวจีน

จำนวน 144 คน พบว่าผู้ป่วยที่มี rs3077 จีโนไทป์ GG มีอัตราการกำจัด HBeAg (OR=3.27, 95%CI=1.49-7.17) และการเกิด anti-HBe seroconversion (OR=2.36, 95%CI=1.10-5.06) สูงกว่าจีโนไทป์อื่น ซึ่งให้เห็นว่าจีโนไทป์ดังกล่าวตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ดีกว่าจีโนไทป์อื่น ในปัจจุบันยังไม่สามารถทราบสาเหตุแน่ชัดว่า rs3077 จีโนไทป์ GG เชื่อมโยงกับอัตราการเกิด HBeAg seroconversion อย่างไร ซึ่ง Cheng L. และคณะได้ให้เหตุผลว่าจีโนไทป์ดังกล่าว อาจนำเสนอแอนติเจนบริเวณ epitope ที่จำเพาะของ HBV ให้ CD4+ T cell ซึ่งช่วยเพิ่มการตอบสนองภูมิคุ้มกันผ่าน T-helper cell และการสร้างแอนติบอดีต่อ HBeAg (35) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ CHB

***Interleukin-28B (IL28B)* และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN**

จากการศึกษาด้าน HCV ในปี 2009 ได้มีการศึกษา genome-wide association studies (GWAS) พบว่า SNP ตำแหน่ง rs12979860 และ rs8099917 บนโครโมโซม คู่ที่ 19 บริเวณ intron ของยีน *Interleukin-28B (IL28B)* ซึ่งเป็นยีนที่สร้าง Interferon lamda 3 (IFN- λ 3) มีความสัมพันธ์กับการกำจัดเชื้อ HCV ได้เองตามธรรมชาติ (spontaneous HCV clearance) (36) และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ร่วมกับ Ribavirin ในผู้ป่วย CHC (12-14, 36) โดยผู้ป่วยที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs8099917 จีโนไทป์ TT และตำแหน่ง rs12979860 จีโนไทป์ CC มีอัตราการตอบสนองทางไวรัสวิทยา (virological response) และการหายขาดจากการติดเชื้อ (Sustained virologic response, SVR) สูงกว่าจีโนไทป์อื่น

IFN- α และ IFN- λ เป็นไซโตไคน์ที่ถูกสร้างขึ้นโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส ทำหน้าที่ในการเหนี่ยวนำให้เกิดวิถี Janus kinase (JAK/STAT) โดยการจับกับ receptor complex ต่างชนิดกัน (รูป 3) การเหนี่ยวนำวิถีดังกล่าว ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนกลุ่ม interferon-stimulated genes (ISG) มากขึ้นจนนำไปสู่การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส โดยจากหลายงานวิจัยที่ระบุว่า ผลการรักษาด้วยยากกลุ่ม IFN- α สัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการสร้าง IFN- λ ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม (Genetic association) และการศึกษาแบบ *in vitro* study ที่ระบุว่า IFN- λ และ IFN- α อาจเกิดปฏิสัมพันธ์กัน (interactive) และมีความสัมพันธ์แบบเสริมสร้างซึ่งกันและกัน (complementary relationship) ในการยับยั้งเชื้อ HCV (15)



รูปที่ 3 การเหนี่ยวนำให้เกิดวิถี Janus kinase (JAK/STAT) โดย IFN-λ และ IFN-α (15)

ในปัจจุบันความเข้าใจในบทบาทของ *IL28B* ต่อการติดเชื้อ CHB ยังคงไม่ชัดเจน ในปี 2005 Robek MD. และคณะศึกษาพบว่า *IL28B* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเชื้อ HBV ใน Hepatocyte cell line จึงได้ระบุว่า *IL28B* อาจจะมีประโยชน์ทางด้านการรักษาการติดเชื้อ HBV (37) ต่อมาได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ในผู้ติดเชื้อ HBV กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN หลายงานวิจัย เช่น

1. Sonneveld MJ. และคณะได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา PEG-IFN ในผู้ป่วย HBeAg-positive CHB ชาวยุโรปและเอเชียจำนวน 205 คน พบว่าผู้ป่วยที่มี SNP ตำแหน่ง rs12979860 จีโนไทป์ CC มีอัตราการเกิด HBeAg seroconversion (OR=2.89, 95%CI=1.15–7.80, $P= .024$) และ HBsAg clearance สูงกว่าจีโนไทป์อื่น (38)
2. Lampertico P. และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB ที่ติดเชื้อ HBV จีโนไทป์ D ในประเทศอิตาลีจำนวน 101 คน พบว่าผู้ป่วยที่มี SNP ตำแหน่ง rs12979860 จีโนไทป์ CC มีอัตราการเกิด SVR (OR=2.98, 95%CI=1.09-8.13 $P=0.03$) และอัตราการเกิด HBsAg clearance (OR=2.70, 95%CI=0.98-7.42, $P=0.04$) สูงกว่าจีโนไทป์อื่นหลังการรักษาด้วยยา PEG-IFN (39)

3. Cheng L. และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB ชาวจีน ที่ได้รับการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN จำนวน 144 คน พบว่า SNP ตำแหน่ง rs12979860 ไม่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่มดังกล่าว (35)
4. Wu H. และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-positive CHB ชาวจีนซึ่งได้รับการรักษาด้วยยา PEG-IFN จำนวน 212 คน พบว่า SNP ตำแหน่ง rs12979860 (จีโนไทป์ CC) สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษา คือ เอ็นไซม์ ALT อยู่ในระดับปกติ, ระดับ HBV DNA ต่ำกว่า 200 IU/ml และเกิด HBeAg seroconversion (40)
5. Boggione L. และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB ในประเทศอิตาลี จำนวน 190 คน ซึ่งได้รับการรักษาด้วยยา PEG-IFN พบว่า SNP ตำแหน่ง rs12979860 (จีโนไทป์ CC) สัมพันธ์กับการเกิด HBsAg clearance (OR=10.129, 95%CI = 2.440–42.044, $P < 0.001$) และระดับ HBV-DNA ต่ำกว่า 2000 IU/ml (OR=4.290, 95%CI = 1.589–11.580, $P=0.004$) (41)

จากงานวิจัยดังกล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ในผู้ติดเชื้อ HBV กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ยังมีข้อมูลที่ไม่ชัดเจน และมีบางงานวิจัยที่ให้ผลขัดแย้งกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยชาวไทยที่ติดเชื้อ CHB

Interferon lambda 4 (IFNL4) และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา กลุ่ม PEG-IFN

ในปี 2013 Prokunina-Olsson L. และคณะได้ค้นพบความหลากหลายทางพันธุกรรม บริเวณเหนือ (upstream) ยีน *IL28B* คือ ตำแหน่ง ss469415590 โดยพบว่ามี 2 รูปแบบ คือ ΔG และ TT โดยรูปแบบ ΔG เกิดจากการขาดหายไปของเบส 1 เบส (one-base deletion) ทำให้กรอบการอ่านรหัสพันธุกรรมบนดีเอ็นเอเลื่อนไปจากเดิม (frame shift) ส่งผลให้เกิดการผลิตโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งให้ชื่อว่า interferon lambda 4 (IFNL4) แบบเต็มความยาว (full-length protein) ในขณะที่รูปแบบ TT จะไม่สร้าง IFNL4 จากนั้นได้มีการศึกษาพบว่า รูปแบบ ΔG ของ *IFNL4* สัมพันธ์กับความบกพร่องในการขจัดเชื้อ HCV และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา PEG-IFN ร่วมกับ ribavirin มากกว่ารูปแบบ TT นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ตำแหน่ง ss469415590 สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้เพื่อทำนายการตอบสนองต่อการรักษาและการขจัดเชื้อ HCV ได้ดีกว่าตำแหน่ง rs12979860 ในกลุ่มประชากรแอฟริกัน-อเมริกัน

การศึกษาแบบ *in vitro* study พบว่า IFNL4 เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ ISG และส่งผลให้เซลล์ดับเกิดการตอบสนองต่อไวรัส ซึ่งมีรูปแบบที่คล้ายกับการเหนี่ยวนำโดย IL28B โดยกลไกที่ IFNL4 เหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้น ISG แต่ทำให้การขจัดเชื้อ HCV แย่ลง ในปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด มีการคาดการณ์ว่าอาจเกิดจากการที่ *IFNL4* มีบริเวณที่คล้ายคลึง (homology) กับ *IL28B* ในส่วนที่ใช้จับกับ primary receptor ชื่อว่า IFN λ 1R1 ในวิถี JAK/STAT จึงอาจเป็นไปได้ว่า IFNL4 กระตุ้นวิถี JAK/STAT ผ่าน receptor complex จำเพาะที่ประกอบด้วย IFN λ 1R1 หรืออาจเกิดจาก IFNL4 เป็นไซโตไคน์ตัวล่อ (decoy cytokine) ทำหน้าที่แข่งขันกับ IL28B ในการจับกับ IFN λ 1R1 นอกจากนี้ยังพบว่า IFNL4 ทำให้เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณของ IFN แบบ pre-activation ซึ่งเป็นการป้องกันการกระตุ้นโดย IFN ชนิดที่ 1 และ 2 ส่งผลให้มีการแสดงออกของ ISG ในระดับที่ต่ำ (weak expression) ทำให้มีการตอบสนองต่อไวรัสต่ำกว่าปริมาณ HCV ที่มีอยู่ในกระแสเลือด

จากงานวิจัยที่ระบุว่า rs12979860 บริเวณยีน *IL28B* สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา กลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยติดเชื้อ HCV และ HBV แบบเรื้อรัง ดังนั้นการรักษาโดยการยับยั้ง IFNL4 จึงอาจใช้เป็นเป้าหมายทางชีวภาพใหม่ ในการรักษาผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวได้ นอกจากนี้จีโนไทป์ของ *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590 สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกผู้ป่วยในการรักษาด้วยยา กลุ่ม PEG-IFN (16,17) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา กลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ CHB

IFN- γ induces protein 10 (IP-10)

IFN- γ เป็นไซโตไคน์ ที่สร้างจาก Natural killer cell (NK cell) และ lymphocyte เมื่อเซลล์ดังกล่าวพบกับแอนติเจนของ HBV โดย IFN- γ มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ ชัดขวางการเพิ่มจำนวนของ HBV ภายในเซลล์ตับ ทั้งโดยการทำลายเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัส (Cytolytic mechanism) และการขจัดเชื้อไวรัสโดยไม่มีการทำลายเซลล์ตับ (non-cytolytic mechanism) นอกจากนี้ IFN- γ ยังมีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ชักนำเซลล์ตับ, macrophage และ sinusoidal endothelial cells ให้มีการหลั่งคีโมไคน์ (Chemokine) หลายชนิดโดยคีโมไคน์ที่สำคัญ คือ IFN- γ induces protein 10 (IP-10) หรือเรียกอีกชื่อว่า C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) ทำหน้าที่กระตุ้น (chemo-attracts) NKT cell โดยการจับกับ CXCR3 ligand ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (42)

มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีระดับ IP-10 ในเลือดสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HCV และ HBV จากการศึกษาในผู้ป่วย CHC พบว่าการแสดงออกของ IP-10 สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค และการอักเสบของตับ (18) นอกจากนี้ระดับ IP-10 ในเลือดก่อนการรักษา (ไม่เกิน 600 พิโคกรัม / มิลลิลิตร) สามารถใช้ทำนายได้ว่าหากได้รับการรักษาแบบมาตรฐาน (PEG-IFN ร่วมกับ telaprevir) ผู้ป่วยจะมีการตอบสนองต่อการรักษาอย่างรวดเร็ว (43) และยังพบว่าในผู้ป่วยที่สามารถขจัดไวรัสได้เองโดยธรรมชาติ (spontaneous clearance) มีระดับ IP-10 ในเลือดเฉลี่ยต่ำกว่าในผู้ป่วยที่ไม่สามารถขจัดไวรัสได้เอง (44) โดยในปัจจุบันการแสดงออกของ IP-10 ในเลือดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *IL28B* จัดว่าเป็นตัวพยากรณ์การรักษาที่ดีที่สุดซึ่งใช้ร่วมกันในการทำนายการขจัดไวรัสโดยธรรมชาติในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HCV (19)

สำหรับการศึกษาด้าน HBV ในปี 2008 Guohong Deng และคณะได้ทำการศึกษาโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *IP-10* ขนาดความยาว 4228 คู่เบส ในประชากรปักกิ่งและฉงชิ่งของประเทศจีน พบว่ามี SNPs จำนวน 21 SNPs ซึ่งทั้งหมดอยู่ในส่วน non-coding region โดยพบว่า SNP ตำแหน่ง G-201A ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *IP-10* (อยู่ระหว่างลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจับของ nuclear factor **K β 1** และ nuclear factor **K β 2**) สัมพันธ์กับความไวต่อการดำเนินโรค CHB โดยผู้ป่วยที่มีรูปแบบอัลลีล A มีความไวต่อการดำเนินโรคเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่มีอัลลีล A (OR=1.50, 95% CI= 1.20 –1.87, $P < 0.001$) นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบของ G-201A ยังส่งผลต่อความสามารถในการจับของ nuclear protein และการควบคุมการแสดงออกของ *IP-10* (45) ซึ่งต่อมาในปี 2013 Xu Z. และคณะได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ตำแหน่ง G-201A และการดำเนินโรคการติดเชื้อ HBV โดยศึกษาในผู้ป่วยชาวจีนจำนวน 577 คน เปรียบเทียบกับกลุ่มคนปกติ พบว่า ในกลุ่มคนปกติมีความชุกของอัลลีล A ต่ำสุด และสูงขึ้นในกลุ่ม

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HBV แบบเฉียบพลัน และในกลุ่มผู้ป่วย CHB มีความชุกของอัลลีล A สูงที่สุด นอกจากนี้จากการศึกษาแบบ *in vitro* พบว่า SNP ตำแหน่ง G-201A รูปแบบอัลลีล A สามารถกระตุ้น (enhancer) กระบวนการถอดรหัสพันธุกรรมของโปรโมเตอร์ *IP-10* ได้ดีกว่าอัลลีล G และจากการศึกษาแบบ *in vivo* พบว่า SNP ตำแหน่ง G-201A จีโนไทป์ AA กระตุ้นการแสดงออกของ *IP-10* ได้สูงกว่า จีโนไทป์ GG (20) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง จีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่ง G-201A กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ CHB



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบ case-control study ซึ่งได้รับการพิจารณาและผ่านการอนุมัติจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) โครงการวิจัยหมายเลข (IRB No.) 436/57

ประชากรที่ศึกษา

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่เคยได้รับการรักษาด้วยการฉีดยา PEG-IFN ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ตั้งแต่ พ.ศ. 2550-2555 จำนวนประมาณ 254 ราย

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. เพศหญิงหรือเพศชาย อายุ 18-65 ปี
2. มีสุขภาพแข็งแรง อ่านออกเขียนได้
3. มีผลเลือด hepatitis B s antigen (HBsAg) และ HBV DNA เป็นบวก (ส่วน HBeAg เป็นบวกหรือลบก็ได้) เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือนก่อนการรักษา
4. ประวัติเคยได้รับการรักษาด้วยการฉีดยาด้านไวรัส PEG-IFN alfa-2a (Pegasys) หรือ PEG-IFN alfa-2b (Pegintron) เป็นเวลา 48 สัปดาห์
5. ได้รับการตรวจติดตามอย่างน้อย 6 เดือนหลังหยุดฉีดยาด้านไวรัสดังกล่าวเพื่อประเมินผลการรักษา
6. มีผลการรักษาที่แสดงว่าเป็นกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษา

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ยังไม่บรรลุนิติภาวะ, เป็นผู้ไร้ความสามารถ หรือเสมือนไร้ความสามารถ, ผู้วิกลจริต และผู้ที่มีประวัติการรักษาอาการทางจิต
2. ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HCV หรือ HIV ร่วมด้วย

3. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย หรือไม่สามารถลงลายมือชื่อในใบยินยอม เข้าร่วมการศึกษาวิจัย

การคำนวณขนาดของกลุ่มประชากรตัวอย่าง (Sample size)

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบ case control study กลุ่มประชากรจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มและเป็นอิสระต่อกัน คือ ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาและไม่ตอบสนองต่อการรักษา ดังนั้นจึงคำนวณหาจำนวนประชากรโดยใช้สูตรดังนี้

$$N = \frac{[Z_{\alpha}\sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta}\sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

N หมายถึง ประชากรที่ศึกษาในแต่ละกลุ่ม

P_2 หมายถึง โอกาสที่ผู้ป่วยจะตอบสนองต่อการรักษา เท่ากับ 0.3

OR หมายถึง odd ratio เท่ากับ 2.89 (38)

P_1 หมายถึง อัตราที่คาดว่าประชากรกลุ่ม case จะมีปัจจัยที่ผู้วิจัยสนใจ

โดย P_1 มีค่าเท่ากับ $\frac{P_2 \times OR}{1 + P_2(OR - 1)} = 0.553$

P มีค่าเท่ากับ $\frac{(p_2 + p_1)}{2} = 0.425$

Z_{α} หมายถึง ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 แบบ two-tail test โดย $Z_{\alpha/2} = 1.96$ เมื่อกำหนด $\alpha = 0.05$

Z_{β} หมายถึง ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 โดย $Z_{\beta} = 1.28$

แทนค่าในสมการข้างต้น

$$\text{จะได้ว่า } N = \frac{[1.96\sqrt{(2 \times 0.425)(1 - 0.425)} + 1.28\sqrt{0.553(1 - 0.553) + 0.3(1 - 0.3)}]^2}{(0.553 - 0.3)^2} = \frac{78}{\text{group}}$$

ดังนั้นกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในแต่ละกลุ่ม ต้องมีจำนวนอย่างน้อย 78 ราย เพื่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูล เนื่องจากมีเป้าหมายที่จะตีพิมพ์ผลงานวิจัยนี้ลงในวารสารระดับนานาชาติ จึงต้องเก็บตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่จะสามารถเก็บได้ คือ 254 ราย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. Centrifuge (Eppendorf, Germany)
2. Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
3. Microcentrifuge tube 0.5 μ l ,1.5 μ l (Axygen, USA)
4. Freezer 4 ° C (Misubishi, Japan)
5. Freezer -20° C (Sanyo, Japan)
6. Block heater (Lab Line instrument, USA)
7. Parafilm (American nation, USA)
8. Polypropylene conical tube ขนาด 15ml, 50 ml (SPL lifesciences, Korea)
9. Vortex mixer (Scientific industry, USA)
10. PCR Mastercycle personal (Eppendorf, Germany)
11. Electrophoresis chamber (BioRAD, USA)
12. Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
13. LightCycler 480 Real-Time PCR (Life Science, USA)
14. ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)
15. Magnetic stirrer (Thermolyne, USA)
16. Autoclave (Harvey, USA)
17. Gel Doc (BioRAD, USA)
18. Reagent Bottle 100 mL (Duran, USA)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

1. Proteinase K (5PRIME, Germany)
2. Tris-HCl (Sigma, Singapore)
3. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Pharmacia biotech, Sweden)
4. Disodium ethylenediamine tetraacetic acid: EDTA (USB, Hong Kong)
5. Phenol (Amresco, OH, USA)
6. Chloroform (Sigma, MO, USA)
7. Isoamyl alcohol (BDH, UK)
8. Glycogen (USB, Ohio, USA)
9. Sodium acetate (Sigma, Singapore)
10. Absolute ethanol (Merck, Germany)
11. Nuclease-free water

2. สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR

1. 5Prime Perfect*Taq* Plus MasterMix Kit (5PRIME, Germany)
2. Specific primers (BioDesign, Thailand; 1st BASE CUSTOM OLIGOS, Singapore)

3. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNP ตำแหน่ง G-201A สำหรับยีน *IP-10* และตำแหน่ง rs12979860 สำหรับยีน *IL28B* ด้วยวิธี PCR-RFLP

1. CutSmart Buffer (New England Biolabs, UK)
2. เอนไซม์ *Bst*UI สำหรับยีน *IL28B* (New England Biolabs, UK)
3. เอนไซม์ *Hin*FI สำหรับยีน *IP-10* (New England Biolabs, UK)
4. Nuclease-free water
5. PCR reaction mixture

4. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNP ตำแหน่ง rs3077 สำหรับยีน *HLA-DPA1* และตำแหน่ง ss469415590 สำหรับยีน *IFNL4* ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR

1. TaqMan SNP Genotyping Assay (Assay ID: C_11916951_10, Applied Biosystems, Germany) สำหรับยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077
2. TaqMan MGB Probes (Applied Biosystems, Germany) สำหรับยีน *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590
3. 5Prime PerfectTaq Plus MasterMix Kit (5PRIME, Germany)
4. Specific primers (BioDesign, Thailand; 1st BASE CUSTOM OLIGOS, Singapore)

5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Agarose gel electrophoresis

1. Agarose molecular grade (Reserch Organics, OH, USA)
2. GeneRuler 100 base pair DNA ladder (Fermentas, MD, USA)
3. Boric acid (USB, Hongkong)
4. EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Hongkong)
5. Tris base Biotechnology Grade (USB, Hongkong)
6. Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

6. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)

- Agarose Gel Extract mini kit (5 prime GmbH, Germany)

7. สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณ IP-10 ในซีรัม

- Human CXCL10/IP-10 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, USA)

โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1. GraphPad Software (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>)
2. SPSS software for Windows version 22.0 (SPSS, Chicago, IL)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัด DNA

การสกัดสารพันธุกรรมจาก PBMC โดยใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้ตัวอย่าง PBMC ปริมาตร 100 μl เติม lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS) ปริมาตร 400 μl และเติม proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 10 μl จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. เติมสารละลาย phenol ปริมาตร 250 μl และ chloroform: isoamyl alcohol (49:1) ปริมาตร 250 μl จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที
3. จากนั้นเตรียม microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่โดยเติม glycogen ปริมาตร 4 μl absolute ethanol ปริมาตร 800 μl และ 2 M NaOAc ปริมาตร 40 μl จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ได้จากขั้นที่ 2 ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -70 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที
5. จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำส่วนตะกอนที่เหลือมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 นาที
6. ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนสีขาวกัน microcentrifuge tube เท่านั้น จากนั้นนำไปอบแห้งโดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที
7. นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) ปริมาตร 30 μl จากนั้นเก็บสารละลาย DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 $^{\circ}\text{C}$

2. การตรวจความหลากหลายของยีน *HLA-DPA1* rs3077 โดยเทคนิค *TaqMan* probe real-time PCR

การตรวจความหลากหลายของยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 โดยใช้ *TaqMan* SNP Genotyping Assay ซึ่งภายใน Assay นี้ประกอบไปด้วย probe และ primer ที่จำเพาะกับตำแหน่ง SNP rs3077 (Assay ID: C_11916951_10, Applied Biosystems, Germany)

ตารางที่ 1 สารที่ใช้ในการทำ *TaqMan* probe real-time PCR สำหรับยีน *HLA-DPA1* rs3077

| สารที่ใช้ | ปริมาณ (μl) |
|--------------------------------------------|-------------|
| 20X <i>TaqMan</i> SPN Genotyping Assay mix | 0.50 |
| Master Mix | 5.00 |
| Distilled water | 3.50 |
| DNA template | 2.00 |
| Total volume | 11.00 |

ตารางที่ 2 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ *TaqMan* probe real-time PCR สำหรับยีน *HLA-DPA1* rs3077

| ขั้นตอนที่ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา | หมายเหตุ |
|------------|---------------|-----------|----------|
| 1 | 60 | 30 วินาที | } 45รอบ |
| 2 | 95 | 10 นาที | |
| 3 | 95 | 15 วินาที | |
| | 60 | 1 นาที | |

จากนั้นผลการทดลอง *TaqMan* probe real-time PCR จะแสดงในรูปแบบ allelic discrimination plot

3. การตรวจความหลากหลายของยีน *IFNL4* ss469415590 โดยเทคนิค *TaqMan* probe real-time PCR

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ probe และ primer ที่ใช้ในการทำ *TaqMan* probe real-time PCR สำหรับยีน *IFNL4* ss469415590

| ชื่อ probe และ primer | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3') | เอกสารอ้างอิง |
|--------------------------------------------|-----------------------------|---------------|
| ss469415590_IFNAN_F | GCC TGC TGC AGA AGC AGA GAT | (16) |
| ss469415590_IFNAN_R | GCT CCA GCG AGC GGT AGT G | |
| ss469415590_IFNAN_VIC (TT allele) | ATC GCA <u>GAA</u> GGC C | |
| ss469415590_IFNAN_FAM (Δ G allele) | ATC GCA <u>GCG</u> GCC C | |

ตารางที่ 4 สารที่ใช้ในการทำ *TaqMan* probe real-time PCR สำหรับยีน *IFNL4* ss469415590

| สารที่ใช้ | ปริมาตร (μ l) |
|---------------------------------|--------------------|
| 2.5 X Master Mix (5 primes) | 5.0 |
| 10 μ M ss469415590_IFNAN_F | 0.09 |
| 10 μ M ss469415590_IFNAN_R | 0.09 |
| 5 μ M ss469415590_IFNAN_VIC | 0.02 |
| 5 μ M ss469415590_IFNAN_FAM | 0.02 |
| Distilled water | 3.5 |
| DNA template | 1.00 |
| Total volume | 10.00 |

ตารางที่ 5 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ TaqMan probe real-time PCR สำหรับยีน *IFNL4* ss469415590

| ขั้นตอนที่ | อุณหภูมิ(°C) | เวลา | หมายเหตุ |
|------------|--------------|-----------|----------|
| 1 | 50 | 2 นาที | |
| 2 | 95 | 10 นาที | |
| 3 | 95 | 15 วินาที | } 45 รอบ |
| | 60 | 2 นาที | |

จากนั้นผลการทดลอง TaqMan probe real-time PCR จะแสดงในรูปแบบ allelic discrimination plot

4. การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 โดยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)
 1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 7 สารที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 โดยสภาวะที่ใช้ทำ PCR ดังแสดงใน ตารางที่ 8
 2. นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 2% agarose gel จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide หากเป็นผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ของยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 365 bp จึงดำเนินการขั้นต่อไป
 3. นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ที่เหลือมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*U1 โดยสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 10 สารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR สำหรับยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 4. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 3% agarose gel จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide ขนาดผลิตภัณฑ์ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงใน ตารางที่ 9

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860

| ชื่อ primer | ชนิด | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3') | ขนาดผลิตภัณฑ์ (bp) |
|-----------------|---------|-----------------------------|-----------------------|
| rs12979860_F706 | Forward | TAC ACC CGT TCC TGT CCC AAG | 365 |
| rs12979860_R341 | Reverse | CTC TTC CTC CTG CGG GAC AAG | |

ตารางที่ 7 สารที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860

| สารที่ใช้ | ปริมาตร (μl) |
|-----------------------------|--------------|
| 2.5 X Master Mix (5 primes) | 12.50 |
| 10 μM rs12979860_F706 | 0.50 |
| 10 μM rs12979860_R341 | 0.50 |
| Distilled water | 0.70 |
| Dye | 4.80 |
| 100% DMSO | 1.00 |
| DNA template | 5.00 |
| Total volume | 25.00 |

ตารางที่ 8 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR สำหรับยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860

| ขั้นตอนที่ | อุณหภูมิ(°C) | เวลา | หมายเหตุ |
|------------|--------------|-----------|----------|
| 1 | 94 | 3 นาที | |
| 2 | 94 | 30 วินาที | } 40 รอบ |
| 3 | 62 | 30 วินาที | |
| | 72 | 30 วินาที | |
| 4 | 72 | 7 นาที | |

ตารางที่ 9 ขนาดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR-RFLP ของยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

| ยีน | เอนไซม์ตัดจำเพาะ | แอลลีล | ขนาดผลิตภัณฑ์หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (bp) |
|---------------------------------|------------------|------------------|-----------------------------------------------------|
| <i>IL28B</i> ตำแหน่ง rs12979860 | <i>Bst</i> U1 | C (Major allele) | 160, 112, 89 และ 25 |
| | | T (Minor allele) | 185, 112, 89 และ 25 |

ตารางที่ 10 สารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR สำหรับยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860

| สารที่ใช้ | ปริมาตร (µl) |
|-----------------------|--------------|
| Distilled water | 3.30 |
| Buffer | 1.50 |
| 10 U/µl <i>Bst</i> U1 | 0.20 |
| PCR product | 10.0 |
| Total volume | 15.00 |

5. การตรวจความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A โดยเทคนิค PCR-RFLP

1. เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 13 โดยสภาวะที่ใช้ทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 12
2. นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 2% agarose gel จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide หากเป็นผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A จะปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 285 bp จึงดำเนินการขั้นต่อไป
3. นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ที่เหลือมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* โดยสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 15 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้ 2% agarose gel จากนั้นย้อมเจลด้วย Ethidium bromide ขนาดผลิตภัณฑ์หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A

| ชื่อ primer | ชนิด | ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3') | ขนาด ผลิตภัณฑ์ (bp) |
|-------------|---------|-----------------------------------|---------------------|
| CXCL10 _F | Forward | CAG TTC ATG TTT TGG AAA GTG AAA C | 285 |
| CXCL10 _R | Reverse | GTT CCT CTG CTG TAG GCT CA | |

ตารางที่ 12 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR สำหรับยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A

| ขั้นตอนที่ | อุณหภูมิ (°C) | เวลา | หมายเหตุ |
|------------|---------------|-----------|----------|
| 1 | 94 | 3 นาที | } 35 รอบ |
| 2 | 94 | 30 วินาที | |
| 3 | 58 | 30 วินาที | |
| | 72 | 30 วินาที | |
| 4 | 72 | 7 นาที | |

ตารางที่ 13 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR สำหรับยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A

| สารที่ใช้ | ปริมาตร (μ l) |
|-----------------------------|--------------------|
| 2.5 X Master Mix (5 primes) | 7.50 |
| 10 μ M CXCL10_F | 0.25 |
| 10 μ M CXCL10_R | 0.25 |
| Distilled water | 2.50 |
| DNA template | 2.00 |
| Total volume | 12.50 |

ตารางที่ 14 ขนาดผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR-RFLP ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

| ยีน | เอนไซม์ตัดจำเพาะ | แอลลีล | ขนาดผลิตภัณฑ์ภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (bp) |
|----------------------|------------------|------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>IP-10</i> ตำแหน่ง | | G (Major allele) | 185 และ 100 |
| G-201A | <i>Hinf</i> I | A (Minor allele) | 285 |

ตารางที่ 15 สารเคมีที่ใช้ในการตัดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR สำหรับยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A

| สารที่ใช้ | ปริมาตร (μ l) |
|-----------------------------|--------------------|
| Distilled water | 3.80 |
| Buffer | 1.00 |
| 10 U/ μ l <i>Hinf</i> I | 0.20 |
| PCR product | 5.00 |
| Total volume | 10.00 |

6. การวัดปริมาณ IP-10 ในซีรัมของผู้ป่วยก่อนการรักษา

วัดปริมาณ IP-10 ในซีรัมของผู้ป่วยก่อนการรักษาโดยใช้เทคนิค sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. นำซีรัมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบและสารทั้งหมดออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมด
2. ใส่ Assay Diluent RD1-56 75 μL ในแต่ละ well
3. ใส่ Standard, control, หรือซีรัมตัวอย่าง 75 μL ในแต่ละ well จากนั้นปิดฝาครอบและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. ล้างด้วย Wash Buffer 400 μL ในแต่ละ well จำนวน 4 ครั้ง โดยใช้เครื่อง autowasher จากนั้นเท Wash Buffer ทิ้งและซับแห้งด้วยทิชชู
5. ใส่ IP-10 Conjugate 200 μL ในแต่ละ well จากนั้นปิดฝาครอบและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. ล้างด้วย Wash Buffer 400 μL ในแต่ละ well จำนวน 4 ครั้ง โดยใช้เครื่อง autowasher จากนั้นเท Wash Buffer ทิ้งและซับแห้งด้วยกระดาษทิชชู
7. ใส่ Substrate Solution 200 μL ในแต่ละ well บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
8. ใส่ Stop Solution 50 μL ในแต่ละ well
9. วัด optical density ที่ความยาวคลื่น 450 nm ภายใน 30 นาที

7. การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดยการจดลงสมุดบันทึกผลการทดลอง และบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

8. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

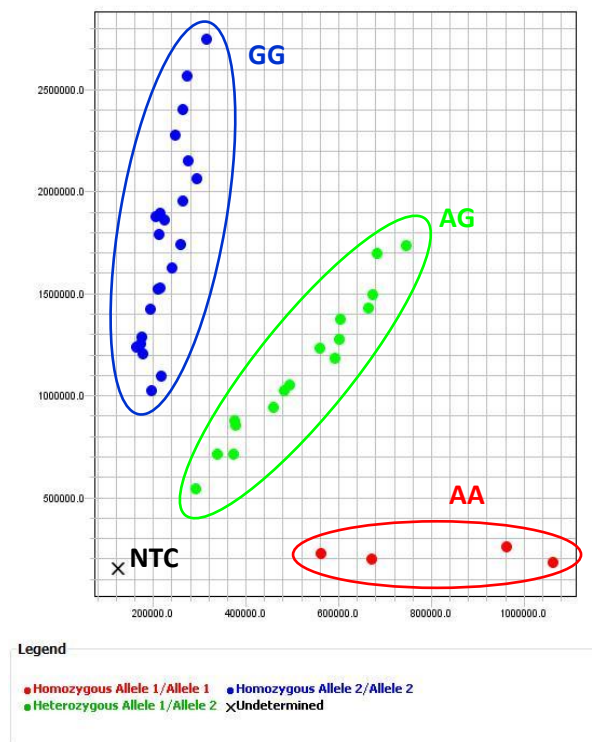
ใช้โปรแกรม SPSS version 10.0 คำนวณความสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* และ *IP-10* กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อ CHB โดยนำข้อมูล SNP ที่ได้มาวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับข้อมูลพื้นฐานต่างๆของผู้ป่วย เช่น อายุ เพศ ร่วมกับผลการรักษาของผู้ป่วยรวมทั้งข้อมูล genotype of HBV, HBV-DNA level ของผู้ป่วย โดยการใช้ค่าทางสถิติในการวิเคราะห์ (Statistical method) ได้แก่ χ^2 test, t test, logistic regression analyses, $P < 0.05$ ในการวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *HLA-DPA1* rs3077

จีโนไทป์ของยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 มี 3 รูปแบบ คือ GG, AG และ AA การหาจีโนไทป์ของยีนนี้ด้วยวิธี *TaqMan* probe real-time PCR ใช้การตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent signal) ที่เกิดขึ้นจากการทำ PCR ในแต่ละรอบ โดยสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ดังกล่าวคือ FAM สำหรับแอลลีล G และ VIC สำหรับแอลลีล A

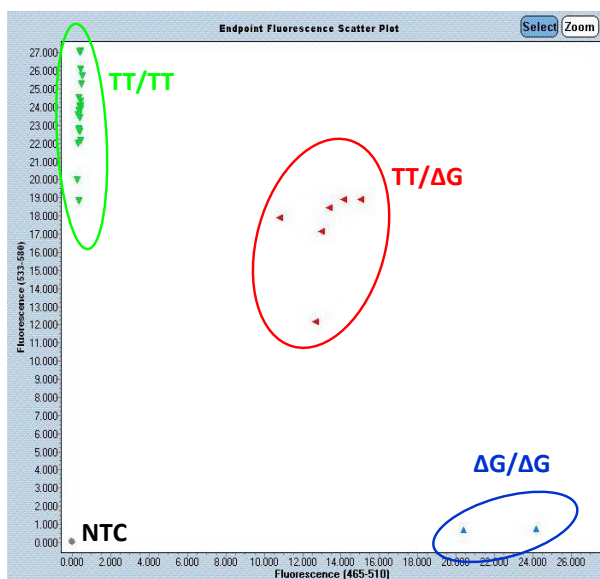


รูปที่ 4 ตัวอย่างผล real-time PCR ของยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง SNP rs3077

หมายเหตุ NTC คือ no template control

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IFNL4* ss469415590

จีโนไทป์ของยีน *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590 มี 3 รูปแบบ คือ TT/TT, TT/ Δ G และ Δ G/ Δ G การหาจีโนไทป์ของยีนนี้ด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR ใช้การตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent signal) ที่เกิดขึ้นจากการทำ PCR ในแต่ละรอบ โดยสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ดังกล่าวคือ FAM สำหรับ Δ G และ VIC สำหรับ TT

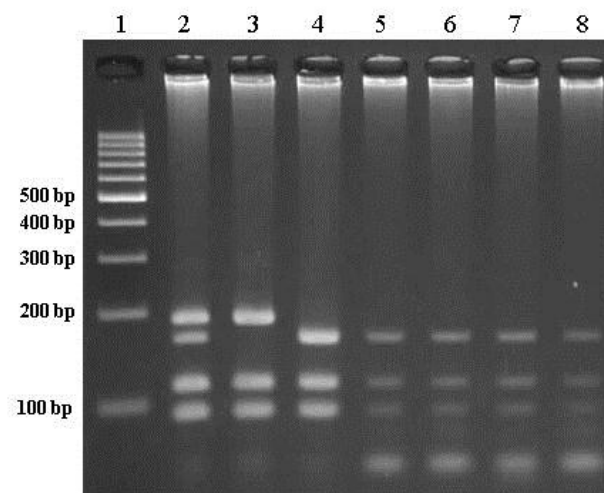


รูปที่ 5 ตัวอย่างผล real-time PCR ของยีน *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590

หมายเหตุ NTC คือ no template control

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860

จีโนไทป์ของยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 มี 3 รูปแบบ คือ CC, CT และ TT การหาจีโนไทป์ของยีนนี้ด้วยวิธี PCR-RFLP จีโนไทป์ CC จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 160, 112, 89 และ 25 bp จีโนไทป์ CT จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 185, 160, 112, 89 และ 25 bp ในขณะที่จีโนไทป์ TT ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 185, 112, 89 และ 25 bp บน 3% agarose gel ดังปรากฏในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860

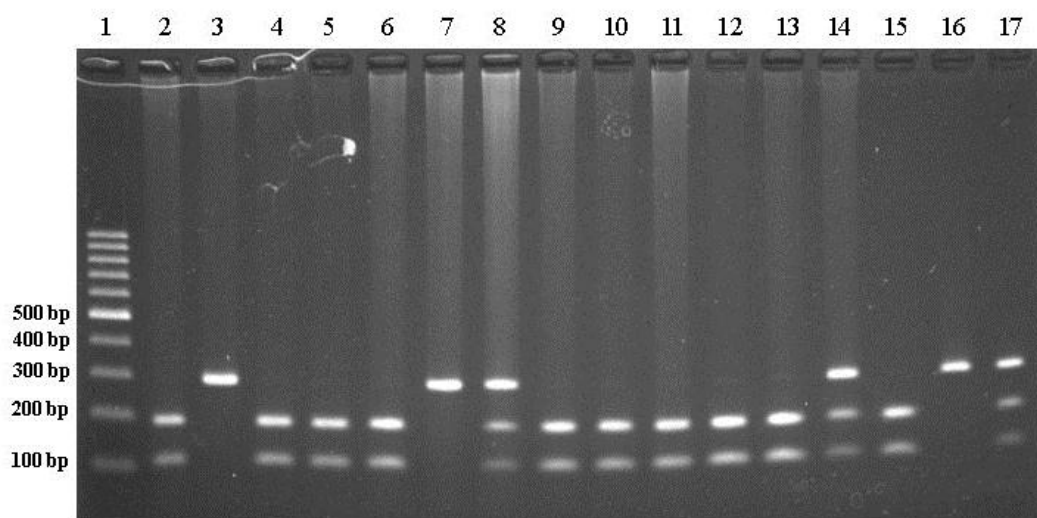
หมายเหตุ

แถว 1 คือ 100 bp DNA Ladder

แถวที่ 2 ถึง 8 คือ ผลการทำ PCR-RFLP ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

4. ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A

จีโนมของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A มี 3 รูปแบบ คือ GG, GA และ AA การหาจีโนมของยีนนี้ด้วยวิธี PCR-RFLP จีโนม GG จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 185 และ 100 bp จีโนม GA จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 285, 185 และ 100 bp ในขณะที่จีโนม AA ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 285 bp บน 2% agarose gel ดังปรากฏในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ตัวอย่างผล PCR-RFLP ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A

หมายเหตุ

แถว 1 คือ 100 bp DNA Ladder

แถวที่ 2 ถึง 14 คือ ผลการทำ PCR-RFLP ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

แถวที่ 15-17 คือ Positive control สำหรับจีโนม GG, AA และ GA ตามลำดับ

5. ลักษณะทางคลินิกของกลุ่มประชากรที่ใช้ในงานวิจัย

ในผู้ป่วย HBeAg-positive CHB จำนวน 107 ราย ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษา (Responders) จำนวน 45 ราย และกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา (Non-Responders) จำนวน 62 ราย รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 16 โดยพบว่าจีโนไทป์ของ *IP-10* G-201A และระดับ *IP-10* ก่อนการรักษา ในกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาและไม่ตอบสนองต่อการรักษาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษามีระดับ *IP-10* เฉลี่ย 496 pg/mL ซึ่งสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาที่มีระดับ *IP-10* เฉลี่ย 328 pg/mL นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษามีแนวโน้มว่า ระดับ HBV DNA และ HBsAg ก่อนการรักษาต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ในผู้ป่วย HBeAg-negative CHB จำนวน 147 ราย ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาจำนวน 60 ราย และกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา จำนวน 87 ราย รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษาและไม่ตอบสนองต่อการรักษา พบว่าระดับ HBsAg ก่อนการรักษาและจีโนไทป์ของ *HLA-DPA1* rs3077 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา มีระดับ HBsAg ก่อนการรักษาเฉลี่ย 3.1 IU/mL ซึ่งต่ำกว่าในกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา

ตารางที่ 16 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย HBeAg-positive CHB ซึ่งแบ่งกลุ่มตามการตอบสนองต่อการรักษา

| Characteristics | All patients (n=107) | Responders (n=45) | Non-Responders (n=62) | <i>P</i> |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|----------|
| Age (year) | 34.3±8.3 | 34.4±8.3 | 34.3±8.4 | 0.941 |
| Sex (male) | 72(67.3%) | 28(62.2%) | 44(70.9%) | 0.341 |
| ALT (U/L) | 116.9±68.4 | 127.5±60.9 | 109.3±72.9 | 0.175 |
| Log ₁₀ HBV DNA (IU/mL) | 7.2±1.0 | 7.0±1.0 | 7.3±1.1 | 0.215 |
| Log ₁₀ HBsAg (IU/mL) | 3.9±0.6 | 3.8±0.6 | 4.0±0.6 | 0.078 |
| Liver stiffness (kPa) | 7.6±3.4 | 7.8±3.9 | 7.3±2.4 | 0.459 |
| HBV genotypes | | | | 0.492 |
| B | 13(12.1%) | 7(15.6%) | 6(9.7%) | |
| C | 87(81.3%) | 38(84.4%) | 49(79.0%) | |
| Others or unknown | 7(6.6%) | 0 (0%) | 7(11.3%) | |
| <i>IL28B</i> rs12979860 | | | | 0.810 |
| CC | 96(89.7%) | 40(88.9%) | 56(90.3%) | |
| CT | 11(10.3%) | 5(11.1%) | 6(9.7%) | |
| TT | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | |
| C allele frequency | 0.949 | 0.944 | 0.952 | |
| <i>IFNL4</i> ss469415590 | | | | 0.810 |
| TT/TT | 96(89.7%) | 40(88.9%) | 56(90.3%) | |
| TT/ΔG | 11(10.3%) | 5(11.1%) | 6(9.7%) | |
| ΔG/ ΔG | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | |
| TT allele frequency | 0.949 | 0.944 | 0.952 | |
| <i>HLA-DPA1</i> rs3077 | | | | 0.653 |
| GG | 63(58.9%) | 25(55.5%) | 38(61.3%) | |
| GA | 33(30.8%) | 16(35.6%) | 17(27.4%) | |
| AA | 11 (10.3%) | 4(8.9%) | 7(11.3%) | |
| G allele frequency | 0.743 | 0.733 | 0.750 | |
| <i>IP-10</i> G-201A | | | | 0.016 |
| GG | 82(76.6%) | 40(88.9%) | 42(67.8%) | |
| GA | 21(19.6%) | 3(6.7%) | 18(29.0%) | |
| AA | 4 (3.7%) | 2(4.4%) | 2(3.2%) | |
| G allele frequency | 0.865 | 0.922 | 0.823 | |
| Serum IP-10 level (pg/mL) | 393.3±314.6 | 496.0±394.6 | 328.0±232.2 | 0.013 |

หมายเหตุ; Responders หมายถึงผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษา (virological response) โดยใน HBeAg-positive CHB หมายถึง การเกิด HBeAg clearance ร่วมกับ HBV DNA < 2,000 IU/mL ที่สัปดาห์ที่ 72

ตารางที่ 17 ลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วย HBeAg-negative CHB ซึ่งแบ่งกลุ่มตามการตอบสนองต่อการรักษา

| Characteristics | All patients (n=147) | Responders (n=60) | Non-Responders (n=87) | <i>p</i> |
|-----------------------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|----------|
| Age (year) | 41.3±9.5 | 41.5±10.6 | 41.1±8.8 | 0.832 |
| Sex (male) | 78(53.1%) | 33(55.0%) | 45(51.7%) | 0.696 |
| ALT (U/L) | 75.4±35.9 | 76.3±30.2 | 74.8±35.8 | 0.802 |
| Log ₁₀ HBV DNA (IU/mL) | 5.4±0.9 | 5.5±0.9 | 5.4±0.9 | 0.726 |
| Log ₁₀ HBsAg (IU/mL) | 3.4±0.5 | 3.1±0.4 | 3.5±0.4 | <0.001 |
| Liver stiffness (kPa) | 6.8 ± 3.1 | 6.9 ± 3.0 | 6.7 ± 3.3 | 0.886 |
| HBV genotypes | | | | 0.714 |
| B | 25(17.0%) | 7(11.7%) | 18(20.7%) | |
| C | 99(67.3%) | 43(71.7%) | 56(64.4%) | |
| Others or unknown | 23(15.7%) | 10 (16.6%) | 13(14.9%) | |
| <i>IL28B</i> rs12979860 | | | | 0.481 |
| CC | 124(84.4%) | 50(83.3%) | 74(85.1%) | |
| CT | 22(15.0%) | 9(15.0%) | 13(14.9%) | |
| TT | 1 (0.6%) | 1 (1.7%) | 0 (0%) | |
| C allele frequency | 0.918 | 0.908 | 0.925 | |
| <i>IFNL4</i> ss469415590 | | | | 0.481 |
| TT/TT | 124(84.4%) | 50(83.3%) | 74(85.1%) | |
| TT/ΔG | 22(15.0%) | 9(15.0%) | 13(14.9%) | |
| ΔG/ ΔG | 1 (0.6%) | 1 (1.7%) | 0 (0%) | |
| TT allele frequency | 0.918 | 0.908 | 0.925 | |
| <i>HLA-DPA1</i> rs3077 | | | | 0.035 |
| GG | 89(60.5%) | 43(71.7%) | 46(52.9%) | |
| GA | 47(32.0%) | 12(20.0%) | 35(40.2%) | |
| AA | 11 (7.5%) | 5(8.3%) | 6(6.9%) | |
| G allele frequency | 0.765 | 0.817 | 0.730 | |
| <i>IP-10</i> G-201A | | | | 0.354 |
| GG | 109(74.1%) | 43(71.7%) | 66(75.9%) | |
| GA | 36(24.5%) | 17(28.3%) | 19(21.8%) | |
| AA | 2 (1.4%) | 0(0%) | 2(2.3%) | |
| G allele frequency | 0.864 | 0.858 | 0.868 | |

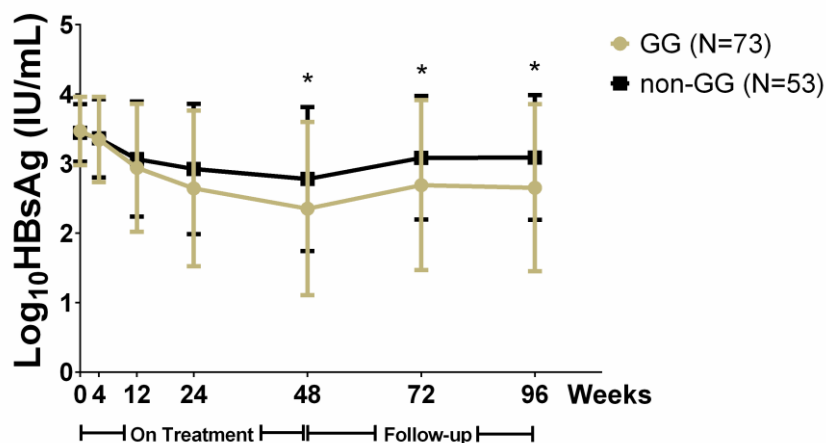
หมายเหตุ; Responders หมายถึงผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษา (virological response) โดยใน HBeAg-negative CHB หมายถึง HBV DNA < 2,000 IU/mL ที่สัปดาห์ที่ 96

6. ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HLA-DPA1*, *IL28B*, *IFNL4* และ *IP-10* กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่มเพคอินเตอร์เฟอรอนในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

6.1 ยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077

จากผลการหาจีโนไทป์ของยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 ในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive เป็นดังนี้ จีโนไทป์ GG, GA และ AA พบ 63 (58.9%), 33 (30.8%) และ 11 (10.3%) ตามลำดับ ส่วนในกลุ่ม HBeAg-negative CHB พบ 89 (60.5%), 47 (32.0%) และ 11 (7.5%) ตามลำดับ

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่าง *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่มเพคอินเตอร์เฟอรอน พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB จีโนไทป์ GG ไม่สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษา แต่ในขณะที่ในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษา (OR=2.25, 95%CI=1.12-4.55, $P=0.023$) นอกจากนี้ยังพบว่าจีโนไทป์ของ *HLA-DPA1* rs3077 สัมพันธ์กับระดับ HBsAg ในระหว่างการรักษาและระหว่างการติดตามผลการรักษา ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB อีกด้วย โดยกลุ่มจีโนไทป์ GG มีการลดลงของระดับ HBsAg มากกว่ากลุ่มจีโนไทป์ GA และ AA (non-GG) อย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์ที่ 48, 72 และ 96 ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ระดับ HBsAg ระหว่างการรักษาและระหว่างการติดตามการรักษา ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB ที่มีจีโนไทป์ของ *HLA-DPA1* rs3077 แตกต่างกัน

หมายเหตุ * หมายถึง $P < 0.05$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม GG และ non-GG

6.2 ยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860

จากผลการหาจีโนไทป์ของยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 ในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB เป็นดังนี้ จีโนไทป์ CC, CT และ TT พบ 96 (89.7%), 11 (10.3%) และ 0 (0%) ตามลำดับ ส่วนในกลุ่ม HBeAg-negative CHB พบ 124 (84.4%), 22 (15.0%) และ 1 (0.6%) ตามลำดับ

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่าง *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 จีโนไทป์ CC กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่มเพคอินเตอร์เฟอรอน พบว่าทั้งในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB และ HBeAg-negative CHB จีโนไทป์ CC ไม่สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษา

6.3 ยีน *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590

จากผลการหาจีโนไทป์ของยีน *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590 พบว่ามีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปพร้อมกับ *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 (LD) โดยในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB เป็นดังนี้ จีโนไทป์ TT/TT, TT/ Δ G และ Δ G/ Δ G พบ 96 (89.7%), 11 (10.3%) และ 0 (0%) ส่วนในกลุ่ม HBeAg-negative CHB พบ 124 (84.4%), 22 (15.0%) และ 1 (0.6%) ตามลำดับ

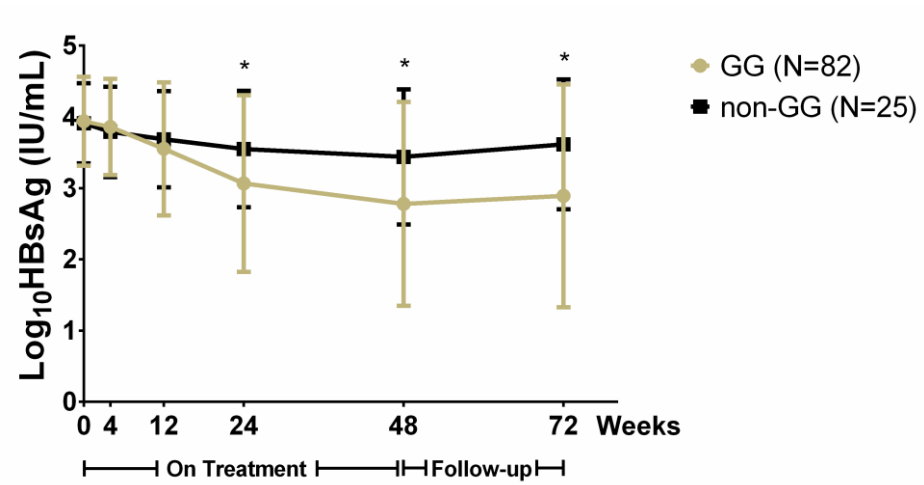
จากการหาความสัมพันธ์ระหว่าง *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590 จีโนไทป์ TT/TT กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่มเพคอินเตอร์เฟอรอน พบว่าทั้งในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB และ HBeAg-negative CHB จีโนไทป์ TT/TT ไม่สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษา

6.4 ยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A

จากผลการหาจีโนไทป์ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A ในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB เป็นดังนี้ จีโนไทป์ GG, GA และ AA พบ 82 (76.6%), 21 (19.6%) และ 4 (3.7%) ตามลำดับ ส่วนในกลุ่ม HBeAg-negative CHB พบ 109 (74.1%), 36 (24.5%) และ 2 (1.4%) ตามลำดับ

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่าง *IP-10* ตำแหน่ง G-201A กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษา (OR=3.81, 95%CI=1.31-11.12, $P=0.014$) นอกจากนี้ยังพบว่าจีโนไทป์ของ *IP-10* ตำแหน่ง G-201A สัมพันธ์กับระดับ HBsAg ในระหว่างการรักษาและระหว่างการติดตามผลการรักษาในผู้ป่วย HBeAg-positive CHB อีกด้วย โดยกลุ่มจีโนไทป์ GG มีการลดลงของระดับ HBsAg มากกว่า กลุ่มจีโนไทป์ GA และ AA (non-GG) อย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์ที่ 24, 48 และ 72 ดัง

รูปที่ 9 ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB จีโนไทป์ GG ไม่สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษา แต่สัมพันธ์กับระดับเอนไซม์ ALT ก่อนการรักษา โดยในกลุ่มผู้ป่วยจีโนไทป์ GG มีระดับเอนไซม์ ALT ก่อนการรักษาต่ำกว่า กลุ่ม non-GG อย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 9 ระดับ HBsAg ระหว่างการรักษาและระหว่างการติดตามการรักษา ในผู้ป่วย HBeAg positive CHB ที่มีจีโนไทป์ของ *IP-10 G-201A* แตกต่างกัน

หมายเหตุ * หมายถึง $P < 0.05$ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม GG และ non-GG

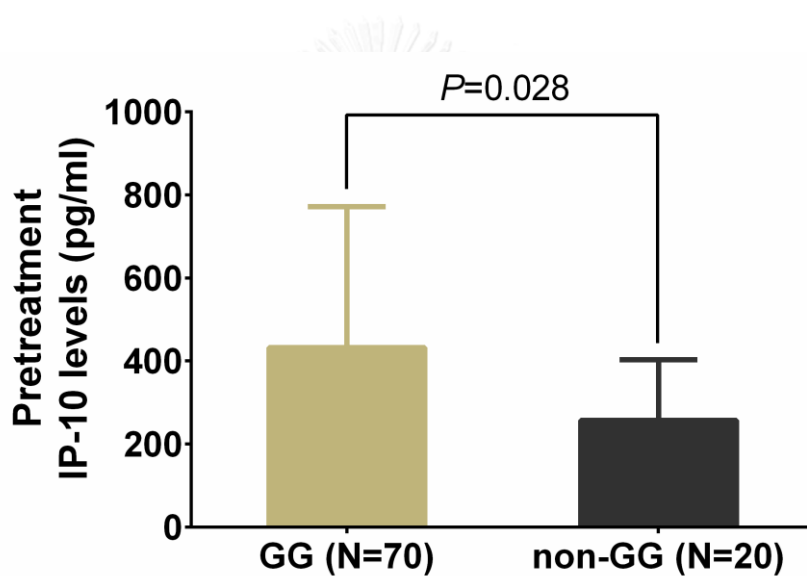
ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ (Logistic regression analysis) ปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการรักษา (virological response)

| | Odd ratio | 95% Confident Interval | P value |
|----------------------------------------|-----------|------------------------|---------|
| HBeAg-positive CHB | | | |
| Age (<40 years) | 1.35 | 0.51-3.55 | 0.545 |
| Gender (male) | 0.67 | 0.29-1.52 | 0.342 |
| ALT (>80 U/l) | 1.37 | 0.63-2.97 | 0.427 |
| Log ₁₀ HBV DNA (<7.0 IU/ml) | 1.24 | 0.57-2.72 | 0.592 |
| Log ₁₀ HBsAg (<4.0 IU/ml) | 2.13 | 0.96-4.73 | 0.062 |
| Liver stiffness (<7.5 kPa) | 1.27 | 0.43-3.78 | 0.667 |
| <i>IL28B</i> rs12979860-CC | 0.70 | 0.19-2.59 | 0.594 |
| <i>IFNL4</i> ss469415590-TT/TT | 0.70 | 0.19-2.59 | 0.594 |
| <i>HLA-DPA1</i> rs3077-GG | 1.27 | 0.58-2.76 | 0.552 |
| <i>IP-10</i> G-201A-GG | 3.81 | 1.31-11.12 | 0.014* |
| Serum IP-10 level (≥ 500pg/mL) | 3.07 | 1.10-8.54 | 0.032* |
| HBeAg-negative CHB | | | |
| Age (<40 years) | 0.84 | 0.43-1.62 | 0.598 |
| Gender (male) | 1.14 | 0.59-2.21 | 0.696 |
| ALT (>80 U/l) | 1.22 | 0.57-2.60 | 0.611 |
| Log ₁₀ HBV DNA (<5.0 IU/ml) | 1.16 | 0.59-2.27 | 0.657 |
| Log ₁₀ HBsAg (<3.5 IU/ml) | 2.62 | 1.31-5.24 | 0.007* |
| Liver stiffness (<7.5 kPa) | 0.94 | 0.39-2.23 | 0.883 |
| <i>IL28B</i> rs12979860-CC | 0.80 | 0.35-1.85 | 0.603 |
| <i>IFNL4</i> ss469415590-TT/TT | 0.80 | 0.35-1.85 | 0.603 |
| <i>HLA-DPA1</i> rs3077-GG | 2.25 | 1.12-4.55 | 0.023* |
| <i>IP-10</i> G-201A-GG | 0.81 | 0.38-1.70 | 0.568 |

หมายเหตุ * หมายถึง $P < 0.05$

7. การวัดปริมาณ IP-10 ในซีรัมของผู้ป่วย HBeAg positive CHB ก่อนการรักษา

จากการวัดปริมาณ IP-10 ในซีรัมของผู้ป่วย HBeAg positive CHB ก่อนการรักษาพบว่า มีค่าเฉลี่ย 393 pg/mL โดยในผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาพบว่า มีระดับ IP-10 เฉลี่ย 496 pg/mL ซึ่งสูงกว่าในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาที่มีระดับ IP-10 เฉลี่ย 328 pg/mL ($P=0.013$) นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับ IP-10 ก่อนการรักษา สัมพันธ์กับจีโนไทป์ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A โดยในกลุ่มผู้ป่วยจีโนไทป์ GG มีระดับ IP-10 เฉลี่ย 432.2 pg/mL ซึ่งสูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยจีโนไทป์ GA และ AA (non-GG) ที่มีระดับ IP-10 เฉลี่ย 257.3 pg/mL อย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.028$) ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 ระดับ IP-10 ในซีรัมของผู้ป่วย HBeAg positive CHB ก่อนการรักษาในผู้ป่วยกลุ่มจีโนไทป์ GG และ non-GG

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 ในผู้ป่วย HBeAg positive CHB

HLA-DP จัดเป็นยีนที่ควบคุมและกำหนดการสร้างโมเลกุล HLA class II ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการนำเสนอเปปไทด์ของแอนติเจนให้แก่ CD4+ T cell ที่เป็นกลไกสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ HBV (11) ซึ่งจากการศึกษา GWAS ในชาวเอเชีย ได้มีการระบุ SNP rs3077 สัมพันธ์กับการขจัดเชื้อ HBV โดยธรรมชาติ (natural clearance) (7) นอกจากนี้การศึกษาในประเทศไทย โดย Posuwan N. และคณะพบว่า rs3077 สัมพันธ์กับการเกิด HBsAg clearance โดยธรรมชาติด้วย (46)

จากการศึกษาก่อนหน้ามีหลายงานวิจัยที่รายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วย HBeAg positive CHB ทั้งชาวเอเชียและชาวจีน (34, 35, 47) เช่นการศึกษาของ Tseng TC. และคณะได้ทำการศึกษาในชาวไต้หวัน พบว่าจีโนไทป์ GG มีอัตราการเกิด HBeAg seroconversion สูงกว่าจีโนไทป์อื่น โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการรักษาด้วย PEG-IFN เป็นเวลา 6 เดือน และติดเชื้อ HBV จีโนไทป์ B (34). ในขณะที่ Cheng L. และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยชาวจีน พบว่า rs3077 จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับอัตราการเกิด HBeAg loss และ anti-HBe seroconversion (35) นอกจากนี้การศึกษาในชาวจีนที่ส่วนใหญ่ติดเชื้อ HBV จีโนไทป์ A และ D พบว่าผู้ป่วยที่มี rs3077 จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย PEG-IFN แต่การกระจายตัวของอัลลีลแตกต่างจากชาวเอเชีย โดยอัลลีล G เป็นอัลลีลที่พบน้อย (minor allele) ในชาวจีน แต่พบบ่อย (major allele) ในชาวเอเชีย (47)

โดยงานวิจัยนี้พบว่า การกระจายตัวของอัลลีลในผู้ป่วยชาวไทยสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศไทย (34) และจีน (35) คือ อัลลีล G เป็นอัลลีลที่พบบ่อย แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง SNP rs3077 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา Peg-IFN ในผู้ป่วย HBeAg positive CHB ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยก่อนหน้า (34, 35, 47) โดยอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของหลายปัจจัย เช่น จีโนไทป์ของไวรัสซึ่งในงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่เป็น HBV จีโนไทป์ C , ขนาดของกลุ่มประชากรที่ศึกษาซึ่งเล็กกว่าการศึกษาก่อนหน้า, พันธุกรรมของผู้ติดเชื้อในแต่ละเชื้อชาติ (genetic background) และสูตรการรักษา โดยในงานวิจัยนี้ผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วย

PEG-IFN เป็นเวลา 1 ปี ในขณะที่การศึกษาในไต้หวันและจีนผู้ป่วยได้รับยาเพียง 6 เดือน (34, 35) รวมทั้งการประเมินผลการรักษาก็ยังแตกต่างกันอีกด้วย

ยีน *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB

ในปี 2014 Brouwer WP. และคณะได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ตำแหน่ง rs3077 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา Peg-IFN ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB ในชาวผิวขาว ซึ่งพบว่า *HLA-DPA1* rs3077 จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการการตอบสนองต่อการรักษา (ระดับ HBV DNA < 2000 IU/mL หลังจากหยุดการรักษาแล้ว 6 เดือน) (47)

งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ตำแหน่ง rs3077 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา Peg-IFN ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB ชาวไทย ซึ่งพบว่าผู้ป่วยที่มี *HLA-DPA1* ตำแหน่ง rs3077 เป็นรูปแบบ GG มีอัตราการเกิด VR สูงกว่าผู้ป่วยจีโนไทป์ GA และ AA ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาในชาวผิวขาว ที่ส่วนใหญ่ติดเชื้อ HBV โนไทป์ A และ D (47) แต่ความถี่ของอัลลีลแตกต่างกัน โดยอัลลีล G เป็นอัลลีลที่พบน้อย (minor allele) ในชาวผิวขาว แต่พบมากในชาวไทย อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่ระบุว่าผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg negative CHB ที่ตอบสนองต่อการรักษา ยังคงมีโอกาสเกิดการกำเริบของการติดเชื้อได้ โดยเฉพาะในช่วงเวลา 1 ปีแรกหลังหยุดการรักษา (48) ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า rs3077 จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการลดลงของ HBsAg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในระหว่างการรักษาและช่วงเวลาที่ติดตามหลังหยุดการรักษา นอกจากนี้จีโนไทป์ GG ยังสัมพันธ์กับระดับ HBsAg < 1000 IU/ml หลังจกหยุดการรักษาแล้ว 6 เดือน ซึ่งเป็นจุดสิ้นสุดการรักษา (endpoints) ที่เคยมีรายงานระบุว่าสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาแบบยั่งยืน (sustained response) (48-50)

เนื่องจากที่ผ่านมา มีการศึกษาที่รายงานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *HLA-DPA1* สัมพันธ์กับการควบคุมของระบบภูมิคุ้มกันและการดำเนินโรคของการติดเชื้อ HBV (7, 51) ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณนี้อาจส่งผลต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่าง APC และ T cells ให้แข็งแรงมากขึ้น และอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในการต้านเชื้อไวรัสดีขึ้น กระบวนการทั้งหมดนี้อาจส่งผลทำให้ประสิทธิภาพของยา Peg-IFN เหนี่ยวนำให้มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ (47) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงช่วยเพิ่มความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสและระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยและชี้ให้เห็นว่าในประเทศไทยสามารถใช้ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *HLA-DPA1* เป็นตัวพยากรณ์ผลการรักษาในผู้ป่วย CHB ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรอื่นอีกเพื่อยืนยันผลการศึกษาที่เกิดขึ้น

ยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 และ *IFNL4* ตำแหน่ง ss469415590 ในผู้ป่วย HBeAg-positive CHB และ HBeAg-negative CHB

จากการศึกษาด้านไวรัสตับอักเสบบีพบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมตำแหน่ง rs12979860 และ ss469415590 สามารถใช้เป็นตัวทำนายการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา PEG-IFN ร่วมกับ RBV รวมทั้งเป็นตัวทำนายการเกิด spontaneous HCV clearance อีกด้วย (16, 52) โดย SNPs ทั้งสองตำแหน่งมีลักษณะเป็น linkage disequilibrium (LD) สูงในกลุ่มเชื้อชาติเอเชียและยุโรป และมีลักษณะ LD ปานกลางในชาวแอฟริกัน โดยโปรตีน IFNL4 มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถเหนี่ยวนำวิถี JAK-STAT และการแสดงออกของกลุ่มยีน ISG (16) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่า การเหนี่ยวนำการแสดงออกของ *IL28B* และ *IP-10* mRNA ขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางพันธุกรรมตำแหน่ง ss469415590 ไม่ใช่ rs12979860 ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่า ss469415590 เป็น functional variant ที่สัมพันธ์กับการเกิด HCV clearance (52) โดยมีการศึกษาที่พบว่า โปรตีน IFNL4 รูปแบบที่ active สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ ISG ในตับให้มีระดับสูงก่อนการรักษา ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการขจัดเชื้อ HCV ลดลง (53)

ในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา กลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วย CHB แต่ยังไม่มียางานการศึกษาผลของ ss469415590 ในผู้ป่วย CHB ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของ ss469415590 และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา กลุ่ม PEG-IFN ทั้งในผู้ป่วย HBeAg-positive CHB และ HBeAg-negative CHB ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่า SNPs rs12979860 และ ss469415590 ลักษณะเป็น LD กัน คือมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปพร้อมกัน โดยรูปแบบอัลลีล C ของ rs12979860 มักพบคู่กับรูปแบบอัลลีล T ของ ss469415590 ซึ่งเป็นอัลลีลที่พบเป็นส่วนใหญ่ในประชากรและรูปแบบอัลลีล T ของ rs12979860 พบร่วมกับรูปแบบ อัลลีล ΔG ของ ss469415590 ซึ่งเป็นอัลลีลที่พบน้อย แต่ในการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ทั้งสองตำแหน่งกับการตอบสนองต่อการรักษาทั้งในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB และ HBeAg-negative CHB

ที่ผ่านมา มีหลายงานวิจัย ที่ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ในผู้ติดเชื้อ HBV กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา กลุ่ม PEG-IFN แต่ยังมีข้อมูลที่ไม่ชัดเจน และมีบางงานวิจัยที่ให้ผลขัดแย้งกัน เช่น การศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive CHB ทั้งชาวเอเชียและยุโรป พบว่า rs12979860 จีโนไทป์ CC สัมพันธ์กับโอกาสการเกิด HBeAg clearance หลังจากหยุดการรักษาเป็นเวลา 6 เดือน (38) การศึกษาในผู้ป่วยชาวจีน HBeAg-positive CHB พบว่า SNP rs12979860 สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา

กลุ่ม PEG-IFN (40) นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ทำการศึกษาในประเทศอิตาลี พบว่าในผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg-negative CHB ที่ติดเชื้อ HBV จีโนไทป์ D ความหลากหลายทางพันธุกรรมตำแหน่ง rs12979860 สัมพันธ์กับการเกิด HBsAg clearance (39) ในทางตรงกันข้าม มีหลายรายงานที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ดังกล่าวกับการตอบสนองต่อการรักษาทั้งใน HBeAg-positive CHB และ HBeAg-negative CHB (34, 35, 54-56)

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *IL28B* และ *IFNL4* ต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN อาจแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วย CHB และ CHC ซึ่งในผู้ป่วย CHC ความหลากหลายทางพันธุกรรมตำแหน่ง rs12979860 และ ss469415590 ก็ไม่สามารถทำนายการตอบสนองต่อการรักษาได้ในทุกจีโนไทป์ ดังเช่นการศึกษาของ Akkarathamrongsin S. และคณะพบว่าทั้ง rs12979860 และ ss469415590 สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา PEG-IFN ร่วมกับ RBV ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HCV จีโนไทป์ 1 เท่านั้น ไม่สัมพันธ์กับ HCV จีโนไทป์ 3 และ 6 (57) ดังนั้นการทำนายผลการรักษาโดยใช้ SNPs rs12979860 และ ss469415590 จึงมีประโยชน์เฉพาะในผู้ป่วย CHC ที่ติดเชื้อ HCV จีโนไทป์ 1 เท่านั้น ในขณะที่ผู้ป่วย CHB SNPs ดังกล่าวไม่สามารถใช้ทำนายผลการรักษาได้

ตารางที่ 19 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณยีน *IL28B* ตำแหน่ง rs12979860 กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในประเทศต่างๆ

| Patients | Reference | Ethnicity (region) | HBV genotype | Sample size | result |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------|-------------|--------|
| HBeAg-Positive CHB | Sonneveld MJ, et al.(58) | Caucasian, African and Asian | A, B, C, D | 205 | AS |
| | Wu H, et al.(40) | Asian (Chinese) | B, C | 212 | AS |
| | Holmes JA, et al.(55) | Asian, Caucasian, and African | A, B, C, D | 60 | NAS |
| | Zhang Q, et al.(56) | Caucasian (France) | A, B, C, D, E, G | 97 | NAS |
| | Cheng L, et al.(35) | Asian (Chinese) | B, C | 144 | NAS |
| | This study | Asian (Thai) | B, C | 107 | NAS |
| HBeAg-Negative CHB | Lampertico P, et al.(39) | Caucasian (Italy) | D | 101 | AS |
| | Boglione L, et al.(41) | Asian, Caucasian, and African | A, B, C, D, E, F | 190 | AS |
| | Holmes JA, et al.(55) | Asian, Caucasian, and African | A, B, C, D | 36 | NAS |
| | This study | Asian (Thai) | B, C | 147 | NAS |

หมายเหตุ; AS ย่อมาจาก associated หมายถึง งานวิจัยที่พบว่า SNP rs12979860 สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN, NAS ย่อมาจาก not associated หมายถึง งานวิจัยที่พบว่า SNP rs12979860 ไม่สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN

ยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A ในผู้ป่วย HBeAg positive CHB

จากการศึกษาก่อนหน้าได้มีการรายงานว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณ โพรโมเตอร์ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A สัมพันธ์กับความไวต่อการดำเนินโรค CHB นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์หน้าที่ (Functional analysis) พบว่าความหลากหลายของ G-201A มีผลต่อความสามารถในการจับ nuclear protein และควบคุมการแสดงออกของ *IP-10* (45) ล่าสุด Xu Z. และคณะได้รายงานว่ G-201A สัมพันธ์กับการดำเนินโรคในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HBV โดยการเพิ่มการแสดงออก (up-regulating) ของ *IP-10* (20)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาแรกทีอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วย CHB ซึ่งพบว่า จีโนไทป์ของ G-201A สัมพันธ์กับอัตราการเกิด VR ในผู้ป่วย HBeAg positive CHB โดยในกลุ่มผู้ป่วยจีโนไทป์ GG มีความถี่ของการเกิด HBeAg clearance ร่วมกับ HBV DNA suppression สูงกว่ากลุ่มจีโนไทป์ non-GG โดยการเกิด HBeAg clearance ร่วมกับ HBV DNA suppression นี้เป็นจุดยุติการรักษา (therapeutic endpoint) ซึ่งเป็นข้อแนะนำที่อยู่ในแนวทางการรักษาระดับนานาชาติ เนื่องจากให้ผลเป็นระยะเวลายาวนาน และสัมพันธ์กับผลการรักษาที่ดีขึ้น รวมทั้งลดอัตราการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับ (59) นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังพบว่า G-201A จีโนไทป์ GG สัมพันธ์กับการลดลงอย่างรวดเร็วของระดับ HBsAg ในระหว่างการรักษา รวมทั้งมีปริมาณ HBsAg ในระดับต่ำ (<100 IU/mL) เมื่อหยุดการรักษาแล้วอีกด้วย ซึ่งจากการศึกษาในกลุ่มประชากรชาวเอเชีย พบว่าปริมาณ HBsAg ที่ต่ำกว่า 100 IU/mL สามารถใช้เป็นเกณฑ์พิจารณาว่าผู้ป่วยรายนั้นมีโอกาสการเกิด spontaneous HBsAg clearance สูง (60, 61)

งานวิจัยนี้เป็นการสนับสนุนแนวคิดที่ว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของผู้ป่วยอาจมีบทบาทต่อผลการรักษาผู้ป่วย CHB ด้วยยา PEG-IFN ในปัจจุบันกลไกที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรม G-201A ที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าอาจเกิดจาก G-201A มีผลต่อระดับ *IP-10* ในซีรัม โดยงานวิจัยนี้พบว่าผู้ป่วยที่มี G-201A จีโนไทป์ GG มีระดับ *IP-10* ในซีรัมก่อนการรักษาสูงกว่าในผู้ป่วยกลุ่ม non-GG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า G-201A มีผลต่อความสามารถในการจับของ nuclear protein ซึ่งควบคุมการแสดงออกของ *IP-10* (45) นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่มีระดับ *IP-10* ในซีรัมก่อนการรักษาสูงมีโอกาในการเกิด HBeAg clearance และ HBV DNA suppression สูงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่า ระดับ *IP-10* ในซีรัมสูง สัมพันธ์กับโอกาสในการเกิด HBeAg clearance และการลดลงของระดับ HBsAg ในผู้ป่วย CHB ที่ได้รับการรักษาด้วยยากลุ่ม PEG-IFN หรือ NA (62-65) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าในผู้ป่วยที่

ตอบสนองต่อการรักษา มักมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอยู่ก่อนแล้ว เช่น ผู้ป่วยที่ระดับเอนไซม์ ALT สูงก่อนการรักษา จะมีอัตราการตอบสนองต่อการรักษาสูงกว่า (66) ดังนั้นจากงานวิจัยนี้ ผู้ป่วยที่มีระดับ IP-10 สูงก่อนการรักษาอาจแสดงถึงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ก่อนแล้ว (pre-existing immune response) ซึ่งส่งผลให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีโอกาสตอบสนองต่อการรักษาด้วย PEG-IFN ดีกว่านั่นเอง

ยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB

งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *IP-10* ตำแหน่ง G-201A และการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ในผู้ป่วย HBeAg negative CHB ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในผู้ป่วยกลุ่มนี้ แต่พบว่าจีโนไทป์ของ G-201A สัมพันธ์กับระดับเอนไซม์ ALT ก่อนการรักษา โดยในกลุ่มผู้ป่วยจีโนไทป์ GG มีระดับเอนไซม์ ALT ก่อนการรักษาต่ำกว่ากลุ่ม non-GG อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งระดับ ALT สูงก่อนการรักษาสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN (67-69) การศึกษาในประเทศอิตาลี พบว่าในผู้ป่วย HBeAg negative CHB ที่มีระดับ ALT ก่อนการรักษาสูงมากกว่า 5 เท่าของค่าปกติ มีโอกาสตอบสนองต่อการรักษาสูงกว่า (69) แต่ในงานวิจัยนี้พบว่าระดับ ALT ก่อนการรักษาไม่แตกต่างกันในกลุ่มผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาและไม่ตอบสนองต่อการรักษา ซึ่งอาจเกิดจากผู้ป่วย HBeAg negative CHB เป็นระยะที่ระดับเอนไซม์ ALT สูงและมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงเป็นระยะๆ รวมทั้งพบว่าระดับ ALT อาจไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของตับอักเสบเสมอไปและยังอาจแปรผันไปตามน้ำหนักตัว รวมทั้งปัจจัยอื่นๆของผู้ป่วยด้วย

กล่าวโดยสรุปคือ งานวิจัยนี้พบว่า SNP ตำแหน่ง G-201A ของยีน *IP-10* สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาผู้ป่วย HBeAg-positive CHB และ SNP ตำแหน่ง rs3077 ของยีน *HLA-DPA1* สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาในผู้ป่วย HBeAg-negative CHB ซึ่งอาจช่วยในการระบุตัวพยากรณ์ (predictors) ผลการรักษาด้วยยากกลุ่ม PEG-IFN ซึ่งเป็นการลดค่าใช้จ่ายและผลข้างเคียงจากการรักษาได้ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังต้องการ การศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรอื่นๆเพื่อเป็นการยืนยันผล โดยเฉพาะ SNP ตำแหน่ง G-201A ของยีน *IP-10* ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

รายการอ้างอิง

1. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat.* 2004;11(2):97-107.
2. Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, Fleischer R, Lok AS. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2007;45(4):1056-75.
3. Tangkijvanich P, Komolmit P, Mahachai V, Sa-nguanmoo P, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Low pretreatment serum HBsAg level and viral mutations as predictors of response to PEG-interferon alpha-2b therapy in chronic hepatitis B. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2009;46(2):117-23.
4. Chan HL, Tse AM, Zhang MD, Wong VW, Chim AM, Hui AY, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-1-beta in association with sustained response to antiviral treatment in chronic hepatitis B in Chinese. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(12):1703-11.
5. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *Journal of hepatology.* 2009;50(2):227-42.
6. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2009;50(3):661-2.
7. Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, et al. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nature genetics.* 2009;41(5):591-5.
8. Guo X, Zhang Y, Li J, Ma J, Wei Z, Tan W, et al. Strong influence of human leukocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2011;53(2):422-8.

9. Hu L, Zhai X, Liu J, Chu M, Pan S, Jiang J, et al. Genetic variants in human leukocyte antigen/DP-DQ influence both hepatitis B virus clearance and hepatocellular carcinoma development. *Hepatology*. 2012;55(5):1426-31.
10. Ferrari C, Missale G, Boni C, Urbani S. Immunopathogenesis of hepatitis B. *J Hepatol*. 2003;39 Suppl 1:S36-42.
11. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:23-61.
12. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009;461(7262):399-401.
13. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*. 2009;41(10):1100-4.
14. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009;41(10):1105-9.
15. O'Brien TR. Interferon-alfa, interferon-[lambda] and hepatitis C. *Nat Genet*. 2009;41(10):1048-50.
16. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet*. 2013;45(2):164-71.
17. Ray K. Hepatitis: New gene IFNL4 is associated with impaired clearance of HCV. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(2):63.
18. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *J Leukoc Biol*. 2003;74(3):360-9.

19. Beinhardt S, Aberle JH, Strasser M, Dulic-Lakovic E, Maieron A, Kreil A, et al. Serum level of IP-10 increases predictive value of IL28B polymorphisms for spontaneous clearance of acute HCV infection. *Gastroenterology*. 2012;142(1):78-85.e2.
20. Xu Z, Liu Y, Liu L, Li X, Bai S, Rong Y, et al. Association of interferon-gamma induced protein 10 promoter polymorphisms with the disease progression of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *PLoS One*. 2013;8(9):e72799.
21. Harrison TJ. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. *Seminars in liver disease*. 2006;26(2):87-96.
22. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2006;43(2 Suppl 1):S173-81.
23. Kwon H, Lok AS. Hepatitis B therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(5):275-84.
24. Feld JJ, Heathcote EJ. Hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B: natural history and treatment. *Semin Liver Dis*. 2006;26(2):116-29.
25. Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B: natural history and treatment. *Semin Liver Dis*. 2006;26(2):130-41.
26. Yuen MF. Revisiting the natural history of chronic hepatitis B: impact of new concepts on clinical management. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(7):973-6.
27. Perrillo RP. Therapy of hepatitis B -- viral suppression or eradication? *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2006;43(2 Suppl 1):S182-93.
28. Lau GK. Current treatments for patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B virus infection: a comparison focusing on HBeAg seroconversion. *Liver Int*. 2010;30(4):512-20.
29. Thursz M. Genetic susceptibility in infectious diseases. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2000;17:253-64.

30. Thursz M, Yee L, Khakoo S. Understanding the host genetics of chronic hepatitis B and C. *Semin Liver Dis.* 2011;31(2):115-27.
31. Thursz MR. Host genetic factors influencing the outcome of hepatitis. *J Viral Hepat.* 1997;4(4):215-20.
32. de Andrade DR, Jr., de Andrade DR. The influence of the human genome on chronic viral hepatitis outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(3):119-26.
33. Visvanathan K, Lewin SR. Immunopathogenesis: role of innate and adaptive immune responses. *Seminars in liver disease.* 2006;26(2):104-15.
34. Tseng TC, Yu ML, Liu CJ, Lin CL, Huang YW, Hsu CS, et al. Effect of host and viral factors on hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients receiving pegylated interferon-alpha-2a therapy. *Antivir Ther.* 2011;16(5):629-37.
35. Cheng L, Sun X, Tan S, Tan W, Dan Y, Zhou Y, et al. Effect of HLA-DP and IL28B gene polymorphisms on response to interferon treatment in hepatitis B e-antigen seropositive chronic hepatitis B patients. *Hepatol Res.* 2013.
36. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature.* 2009;461(7265):798-801.
37. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol.* 2005;79(6):3851-4.
38. Sonneveld MJ, Wong VW, Woltman AM, Wong GL, Cakaloglu Y, Zeuzem S, et al. Polymorphisms near IL28B and serologic response to peginterferon in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2012;142(3):513-20.e1.
39. Lampertico P, Vigano M, Cheroni C, Facchetti F, Invernizzi F, Valveri V, et al. IL28B polymorphisms predict interferon-related hepatitis B surface antigen seroclearance in genotype D hepatitis B e antigen-negative patients with chronic hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2013;57(3):890-6.

40. Wu H, Zhao G, Qian F, Liu K, Xie J, Zhou H, et al. Association of IL28B polymorphisms with peginterferon treatment response in Chinese Han patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Liver Int.* 2014.
41. Boglione L, Cusato J, Allegra S, Esposito I, Patti F, Cariti G, et al. Role of IL28-B polymorphisms in the treatment of chronic hepatitis B HBeAg-negative patients with peginterferon. *Antiviral Res.* 2014;102:35-43.
42. Rehermann B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat Med.* 2013;19(7):859-68.
43. Lagging M, Romero AI, Westin J, Norkrans G, Dhillon AP, Pawlotsky JM, et al. IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology.* 2006;44(6):1617-25.
44. Grebely J, Feld JJ, Applegate T, Matthews GV, Hellard M, Sherker A, et al. Plasma interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) levels during acute hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2013;57(6):2124-34.
45. Deng G, Zhou G, Zhang R, Zhai Y, Zhao W, Yan Z, et al. Regulatory polymorphisms in the promoter of CXCL10 gene and disease progression in male hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology.* 2008;134(3):716-26.
46. Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, et al. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in Thai population. *PLoS One.* 2014;9(1):e86007.
47. Brouwer WP, Sonneveld MJ, Tabak F, Simon K, Cakaloglu Y, Akarca US, et al. Polymorphisms of HLA-DP are associated with response to peginterferon in Caucasian patients with chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40(7):811-8.
48. Marcellin P, Bonino F, Lau GK, Farci P, Yurdaydin C, Piratvisuth T, et al. Sustained response of hepatitis B e antigen-negative patients 3 years after treatment with peginterferon alpha-2a. *Gastroenterology.* 2009;136(7):2169-79.e1-4.

49. Buster EH, Flink HJ, Cakaloglu Y, Simon K, Trojan J, Tabak F, et al. Sustained HBeAg and HBsAg loss after long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with peginterferon alpha-2b. *Gastroenterology*. 2008;135(2):459-67.
50. Sonneveld MJ, Rijckborst V, Cakaloglu Y, Simon K, Heathcote EJ, Tabak F, et al. Durable hepatitis B surface antigen decline in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients treated with pegylated interferon-alpha2b: relation to response and HBV genotype. *Antivir Ther*. 2012;17(1):9-17.
51. Seto WK, Wong DK, Kopaniszen M, Proitsi P, Sham PC, Hung IF, et al. HLA-DP and IL28B polymorphisms: influence of host genome on hepatitis B surface antigen seroclearance in chronic hepatitis B. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013;56(12):1695-703.
52. Bibert S, Roger T, Calandra T, Bochud M, Cerny A, Semmo N, et al. IL28B expression depends on a novel TT/-G polymorphism which improves HCV clearance prediction. *J Exp Med*. 2013;210(6):1109-16.
53. Terczynska-Dyla E, Bibert S, Duong FH, Krol I, Jorgensen S, Collinet E, et al. Reduced IFNlambda4 activity is associated with improved HCV clearance and reduced expression of interferon-stimulated genes. *Nat Commun*. 2014;5:5699.
54. de Niet A, Takkenberg RB, Benayed R, Riley-Gillis B, Weegink CJ, Zaaijer HL, et al. Genetic variation in IL28B and treatment outcome in HBeAg-positive and -negative chronic hepatitis B patients treated with Peg interferon alfa-2a and adefovir. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47(4):475-81.
55. Holmes JA, Nguyen T, Ratnam D, Heerasing NM, Tehan JV, Bonanzinga S, et al. IL28B genotype is not useful for predicting treatment outcome in Asian chronic hepatitis B patients treated with pegylated interferon-alpha. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(5):861-6.
56. Zhang Q, Lapalus M, Asselah T, Laouenan C, Moucari R, Martinot-Peignoux M, et al. IFNL3 (IL28B) polymorphism does not predict long-term response to interferon therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. *J Viral Hepat*. 2014;21(7):525-32.

57. Akkarathamrongsin S, Thong VD, Payungporn S, Poovorawan K, Prapunwattana P, Poovorawan Y, et al. IFNL3 (IL28B) and IFNL4 polymorphisms are associated with treatment response in Thai patients infected with HCV genotype 1, but not with genotypes 3 and 6. *Journal of Medical Virology*. 2014;86(9):1482-90.
58. Sonneveld MJ, Wong VWS, Woltman AM, Wong GLH, Cakaloglu Y, Zeuzem S, et al. Polymorphisms Near IL28B and Serologic Response to Peginterferon in HBeAg-Positive Patients With Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology*.142(3):513-20.e1.
59. Moucari R, Korevaar A, Lada O, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Mackiewicz V, et al. High rates of HBsAg seroconversion in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients responding to interferon: a long-term follow-up study. *J Hepatol*. 2009;50(6):1084-92.
60. Chan HL, Wong GL, Tse CH, Chan HY, Wong VW. Viral determinants of hepatitis B surface antigen seroclearance in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients. *J Infect Dis*. 2011;204(3):408-14.
61. Chen YC, Jeng WJ, Chu CM, Liaw YF. Decreasing levels of HBsAg predict HBsAg seroclearance in patients with inactive chronic hepatitis B virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(3):297-302.
62. Sonneveld MJ, Arends P, Boonstra A, Hansen BE, Janssen HL. Serum levels of interferon-gamma-inducible protein 10 and response to peginterferon therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2013;58(5):898-903.
63. Wang Y, Zhao C, Zhang L, Yu W, Shen C, Wang W, et al. Predictive value of interferon-gamma inducible protein 10 kD for hepatitis B e antigen clearance and hepatitis B surface antigen decline during pegylated interferon alpha therapy in chronic hepatitis B patients. *Antiviral Res*. 2014;103:51-9.
64. Jaroszewicz J, Ho H, Markova A, Deterding K, Wursthorn K, Schulz S, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) decrease and serum interferon-inducible protein-10 levels as predictive markers for HBsAg loss during treatment with nucleoside/nucleotide analogues. *Antivir Ther*. 2011;16(6):915-24.

65. Papatheodoridis G, Goulis J, Manolakopoulos S, Margariti A, Exarchos X, Kokkonis G, et al. Changes of HBsAg and interferon-inducible protein 10 serum levels in naive HBeAg-negative chronic hepatitis B patients under 4-year entecavir therapy. *J Hepatol.* 2014;60(1):62-8.
66. Buster EH, Hansen BE, Lau GK, Piratvisuth T, Zeuzem S, Steyerberg EW, et al. Factors that predict response of patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B to peginterferon-alfa. *Gastroenterology.* 2009;137(6):2002-9.
67. Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, et al. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *The New England journal of medicine.* 2005;352(26):2682-95.
68. Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, et al. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet.* 2005;365(9454):123-9.
69. Bonino F, Marcellin P, Lau GK, Hadziyannis S, Jin R, Piratvisuth T, et al. Predicting response to peginterferon alpha-2a, lamivudine and the two combined for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Gut.* 2007;56(5):699-705.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. Lysis buffer

| สารเคมีที่ใช้ | ปริมาณ |
|---------------|----------|
| Tris-HCl | 0.105 g |
| EDTA | 0.1245 g |
| SDS | 0.335 g |

จากนั้นเติม distilled water จนมีปริมาตร 50 ml แล้วเก็บที่ 4 °C

2. 2M Sodium Acetate (2M NaOAc)

| สารเคมีที่ใช้ | ปริมาณ |
|----------------|--------|
| Sodium acetate | 4.92 g |

จากนั้นเติม distilled water 30 ml

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

| สารเคมีที่ใช้ | ปริมาณ |
|-----------------|--------|
| Isoamyl Alcohol | 1 ml |

เติม Chloroform จนปริมาตรรวมเป็น 50 ml

4. 70% Ethanol

| สารเคมีที่ใช้ | ปริมาณ |
|------------------|--------|
| Absolute Ethanol | 70 ml |

เติม distilled water ให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 ml

5. 5X Tris Borate Buffer (5xTBE)

| สารเคมีที่ใช้ | ปริมาณ |
|---------------|--------|
| Tris base | 54 g |
| Boric acid | 27.5 g |
| EDTA (pH 8.0) | 20 ml |

จากนั้นเติม Distilled water ปริมาตร 1000 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. การเตรียม 2% (w/v) agarose gel ปริมาตร 100 ml

| สารเคมีที่ใช้ | ปริมาณ |
|---------------|--------|
| Agarose | 2 g |
| 1X TBE buffer | 100 ml |

7. 3% (w/v) agarose gel ปริมาตร 100 ml

| สารเคมีที่ใช้ | ปริมาณ |
|---------------|--------|
| Agarose | 3 g |
| 1X TBE buffer | 100 ml |

8. 10% Ethidium bromide

| สารเคมีที่ใช้ | ปริมาณ |
|------------------|-------------|
| Ethidium bromide | 30 μ l |
| Distill water | 300 μ l |

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวอุมาพร ลิ้มทัย (ภาษาอังกฤษ) Miss.Umaporn Limothai

เกิดวันที่ 4 กันยายน 2533 ที่อยู่ปัจจุบัน 300/364 อาคาร3 คอนโดซีดีส์รีสอร์ทชดาฯ-ห้วยขวาง ซอยประชาอุทิศ 6 ถนนประชาอุทิศ แขวงห้วยขวาง เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ 10300

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานทางวิชาการ

1. Poster Presentation ในงาน European Association for the Study of the Liver (EASL) Special Conference: “Optimal Management of Hepatitis B Virus Infection” ระหว่างวันที่ 26-27 กันยายน 2014 ณ กรุงเอเธนส์ ประเทศกรีซ เรื่อง : IFNL3 (IL28B) and IFNL4 polymorphisms are not associated with treatment response to pegylated interferon-based therapy in Thai patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B
2. Poster Presentation ในงาน Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2015 Istanbul - The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver ระหว่างวันที่ 12-15 มีนาคม 2015 ณ เมืองอิสตันบูล ประเทศตุรกี ทั้งหมด 3 เรื่อง ได้แก่
 - เรื่อง : Single nucleotide polymorphism of HLA-DPA1 is associated with treatment response to pegylated interferon in Thai patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B
 - เรื่อง : IFNL3 (IL28B) and IFNL4 polymorphisms are not associated with treatment response to pegylated interferon in Thai patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B
 - เรื่อง : The association of interferon-gamma induced protein-10 (IP-10) polymorphism and treatment response to pegylated interferon in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B
3. Poster Presentation ในงาน American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) The Liver Meeting 2015 ระหว่างวันที่ 13-17 พฤศจิกายน 2015 ณ เมืองซานฟรานซิสโก รัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา เรื่อง : Association of Interferon-gamma Inducible Protein 10 Polymorphism with Treatment Response to Pegylated Interferon in HBeAg-Positive Chronic Hepatitis B
4. Oral Presentation ในงาน Graduate Research competition 2015 ระหว่างวันที่ 1-2 และ 7-8 เมษายน 2015 ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรื่อง : Single nucleotide polymorphism of HLA-DPA1 is associated with treatment response to pegylated interferon in Thai patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B
5. ตีพิมพ์ผลงานวิจัย เรื่อง : Single Nucleotide Polymorphism of Interferon Lambda-4 Gene is not Associated with Treatment Response to Pegylated Interferon in Thai Patients with Chronic Hepatitis B ในวารสาร Asian Pacific Journal of Cancer Prevention