

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และยีน *DHCR7*
กับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง



นางสาวรัตนพร เกียรติบำรุง

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

THE ASSOCIATION OF GENETIC VARIATIONS IN *PNPLA3*, *COX-2* AND *DHCR7* GENES
WITH SEVERITY OF LIVER FIBROSIS IN THAI PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Miss Rattanaorn Kiatbumrung



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	ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ยีน <i>PNPLA3</i> ยีน <i>COX-2</i> และยีน <i>DHCR7</i> กับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรัง
โดย	นางสาวรัตนพร เกียรติบำรุง
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัญญาชัย พยุงภร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์โสภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หารราชเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัญญาชัย พยุงภร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมบัติ ตริประเสริฐสุข)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนันท์ ปัญจวรรณ ต.เทียนประเสริฐ)

รัตนพร เกียรติบำรุง : ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และยีน *DHCR7* กับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (THE ASSOCIATION OF GENETIC VARIATIONS IN *PNPLA3*, *COX-2* AND *DHCR7* GENES WITH SEVERITY OF LIVER FIBROSIS IN THAI PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.สัจชัย พยุงบวร, 128 หน้า.

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดพังผืดในตับและตับแข็งซึ่งทำให้เกิดโรคมะเร็งตับ ปัจจุบันเชื่อว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (single nucleotide polymorphisms, SNPs) ของยีนต่างๆมีผลต่อการดำเนินของโรคตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง การศึกษามีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ SNPs *PNPLA3* (rs738409), *COX-2* (rs689465) และ *DHCR7* (rs12785878) กับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในประชากรไทย กลุ่มตัวอย่างประกอบด้วยผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง 250 คน ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับเอชไอวี 200 คน ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง 74 คน และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี 200 คน การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนดังกล่าวทำโดยวิธี allelic discrimination โดยใช้เครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์และ *TaqMan* probes และตรวจระดับพังผืดที่ตับโดยใช้เครื่อง transient elastography ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบความถี่จีโนไทป์ CC, CG และ GG ของยีน *PNPLA3* ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็น 53.2%, 39.2% และ 6.5% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่สามารถหายได้เองพบ 36.1%, 45.8% และ 18.1% ตามลำดับซึ่งมีความถี่ของจีโนไทป์ GG สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (odds ratio (OR)=2.62, 95% confidence interval (CI)=1.27-5.4, $P=0.0094$) นอกจากนี้ยังพบว่าความถี่จีโนไทป์ CC ของยีน *COX-2* ในกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับเอชไอวี ($P<0.0001$) ความถี่จีโนไทป์ TT, TG และ GG ของยีน *DHCR7* ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็น 5.6%, 38.5% และ 55.9% ขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับเอชไอวีพบ 3.5%, 39.2% และ 57.3% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมพบ 12.1%, 41.9% และ 46.0% ตามลำดับ นอกจากนี้จีโนไทป์ GG ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับเอชไอวีสูงกว่ากลุ่มควบคุม (OR=2.62, 95% CI=1.27-5.4, $P=0.0094$ และ OR=4.29, 95% CI=1.77-10.42 $P=0.0013$ ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าความถี่จีโนไทป์ของ SNP rs12785878 มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ ($P=0.016$) จากการศึกษาสรุปได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *DHCR7* rs12785878 มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมเพื่อทำนายการเกิดพังผืดในตับในประชากรไทยได้

ภาควิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5674065030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) / 7-DEHYDROCHOLESTEROL REDUCTASE (DHCR7) / HEPATITIS C VIRUS (HCV) / LIVER FIBROSIS / PATATIN-LIKE PHOSPHOLIPASE DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 3 (PNPLA3) / SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS)

RATTANAPORN KIATBUMRUNG: THE ASSOCIATION OF GENETIC VARIATIONS IN *PNPLA3*, *COX-2* AND *DHCR7* GENES WITH SEVERITY OF LIVER FIBROSIS IN THAI PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C. ADVISOR: PROF. PISIT TANGKIJVANICH, M.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. SUNCHAI PAYUNGPORN, Ph.D., 128 pp.

Hepatitis C virus (HCV) is a common cause of liver fibrosis and cirrhosis that can develop to Hepatocellular carcinoma (HCC). There is increasing evidence that host genetic variations may influence the natural history of chronic HCV infection. The aim of this study was to determine the correlation between single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *PNPLA3* (rs738409), *COX-2* (rs689465) and *DHCR7* (rs12785878) and severity of liver fibrosis in Thai populations. 250 patients with HCV, 200 patients with HCV/HIV, 74 patients with HCV spontaneous clearance and 200 healthy controls were enrolled. The SNPs were detected by allelic discrimination using real-time PCR with *TaqMan* probes. Liver fibrosis was assessed by transient elastography. The frequency of CC, CG and GG genotypes of rs738409 in the HCV group was 53.2%, 39.2% and 6.5%, respectively. In the HCV clearance group, the corresponding genotypes were 36.1%, 45.8% and 18.1%. The frequency of GG was significantly higher in the HCV clearance than the HCV group (odds ratio (OR)=2.62, 95% confidence interval (CI)=1.27-5.4, $P=0.0094$). The distribution of CC genotype of rs689465 was significantly higher in the control group than patients with HCV and HCV/HIV ($P<0.0001$). In addition, the frequency of TT, TG and GG genotypes of rs12785878 in the HCV group were 5.6%, 38.5% and 55.9%, respectively. The corresponding genotypes in the HCV/HIV group were 3.5%, 39.2% and 57.3%, respectively. In the control group, the corresponding genotypes were 12.1%, 41.9% and 46.0%, respectively. The frequency of GG genotype was significantly higher in the HCV and HCV/HIV groups than the control group (in HCV; OR=2.62, 95% (CI)=1.27-5.4, $P=0.0094$, in HCV/HIV; OR=4.29, 95% CI=1.77-10.42 $P=0.0013$). Moreover, we found the genotype frequency of rs12785878 was correlated with advanced fibrosis in patients with HCV ($P=0.016$). In conclusion, *DHCR7* rs12785878 polymorphism was significantly associated with the severity of liver fibrosis in HCV and might be used as a biomarker for predicting liver fibrosis in Thai population.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ไม่อาจสำเร็จสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากปราศจากบุคคลที่มีพระคุณต่อ การศึกษาและการทำวิจัยในระดับปริญญาโทของข้าพเจ้า คือ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักของข้าพเจ้า ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นต้นแบบ ที่ดีในการดำเนินงานวิจัย ให้ความช่วยเหลือด้านองค์ความรู้และหัวข้องานวิจัย สนับสนุนและให้ โอกาสในการทำงานวิจัยได้อย่างเต็มที่ อีกท่านคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สัณชัย พยุภรณ์ อาจารย์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่มอบความรู้แนะนำเทคนิค ขั้นตอนในการทำงานวิจัย อีกทั้งยังช่วย แก้ไขข้อบกพร่อง และแก้ปัญหาในการทำวิจัย สอนให้รู้จักวิเคราะห์และหาทางออก ทำให้งานนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณอาจารย์ทั้ง 2 ท่านอย่างยิ่งค่ะ

ขอขอบคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ซึ่งได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิ ศักดิ์ ทรราชเวก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สมบัติ ตรี ประเสริฐสุข กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐนันท์ (ปัญจวรรณ) ต. เทียนประเสริฐ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่สละเวลามาเป็น กรรมการคุมสอบ และแนะนำตักเตือน ชัดกลางงานวิจัยนี้ให้ออกมาได้เป็นอย่างดี ขอขอบคุณค่ะ

ขอขอบคุณกลุ่มประชากรที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ทุกท่านที่อุทิศตนเป็นส่วนหนึ่งของ งานวิจัยนี้ เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ๆ แก่สังคมต่อไป ขอขอบคุณศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย สำหรับตัวอย่างเลือดกลุ่มควบคุมสุขภาพดี ขอขอบคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย ขอขอบคุณ Research Unit of Hepatitis and Liver Cancer สำหรับเงินอุดหนุนงานวิจัย และขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 724 และ 725 ทุก ท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาตลอดงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ จากคณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ขอขอบคุณ มากค่ะ

สุดท้ายขอขอบคุณบิดามารดา ที่มอบโอกาส คอยสนับสนุน ดูแลและเป็นกำลังใจ อันสำคัญตลอดระยะเวลาของการศึกษาและการทำวิจัยของข้าพเจ้า ข้าพเจ้าขอส่งต่อความสำเร็จ และความภาคภูมิใจของงานชิ้นนี้แก่ทุกท่านที่มีส่วนร่วมตลอดงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณค่ะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฏ
สารบัญแผนภาพ.....	ณ
คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์.....	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale).....	1
คำถามงานวิจัย (Research question).....	4
วัตถุประสงค์ (Objectives).....	4
สมมติฐาน (Hypothesis).....	4
กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework).....	5
ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation).....	6
การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย (Operational definition).....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Benefits of study).....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C Virus; HCV).....	9
การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีกับการเกิดพังผืดในตับ.....	10
Patatin-like phospholipase domain containing protein 3 (PNPLA3).....	12
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน PNPLA3 กับการเกิดพังผืดในตับ.....	13

Cyclooxygenase-2 (COX-2)	15
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ COX-2 promoter กับการเกิดพังผืดในตับ	17
7-Dehydrocholesterol reductase (DHCR7)	19
ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ DHCR7 กับการเกิดพังผืดในตับ	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
รูปแบบการวิจัย (Research design)	23
ประชากรที่ศึกษา.....	23
ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size).....	25
การเก็บสิ่งตัวอย่าง (Collecting sample)	26
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	27
1. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	27
3. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction).....	28
4. สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR.....	29
5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ agarose gel electrophoresis	29
6. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)	29
7. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector.....	29
8. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค transformation.....	30
9. สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction)	30
10. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR.....	30
11. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทาง bioinformatics	31
12. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	31

วิธีดำเนินการวิจัย	31
1. การสกัด DNA (DNA Extraction).....	31
2. การทำตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive control)	32
2.1 ยีน PNPLA3 ตำแหน่ง rs738409 และยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465.....	32
2.2 ยีน DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878	34
3. การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction).....	35
4. การเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector (Ligation).....	36
5. การเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค transformation (Heat shock).....	36
6. การสกัดพลาสมิด (Plasmid Extraction).....	37
7. การทำ PCR พลาสมิดที่สกัดได้ (Colony PCR).....	38
8. การวิเคราะห์ nucleotide sequencing	39
9. การเจือจางความเข้มข้นของพลาสมิด.....	39
10. การหา genotype ของยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409 ยีน <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465 และยีน <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878 ด้วยวิธี allelic discrimination assay โดยใช้ <i>TaqMan Probe Real-time PCR</i>	40
11. การเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วย.....	41
12. การรวบรวมข้อมูล (Data collection).....	41
13. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)	41
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	42
1. การสร้างตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของยีน <i>PNPLA3</i> (rs738409).....	42
2. การสร้างตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของยีน <i>COX-2</i> (rs689465)	46
3. การสร้างตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของยีน <i>DHCR7</i> (rs12785878).....	50
4. ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้นของพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวแปรควบคุมเชิงบวก (positive control) ในหน่วย copies/ μ l.....	55

5. การหา genotype ของยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409 ยีน <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465 และยีน <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย	56
6. ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ศึกษา	60
7. การกระจายตัวของ genotype ใน Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)	63
8. ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNPs ต่างๆ ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม	64
8.1 <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409	64
8.2 <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465	66
8.3 <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878	68
9. ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNPs ต่างๆ กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ	70
9.1 <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409	70
9.2 <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465	72
9.3 <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878	74
9.4 ระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ จำแนกตาม HCV genotype	76
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	79
ยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409	79
ยีน <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465	83
ยีน <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878	86
รายการอ้างอิง	92
ภาคผนวก การเตรียมสารเคมี	100
ดัชนี	103
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	128

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	การแบ่งระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับสำหรับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี....	7
ตารางที่ 2	สารที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409 และยีน <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465	33
ตารางที่ 3	สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ของยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409	33
ตารางที่ 4	สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ของยีน <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465.....	33
ตารางที่ 5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409 และยีน <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465.....	34
ตารางที่ 6	สารที่ใช้ทำ allelic discrimination assay ของยีน <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878....	34
ตารางที่ 7	สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ allelic discrimination assay ของยีน <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878.....	35
ตารางที่ 8	สารที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector.....	36
ตารางที่ 9	สารที่ใช้ในการทำ colony PCR.....	38
ตารางที่ 10	สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ colony PCR.....	38
ตารางที่ 11	สารที่ใช้ในการทำ Allelic discrimination assay สำหรับยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409 ยีน <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465 และยีน <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878.....	40
ตารางที่ 12	สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ Allelic discrimination assay สำหรับยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409 และยีน <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465	40
ตารางที่ 13	สถานะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ Allelic discrimination assay สำหรับยีน <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878.....	40
ตารางที่ 14	ความเข้มข้นของพลาสมิดสำหรับ positive control.....	55
ตารางที่ 15	ตัวอย่างการบันทึกผลการทดลองจากประชากรกลุ่มเป้าหมาย	59
ตารางที่ 16	ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากรที่ศึกษาในงานวิจัย.....	61

ตารางที่ 17 การกระจายตัวของจีโนไทป์ของแต่ละ SNPs บนยีน *PNPLA3*, *COX-2* และ *DHCR7* ในประชากรที่ศึกษาโดยใช้หลักการของ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) 63

ตารางที่ 18 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม 65

ตารางที่ 19 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม 67

ตารางที่ 20 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม 69

ตารางที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* (rs738409) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ... 70

ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* (rs738409) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ร่วมกับไวรัสเอชไอวี 71

ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *COX-2* (rs689465) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ... 72

ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *COX-2* (rs689465) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ร่วมกับไวรัสเอชไอวี 73

ตารางที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *DHCR7* (rs12785878) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง 74

ตารางที่ 26	ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>DHCR7</i> (rs12785878) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี	75
ตารางที่ 27	ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง.....	77
ตารางที่ 28	ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี	78
ตารางที่ 29	ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409 กับความเสี่ยงของการเกิดโรค	82
ตารางที่ 30	ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>COX-2</i> ตำแหน่ง rs689465 กับความเสี่ยงของการเกิดโรค	85
ตารางที่ 31	ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>DHCR7</i> ตำแหน่ง rs12785878 กับความเสี่ยงของการเกิดโรค.....	89
ตารางที่ 32	ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีและความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	90

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1	การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับในสภาวะต่างๆ	8
รูปที่ 2	ระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	8
รูปที่ 3	โครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบีและโปรตีนที่สร้างจากจีโนมไวรัสตับอักเสบบี	9
รูปที่ 4	อัตราการแพร่ระบาดของ การติดเชื้อ HCV ในประเทศไทย	10
รูปที่ 5	การเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วย CHC	11
รูปที่ 6	เปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดตับแข็งในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี	12
รูปที่ 7	โครงสร้างสามมิติของโปรตีน <i>PNPLA3</i> (I148M)	13
รูปที่ 8	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>PNPLA3</i> ต่อการเกิดพังผืดในตับและมะเร็งตับ	14
รูปที่ 9	การทำงานและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเอนไซม์ COX	16
รูปที่ 10	การกระตุ้นการแสดงออกของ COX-2 เมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บ	18
รูปที่ 11	ขั้นตอนการสังเคราะห์และการทำงานของวิตามินดี	20
รูปที่ 12	การทำงานของ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ในการควบคุมการทำงานภายในเซลล์	21
รูปที่ 13	ผลการทำ PCR ของยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409 จากเซลล์ HeLa.....	42
รูปที่ 14	ผลการทำ colony PCR ของยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409	43
รูปที่ 15	ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409	44
รูปที่ 16	Allelic discrimination plot ของ Positive control สำหรับการหาจีโนไทป์ ของยีน <i>PNPLA3</i> ตำแหน่ง rs738409.....	45
รูปที่ 17	ผลการทำ PCR ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 จากเซลล์ A549, HeLa และ HepG2	46
รูปที่ 18	ผลการทำ colony PCR ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465.....	47
รูปที่ 19	ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 ...	48

รูปที่ 20 Allelic discrimination plot ของ positive control สำหรับการหาจีโนไทป์ ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465	49
รูปที่ 21 Allelic discrimination plot ของ DNA extraction ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465	50
รูปที่ 22 ผลการทำ real-time PCR ของยีน DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878.....	51
รูปที่ 23 ผลการทำ colony PCR ของยีน DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878.....	52
รูปที่ 24 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878.....	53
รูปที่ 25 Allelic discrimination plot ของ positive control สำหรับการหาจีโนไทป์ ของยีน DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878.....	54
รูปที่ 26 Allelic discrimination plot ของยีน PNPLA3 ตำแหน่ง rs738409 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย	56
รูปที่ 27 Allelic discrimination plot ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย	57
รูปที่ 28 Allelic discrimination plot ของยีน DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย	58
รูปที่ 29 จำนวนผู้ป่วย HCV และ HCV/HIV แบ่งตามระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ	62

สารบัญแผนภาพ

หน้า

แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดงานวิจัย	5
--	---



คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
95% CI	95% Confidence interval
μ l	Microliter
COX-2	Cyclooxygenase-2
bp	Base pair
DHCR7	7-Dehydrocholesterol reductase
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C virus
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
kDa	kilodalton
kPa	kilopascal
ml	Milliliter
mM	Millimolar
OR	Odds ratio
PCR	Polymerase chain reaction
PNPLA3	Patatin-Like Phospholipase Domain containing Protein 3
<i>P</i> -value	Probability value
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Round per minute
SNPs	Single nucleotide polymorphisms

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

กลไกการเกิดพังผืดในตับ (Liver fibrosis) เป็นกระบวนการตอบสนองเพื่อซ่อมแซมตัวเองของเซลล์ตับ เมื่อเซลล์ตับได้รับความเสียหายจากการติดเชื้อ หรือถูกทำลายด้วยสารเคมีต่างๆ ซึ่งผู้ป่วยที่มีพังผืดในตับจะมีโอกาสที่จะพัฒนากลายเป็นโรคอื่นๆ ได้ เช่น โรคตับแข็ง (Cirrhosis) หรือมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) [1] การประเมินการเกิดพังผืดในตับสามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่ถือเป็นมาตรฐานได้แก่ การเจาะตับและนำเนื้อตับมาตรวจทางพยาธิวิทยา (Liver biopsy) มีข้อจำกัดคือ การตรวจนี้ที่อาจเกิดอันตรายต่อผู้ได้รับการตรวจ (Invasive) เช่น เจ็บบริเวณแผลที่เจาะตับ เลือดออกที่ตับ ตกเลือดในช่องท้อง หรืออาจถึงชีวิตได้ อีกทั้งการแปลผลขึ้นเนื้อต้องอาศัยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ อาจเกิดความคลาดเคลื่อนของผลการประเมินได้ [2] ในปัจจุบันมีวิธีการตรวจแบบใหม่เรียกว่า การตรวจวัดความยืดหยุ่นของตับ (Hepatic elastography หรือ Fibroscan) โดยใช้หลักการสะท้อนกลับของคลื่นที่ส่งเข้าไปยังตับ มีข้อดีคือ ไม่สร้างบาดแผลให้กับผู้ป่วย สะดวก รวดเร็ว และให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำมากกว่าการตรวจแบบเดิม วิธีการตรวจวัดการเกิดพังผืดในตับจึงเป็นวิธีการวินิจฉัยเบื้องต้นถึงอาการของโรคตับ ความรุนแรงของการเกิดพังผืด หรือใช้ติดตามอาการของผู้ป่วยได้ดี [3] การเกิดพังผืดในตับนี้พบมากในผู้ป่วยประเทศกลุ่มอุตสาหกรรม โดยมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เบาหวาน การบริโภคแอลกอฮอล์ และภาวะตับคั่งไขมัน (Nonalcoholic steatohepatitis หรือ NASH) [1] จากปัจจัยดังกล่าวข้างต้น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเป็นปัจจัยที่ได้รับความสนใจ เพราะเมื่อร่างกายได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ร่างกายจะตอบสนองโดยหลั่งไซโตไคน์ (Cytokine) เพื่อต้านสิ่งแปลกปลอม และมีการสร้างสาร reactive oxygen species (ROS) เกิดเป็น lipid peroxidation มาทำให้เซลล์ตับถูกทำลาย และเกิดพังผืดขึ้นได้ [4]

กลไกการเกิดพังผืดในตับมีเอ็นที่เกี่ยวข้องที่น่าสนใจคือ patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (*PNPLA3*) เป็นเอ็นที่พบมากที่เซลล์ตับ ทำงานในกระบวนการสะสมและสลายไขมันที่ตับ กระบวนการเกิดการอักเสบในเซลล์ตับ (Inflammation) และเกิดพังผืดขึ้นที่ตับอย่างต่อเนื่อง [5] จากการศึกษาของ Trépo, E. และคณะในปี 2011 พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single nucleotide polymorphism หรือ SNP) ของเอ็น *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 จีโนมไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังของประเทศเยอรมัน เบลเยียม และฝรั่งเศสอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่สุขภาพดี [6]

นอกจากนี้ยังมีเอ็น *COX-2* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และเป็นผลทำให้เกิดพังผืดในตับได้อีก โดยบริเวณโปรโมเตอร์ของเอ็น *COX-2* เป็นบริเวณสำคัญของนิวคลีโอไทด์ในกระบวนการถอดรหัสได้เป็นเอ็น Cyclooxygenase-2 (*COX-2*) โดย *COX-2* เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเปลี่ยน arachidonic acid เป็น prostaglandins ซึ่งมีบทบาทหลักในกระบวนการควบคุมการอักเสบของเซลล์ และควบคุมการเกิดโปรแกรมการตาย (Apoptosis) ในเซลล์ [7] ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังพบว่าจะมีระดับการแสดงออกของ *COX-2* มาก เกี่ยวกับการอักเสบของเซลล์และทำให้เกิดพังผืดขึ้นในตับ และมะเร็งตับได้ [8] จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Miyashita M. และคณะ พบว่ามีตำแหน่งของ SNP บริเวณโปรโมเตอร์ของเอ็น *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 จีโนมไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังของประเทศญี่ปุ่นอย่างมีนัยสำคัญ [9]

อีกปัจจัยที่สำคัญต่อการพัฒนาการเกิดพังผืดในตับ คือ วิตามินดี (Vitamin D) ซึ่งเป็นสารอาหารสำคัญต่อร่างกาย ช่วยควบคุมสมดุลของแคลเซียม (Calcium homeostasis) และการสร้างกระดูกในร่างกาย อีกทั้งยังพบว่าวิตามินดีมีหน้าที่ในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคกระดูกพรุน โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง โรคหัวใจและความดัน และโรคมะเร็ง [10] การทำงานของวิตามินดีจะถูกควบคุมด้วยหลายปัจจัย เช่น แสงแดด อาหาร และปัจจัยทางพันธุกรรม มีงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ของระดับของวิตามินดี (25(OH)-vitamin D) ในซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่าการขาดวิตามินดี (Vitamin D deficiency) มีความสัมพันธ์กับการเกิดพังผืดในตับและการเกิดมะเร็งตับ [11, 12] จากการศึกษา genome-wide association studies หรือ GWAS พบว่าเอ็นที่ควบคุมการสังเคราะห์และขนส่งวิตามินดีมีความสัมพันธ์กับระดับวิตามินดีในซีรัม [13]

จากการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับระดับวิตามินดีในซีรัม พบว่ายีน *DHCR7* ซึ่งแปลรหัสได้ 7-dehydrocholesterol reductase มีความสัมพันธ์กับระดับของ 25(OH)D₃ ในซีรัม และความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [11] เป็นเอนไซม์ควบคุมปฏิกิริยาการสังเคราะห์วิตามินดี โดยเปลี่ยน 7-dehydrocholesterol ให้เป็นคลอเลสเทอรอล (Cholesterol) ซึ่งปกติ 7-dehydrocholesterol จะเปลี่ยนเป็น previtamin D₃ ด้วยแสงแดดและเปลี่ยนเป็น 25(OH)D₃ ที่ตับ จากนั้นถูกส่งไปที่ไตอยู่ในรูปพร้อมทำงาน (1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ หรือ 1 α ,25(OH)₂D₃) และนำเข้าสู่เซลล์เพื่อควบคุมการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์ [14] จากการศึกษาของ Patta S. และคณะ ปี 2012 พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับและระดับ 25(OH)D ในซีรัมของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังจีโนไทป์ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [13]

นอกจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังทำให้เกิดความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับเพิ่มมากขึ้น ยังพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีรวมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวีทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มมากกว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างเดียว และการติดเชื้อเอชไอวีทำให้การดำเนินโรคต่างๆ เช่น ตับแข็ง ตับวาย มะเร็งตับ เป็นไปอย่างรวดเร็ว และเสียชีวิตได้เร็วขึ้น [15] เนื่องจากจะทำให้เกิดพังผืดเร็วกว่า เมื่อเทียบกับผู้ที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างเดียว ทำให้เกิดตับแข็งเร็วกว่าร้อยละ 15-25 ภายใน 10-15 ปีหลังจากที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชไอวี และเกิดมะเร็งตับในอายุน้อยกว่า [16, 17]

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับของผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีรวมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี โดยใช้เทคนิค *TaqMan probe real-time PCR* ซึ่งความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจนำไปใช้เป็น biomarker เพื่อวินิจฉัยความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับของกลุ่มผู้ป่วยในประเทศไทย รวมทั้งอาจเป็นประโยชน์ในการรักษาโรคจากความผิดปกติของเซลล์ตับในกลุ่มประชากรไทยได้เป็นอย่างดี

คำถามงานวิจัย (Research question)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และยีน *DHCR7* ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับหรือไม่

- ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และยีน *DHCR7* มีความสัมพันธ์ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและหายได้เองหรือไม่

วัตถุประสงค์ (Objectives)

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และยีน *DHCR7* ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ

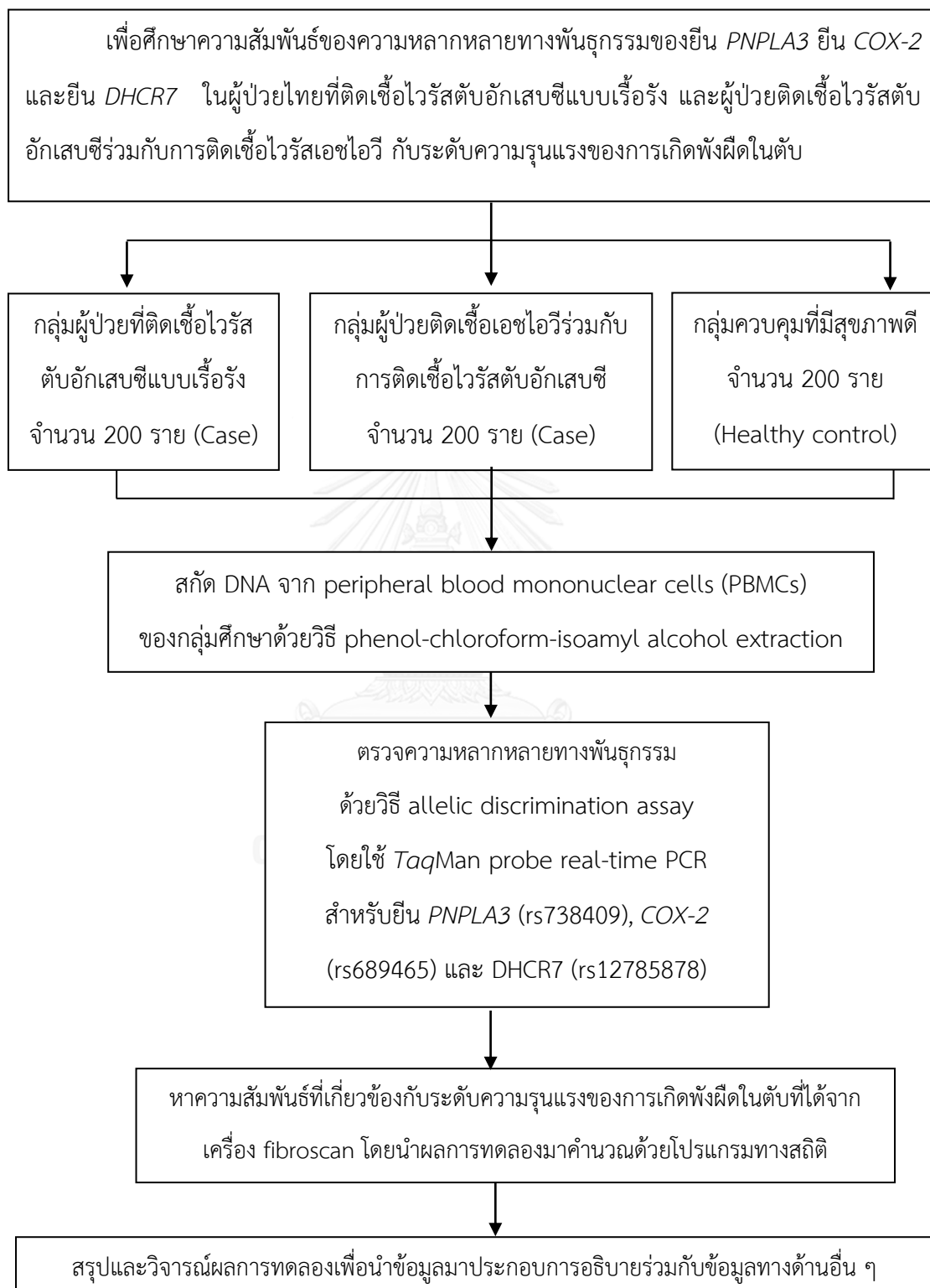
- ศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และยีน *DHCR7* ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและหายได้เอง

สมมติฐาน (Hypothesis)

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และยีน *DHCR7* ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ

- ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และยีน *DHCR7* มีความสัมพันธ์ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและหายได้เอง

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดงานวิจัย

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

1. ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซึ่งร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และศูนย์วิจัยโรคเอดส์ สภากาชาดไทย ผู้ป่วยส่วนมากเป็นเพศชายและมีอายุมาก จึงมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรกลุ่มควบคุม จึงยากต่อการทำให้อายุและเพศมีความใกล้เคียงกัน

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย (Operational definition)

1. Liver fibrosis คือ ผลจากการซ่อมแซมตัวเองของเซลล์ตับเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรืออาการบาดเจ็บ มีการสร้างคอลลาเจนและสะสมในเซลล์ ทำให้เกิดเป็นพังผืด
2. Fibroscan คือ วิธีการตรวจวัดพังผืดในตับโดยส่งคลื่นอัลตราซาวด์เข้าที่ตำแหน่งตับ และดูค่าการสะท้อนกลับของคลื่น เพื่อประเมินระดับการแข็งตัวของตับ มีหน่วยเป็นกิโลปาสคาล (kPa)

คำสำคัญ (Key words)

Cyclooxygenase-2 (COX-2)

7-Dehydrocholesterol reductase (DHCR7)

Hepatitis C virus (HCV)

Liver fibrosis

Patatin-Like Phospholipase Domain-Containing Protein 3 (PNPLA3)

Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Benefits of study)

ทำให้ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และยีน *DHCR7* ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซึ่งร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ที่มีผลต่อระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ ซึ่งอาจนำไปใช้เป็น biomarker เพื่อวินิจฉัยความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับของกลุ่มผู้ป่วยในประเทศไทย รวมทั้งอาจเป็นประโยชน์ในการรักษาโรคจากความผิดปกติของเซลล์ตับในกลุ่มประชากรไทยได้

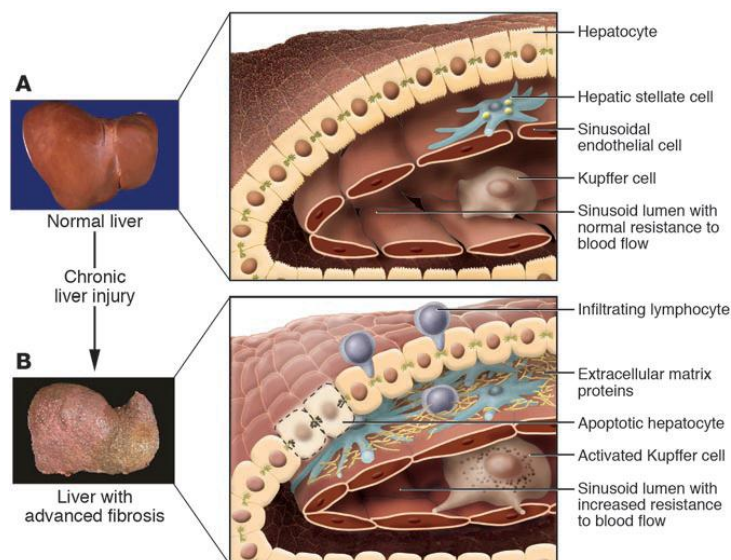
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พังผืดในตับ (Liver fibrosis) เป็นผลของกระบวนการตอบสนองต่อการบาดเจ็บของเซลล์ตับเรื้อรัง เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การสะสมของไขมันไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) และเกิดผลิตภัณฑ์ของ lipid peroxidation โดยตับจะมีการซ่อมแซมตัวเองโดยการสร้างสาร extracellular matrix, คอลลาเจนชนิด 1 และ 3 (Collagen, Fibrillar), ซัลเฟต โปรตีโอไกลแคน (Sulfate proteoglycan) และไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ขึ้นมาแทนที่เซลล์ที่ตายไป เป็นกลไกการตอบสนองต่อการอักเสบ เกิดการกระตุ้นการทำงานของ Kupffer cell ทำให้ช่องว่างภายในเซลล์ (Sinusoid lumen) ลดลง การไหลผ่านของเลือดทำได้ยากเกิดความดันขึ้นภายใน และสร้าง Platelet-derived growth factor (PDGF) ออกมากระตุ้น Hepatic stellate cells (HSCs) ให้ทำงานและเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น myofibroblast-like cells เชื่อมต่อกันเป็นร่างแหบริเวณกว้างเมื่อมีกระบวนการนี้เกิดขึ้นซ้ำๆ จะนำไปสู่การเกิดพังผืดในตับได้ (รูปที่ 1) [1] ผู้ป่วยมากกว่า 40% จะไม่แสดงอาการของการเป็นตับแข็ง และจะรุนแรงขึ้นตามระยะเวลาของการเกิดพังผืด หากมีภาวะแทรกซ้อนก็จะทำให้อาการของโรคดำเนินได้เร็วขึ้น และหากอาการของโรคดำเนินเป็นระยะเวลานาน และรุนแรงมากขึ้นจะนำไปสู่การเกิดตับแข็ง (Cirrhosis) และมะเร็งตับได้ (Hepatocellular carcinoma) (รูปที่ 2) พบว่า 70% ของกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นพังผืดในตับมากกว่า 5 ปี จะเสียชีวิตจากโรคตับ [18] โดยระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับสามารถแบ่งได้เป็น 5 ระดับคือ F₀-F₄ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแบ่งระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับสำหรับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี[19]

Liver Stiffness (kPa)	Fibrosis stage
<7.1	F ₀ -F ₁
≥7.1	F ₁ -F ₂
8.7	F ₂
9.5	F ₃
12.5	F ₃ -F ₄
≥14.5	F ₄

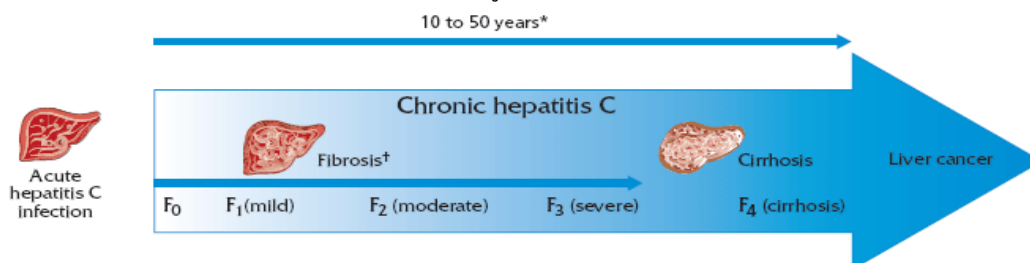


รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับในสภาวะต่างๆ

(A) เซลล์ตับในสภาวะปกติ

(B) เซลล์ตับที่ตอบสนองต่อการบาดเจ็บโดยการสร้าง extracellular matrix protein [1]

วิธีมาตรฐานของการตรวจเพื่อวินิจฉัยการเกิดพังผืดในตับคือ การเจาะตับและนำเนื้อตับมาตรวจทางพยาธิวิทยา (liver biopsy) ซึ่งมีข้อจำกัดคือ ต้องใช้แพทย์ผู้ชำนาญในการประเมินค่าการเกิดพังผืด เกิดความคลาดเคลื่อนจากบุคคล และตัวอย่างชิ้นเนื้อมากกว่า 20% และผู้ที่รับการตรวจต้องพักฟื้นร่างกายหลังการตรวจ ในปัจจุบันมีเทคนิคการตรวจวัดความยืดหยุ่นของตับ ด้วยเครื่อง Fibroscan อาศัยหลักการสะท้อนของคลื่นเสียง เครื่องจะส่งคลื่นอัลตราซาวด์ตรวจจับความเร็วของคลื่นที่ออกไปกระทบกับเนื้อตับและประเมินค่าความนิ่มหรือแข็งของตับออกมาในหน่วย กิโลปาสคาล (kPa) โดยให้หลักว่าถ้าตับเริ่มแข็งคลื่นเสียงที่สะท้อนกลับจะเดินทางได้เร็วค่าที่ได้จะสูง ข้อดีคือ ง่าย สะดวก รวดเร็ว ให้ผลค่อนข้างแม่นยำ และที่สำคัญผู้ป่วยไม่เจ็บตัวเหมือนการตรวจแบบดั้งเดิม [2, 3]

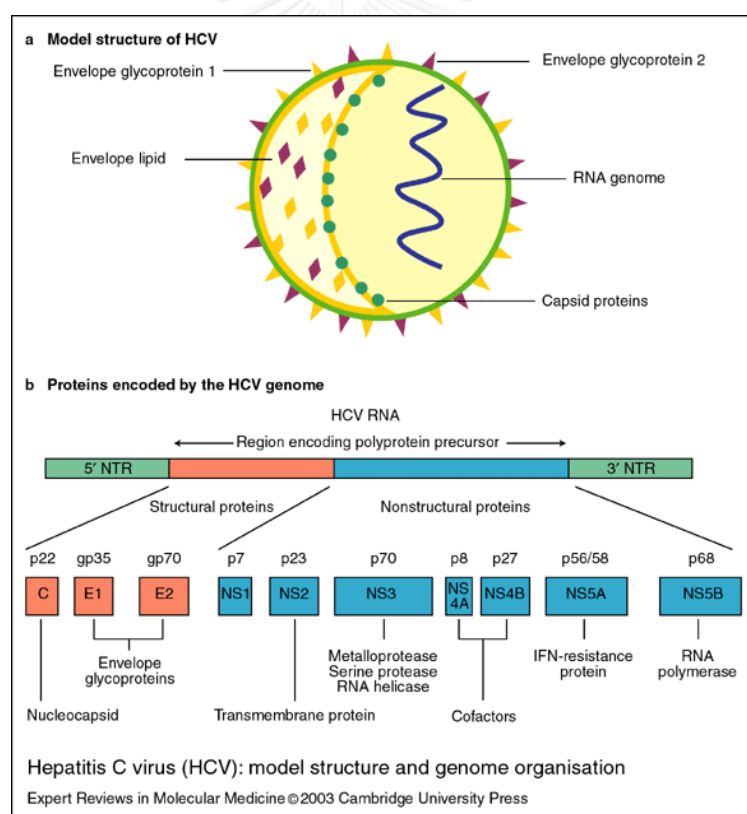


รูปที่ 2 ระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี [18]

* ระยะเวลาในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีส่งผลต่อระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับแตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละราย; [†] ระดับของการเกิดพังผืดในตับ

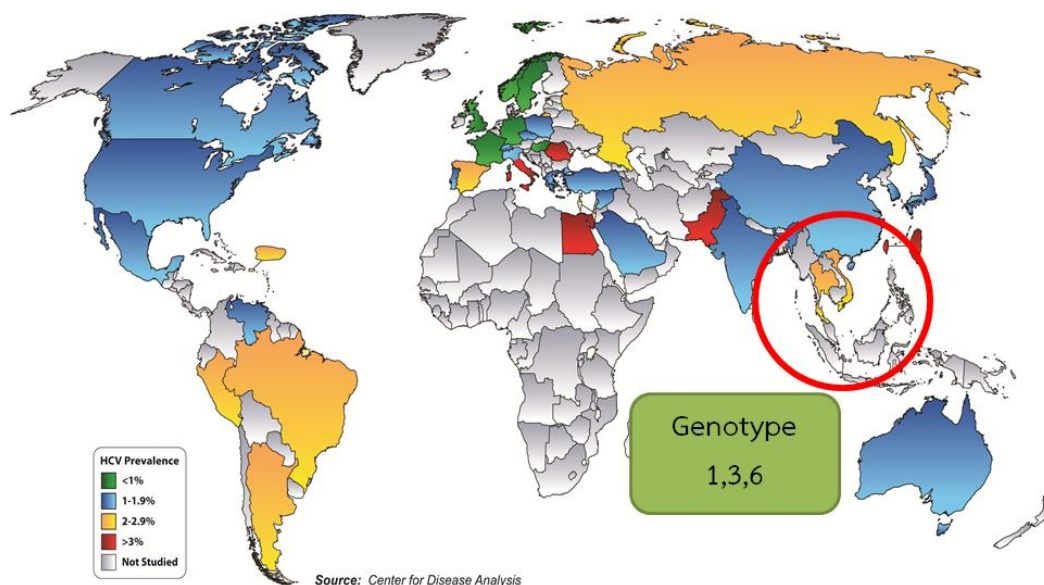
ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C Virus; HCV)

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญ โดยทั่วโลกมีอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีประมาณ 130-170 ล้านคน ซึ่งกว่า 80% ของผู้ป่วยจะเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (Chronic Hepatitis C หรือ CHC) [20] HCV เป็นไวรัสที่มีขนาดประมาณ 55-65 นาโนเมตร มีโครงสร้างแข็งห่อหุ้ม (envelop) และมีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเป็นสารพันธุกรรม ขนาดประมาณ 9.4 กิโลเบส สามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่แบ่งได้ 2 ส่วน คือ 1. โปรตีนโครงสร้าง (Structural protein) อยู่ทางด้านปลาย N-terminal และ 2. โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (Non-structural protein) อยู่ทางด้านปลาย C-terminal (รูปที่ 3) สาเหตุของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีส่วนมากมาจากการได้รับเลือดและผลิตภัณฑ์จากเลือด โดยในประเทศไทยมีอัตราการระบาดประมาณ 2-3% ของประชากร และส่วนมากเป็นจีโนไทป์ 1, 3 และ 6 (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 โครงสร้างของไวรัสตับอักเสบซีและโปรตีนที่สร้างจากจีโนมไวรัสตับอักเสบซี [21]

- a) โครงสร้างและองค์ประกอบของไวรัสตับอักเสบซี b) โปรตีนที่ถูกถอดรหัสจากสาย RNA ของ HCV genome แบ่งได้ 2 กลุ่มคือ structural protein และ non-structural protein

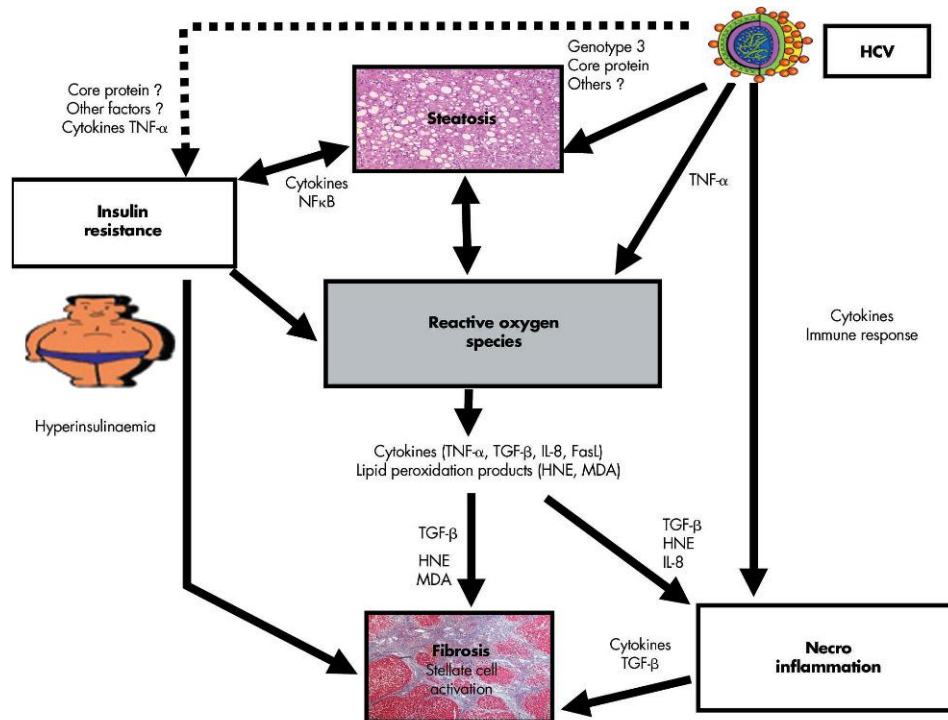


รูปที่ 4 อัตราการแพร่ระบาดของ การติดเชื้อ HCV ในประเทศไทย [21]

อัตราการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีประมาณ 2-3% ของกลุ่มประชากรไทย และชนิดของ HCV จีโนไทป์ที่พบจะเป็นชนิด 1, 3 และ 6 เป็นส่วนมาก

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีกับการเกิดพังผืดในตับ

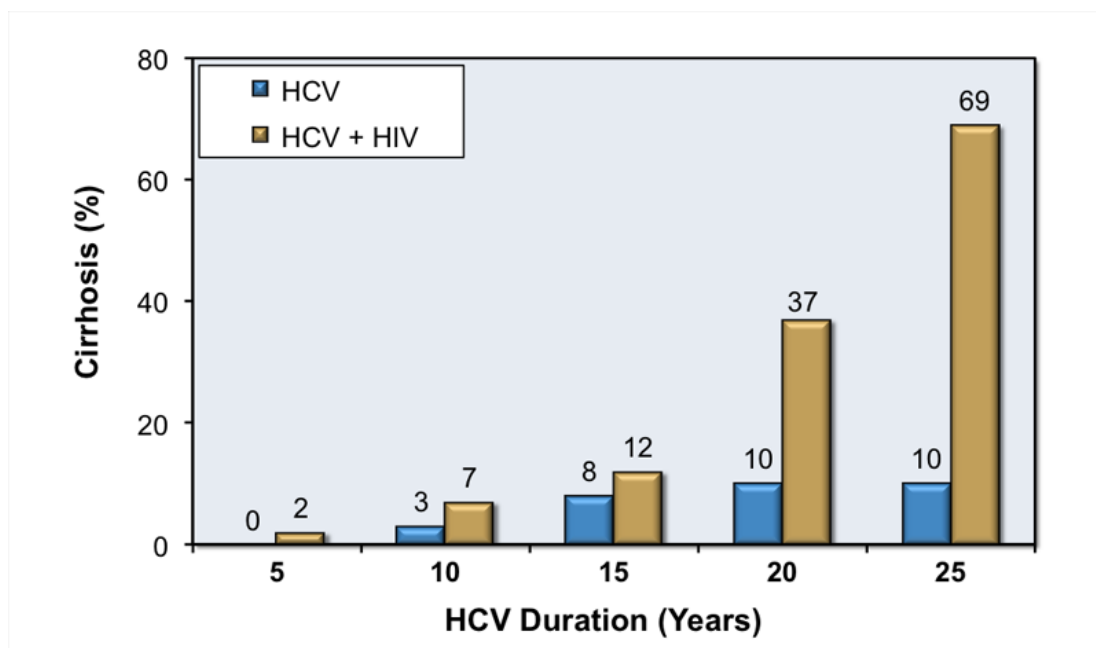
จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความสัมพันธ์ของการเกิดพังผืดในตับกับการติดเชื้อ HCV เป็นแบบส่งเสริมการดำเนินโรค โดยจะเกิดจากการสะสมของไขมันในตับซึ่งเกิดจากภาวะพร่องอินซูลิน หรือเป็นโรคตับคั่งไขมัน (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) เป็นหลัก และบางส่วนที่เกิดพังผืดอาจเกิดจากการแสดงออกของ core protein ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี [22, 23] เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยตรงให้มีการหลั่งไซโตไคน์ไปจับ receptor เกิด necro inflammatory และสร้าง reactive Oxygen species (ROS) หรือการส่งสัญญาณผ่าน tumour Necrosis Factor α (TNF- α) และ transforming Growth Factor β (TGF- β) สร้างผลิตภัณฑ์ของ lipid peroxidation กระตุ้น Kupffer cell และ HSCs ให้ซ่อมแซมตัวเองจากการตายของเซลล์โดยการสร้างคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้น และเกิดการเชื่อมต่อเส้นใย fibril กลายเป็นพังผืดในที่สุด (รูปที่ 5) [4, 24]



รูปที่ 5 การเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วย CHC [4]

โดยเมื่อร่างกายได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบซี จะส่งเสริมการแสดงออกของ core protein และบางส่วนของระบบภูมิคุ้มกัน ให้สร้าง ROS เพื่อกระตุ้นไซโตไคน์และสร้างผลิตภัณฑ์ของ lipid peroxidation กระตุ้น Kupffer cell และ HSCs ให้ทำงานเพิ่มขึ้นและเกิดพังผืดในตับ

นอกจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรังทำให้เกิดความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ และเกิดมะเร็งตับแล้ว ยังพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีร่วมกับเชื้อไวรัสเอชไอวีทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น จากการศึกษาของ Martino V. และคณะ ปี 2001 พบว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวีมีความรุนแรงของการเกิดโรคต่างๆ มากกว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีอย่างเดียว การดำเนินโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว และเสียชีวิตได้เร็วขึ้น (รูปที่ 7) [15] ต่อมาได้มีการศึกษาของ Macias J. และคณะปี 2013 [17] ในการติดตามความก้าวหน้าของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีร่วมกับไวรัสเอชไอวีที่ได้รับการตรวจด้วยวิธีเจาะชิ้นเนื้อ พบว่าผู้ป่วยส่วนมากมีความรุนแรงของการเกิดพังผืดสูงในระดับ F₃-F₄ เนื่องจากจะทำให้เกิดพังผืดเร็วกว่า เมื่อเทียบกับผู้ที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีอย่างเดียว ทำให้เกิดตับแข็งเร็วกว่าร้อยละ 15-25 ภายใน 10-15 ปีหลังจากที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี และเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยอายุน้อยกว่า [16, 25]



รูปที่ 6 เปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดตับแข็งในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี [15]

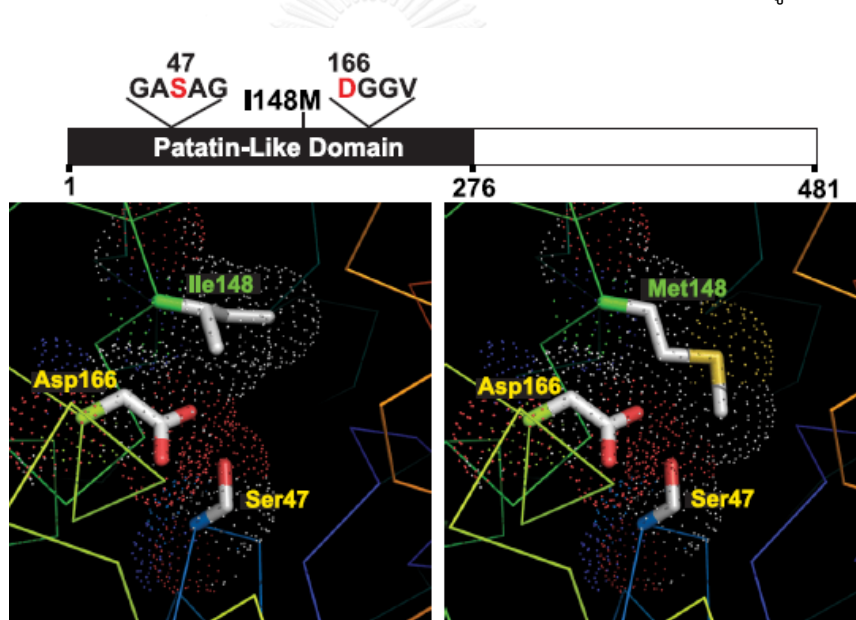
การเปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดตับแข็งกับระยะเวลาที่ได้รับเชื้อ HCV พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีการดำเนินโรคที่ช้ากว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี

Patatin-like phospholipase domain containing protein 3 (PNPLA3)

เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสะสมไขมันในตับ พบได้ทั้งเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น กระจกหู ผนัง กล้ามเนื้อ แต่พบมากที่สุดที่ตับ ยีนนี้ถอดรหัสได้โปรตีนที่ประกอบด้วย 481 อะมิโน [26] จากการศึกษาของ Dubuquoy C. และคณะปี 2013 เพื่อหาหน้าที่การทำงานของยีน *PNPLA3* จึงทำการทดลอง *in vivo* พบว่ายังไม่ทราบหน้าที่การทำงานที่ชัดเจน แต่ในการทดลอง *in vitro* พบว่าโปรตีนนี้มีหน้าที่คล้ายไลเปส (Lipase) สามารถย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ในตับได้ (Triglyceride hydrolase) ช่วยรักษาสสมดุลพลังงานให้คงที่ [5, 27] ทำให้มีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโรคต่างๆกับหน้าที่การทำงานของยีนนี้

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* กับการเกิดพังผืดในตับ

จากการศึกษาของ He S. และคณะปี 2010 ได้ทำการทำนายโครงสร้างสามมิติ ของการเกิด ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* (rs738409) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 22 ตำแหน่ง 43,928,847 มี major allele คือ C และ minor allele คือ G พบว่าที่ตำแหน่งดังกล่าว มีการ เปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Isoleucine เป็น Methionine ที่ codon ที่ 148 และกรดอะมิโน Methionine จะบังบริเวณ active site ของ Serine ใน codon ที่ 47 ทำให้ยีน *PNPLA3* ไม่สามารถเข้าจับกับ substrate ที่เป็นสารประกอบพวกไตรกลีเซอไรด์และไขมันได้อย่างเต็มที่ ทำให้ ความสามารถในการย่อยสลายไขมันลดลง เกิดการสะสมของไขมันในตับสูงมากขึ้น ความสามารถในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ลดลง ก่อให้เกิดพังผืดในตับ ตับแข็ง และมะเร็งตับได้ (รูปที่ 8) [28]

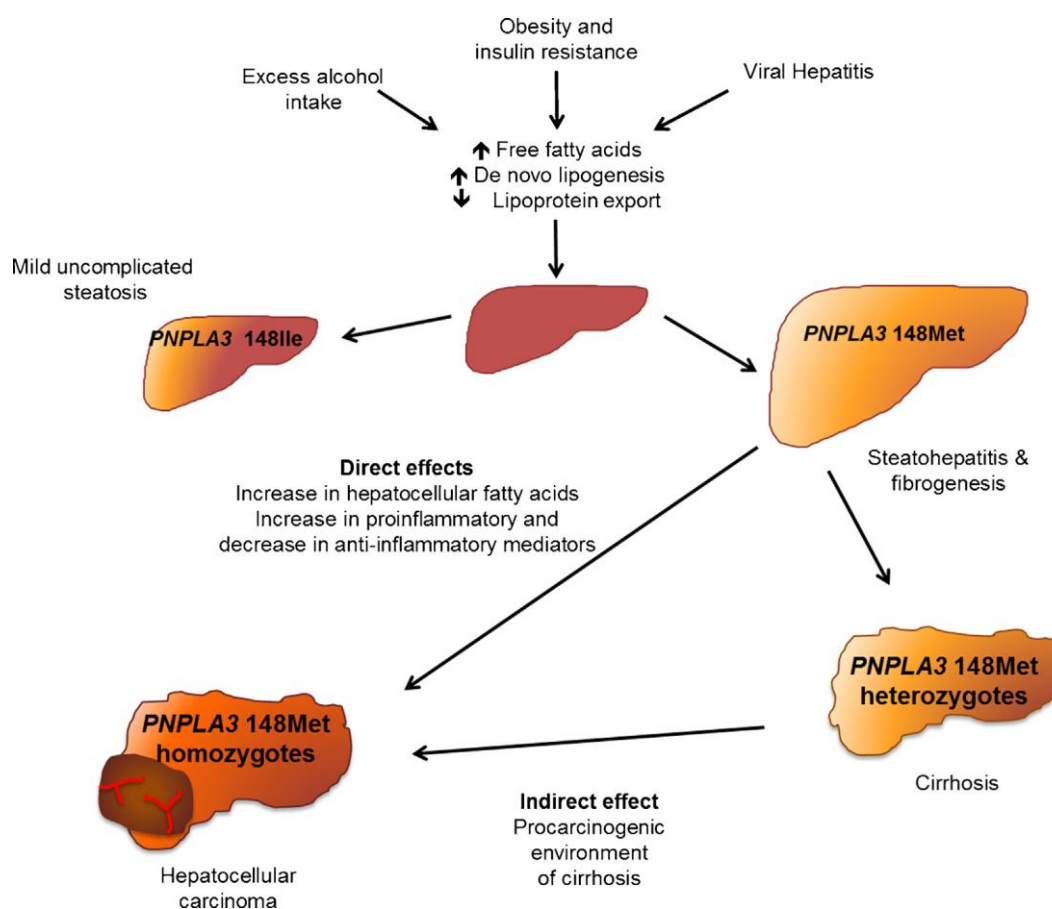


รูปที่ 7 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน *PNPLA3* (I148M) [28]

ด้านซ้ายแสดงบริเวณ active site ของยีน *PNPLA3* ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 148 เป็น Isoleucine ด้านขวาเป็นบริเวณ active site ของยีน *PNPLA3* ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 148 เป็น Methionine

ต่อมาในปี 2013 ได้มีรายงานของ Valenti L. และคณะ ในปี 2013 ที่ศึกษาเกี่ยวกับ ความสัมพันธ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* (rs738409) กับความเสี่ยงของการ เกิดมะเร็งตับ พบว่าปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ภาวะโรคอ้วน ภาวะพร่องอินซูลิน และการบริโภคแอลกอฮอล์มากเกินไปเป็นหลัก ซึ่งจะทำให้มีการสังเคราะห์กรดไขมัน เพิ่มขึ้น การสร้างลิพิดเพิ่มขึ้น แต่การขนส่งไลโปโปรตีนเพื่อกำจัดออกลดลง ส่งผลให้ตับเริ่มมีการ

สะสมของไขมันมากขึ้น ในผู้ป่วยที่มี SNP ยีน *PNPLA3* (I148M) จะเกิดกลไกที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับใน 2 ทาง ผลโดยตรง คือเพิ่มจำนวนของไขมันในเซลล์ตับมากขึ้น มีการเกิด proinflammatory มากขึ้น และลดการเกิด anti-inflammatory ลง ส่วนผลทางอ้อมคือ เกิดการสะสมของไขมันในตับ การเกิดพังผืด เกิดตับแข็ง ซึ่งท้ายสุดก็จะนำไปสู่โรคมะเร็งตับในที่สุด (รูปที่ 9) [29]



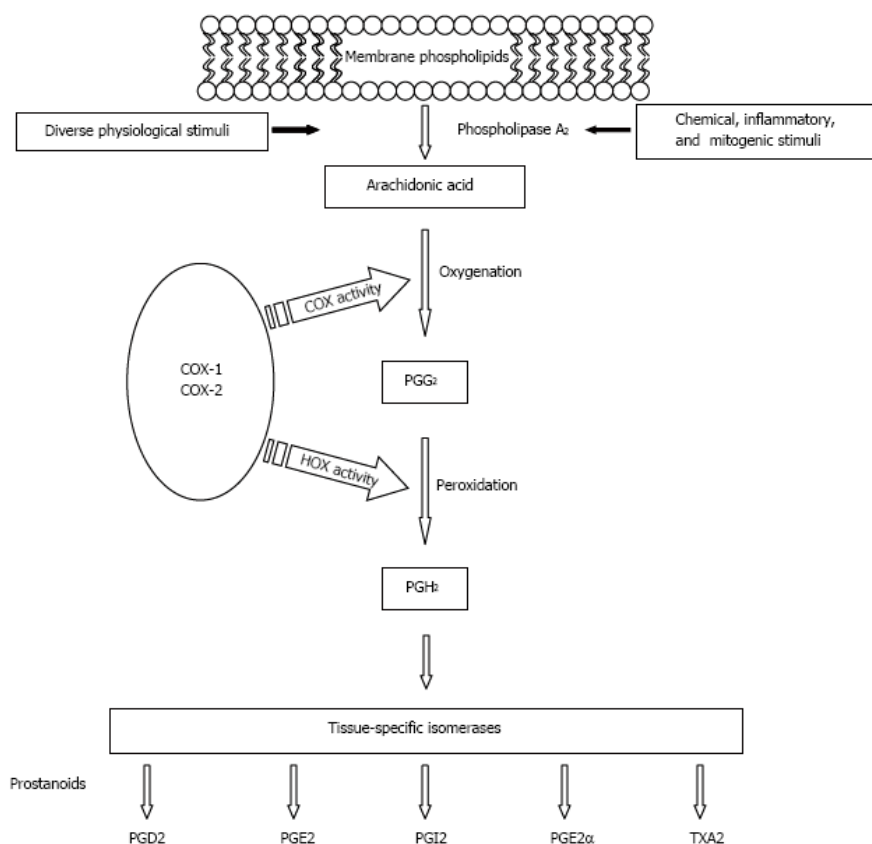
รูปที่ 8 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ต่อการเกิดพังผืดในตับและมะเร็งตับ [29]

การเกิด variation ของยีน *PNPLA3* (I148M) ส่งผลต่อการเกิดพังผืดในตับและมะเร็งตับใน 2 รูปแบบคือ ทางตรงได้แก่เกิดการสะสมไขมันในตับและเกิดการอักเสบของตับเกิดเป็น HCC และทางอ้อมคือการเกิดการสร้างพังผืด สะสมเป็นตับแข็ง แล้วเกิดการสะสมของสารก่อมะเร็งรวมจากการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้เกิดมะเร็งตับในที่สุด

เมื่อพิจารณาผลที่ได้จากผลการศึกษาของ Eric T. และคณะปี 2011 พบว่า SNP rs738409 ในผู้ป่วย 537 รายในประเทศเบลเยียม เยอรมัน และฝรั่งเศส จีโนไทป์ GG ซึ่งเป็น minor allele มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังอย่างมีนัยสำคัญ [6] ขัดแย้งกับรายงานของ Nakamura M. และคณะปี 2013 ซึ่งพบว่าผู้ป่วย 260 รายที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในประเทศญี่ปุ่นไม่มีความแตกต่างของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ที่ส่งผลต่อระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าความแตกต่างจากเชื้อชาติที่ศึกษามีผลต่อการความหลากหลายทางพันธุกรรมและเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [30] นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Mandorfer M. และคณะในปี 2015 ศึกษาผู้ป่วยผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีชาวออสเตรเลีย พบว่าจีโนไทป์ GG (rs738409) มีความสัมพันธ์กับการเกิดพังผืดในตับ รวมทั้งยังมีปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย เช่น ปริมาณของ CD4⁺ ระดับวิตามินดี (25(OH)D) ปริมาณแอลกอฮอล์ ระยะเวลาการติดเชื้อ และจีโนไทป์ของ HCV เป็นต้น [31]

Cyclooxygenase-2 (COX-2)

เอนไซม์ COX เป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 72 กิโลดาลตัน (kDa) โครงสร้างของเอนไซม์ COX ประกอบไปด้วย 3 โดเมนหลัก คือ 1) N-terminal domain ที่มีส่วนโครงสร้างคล้าย epidermal growth factor (EGF) 2) โดเมนที่เป็น amphipathic helix ไว้สำหรับจับกับสารอื่นที่ผิว membrane และ 3) C-terminal catalytic domain เป็นบริเวณที่มีการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase และ peroxidase [32] COX หรือ prostaglandin endoperoxide H synthases หรือ prostaglandin G/H synthases เป็นเอนไซม์ rate-limiting step ที่สำคัญในการเปลี่ยน arachidonic acid (AA) เป็น prostaglandin (PG) และ thromboxane (TX) ขั้นตอนในการสังเคราะห์เริ่มจาก AA ที่มาจาก membrane-bound phospholipid จะถูกเอนไซม์ phospholipase A₂ ย่อย จากนั้นเอนไซม์กลุ่ม COX จะเข้ามาทำให้กลายเป็น PGH₂ ซึ่ง PGH₂ สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นสารอื่นๆได้อีก เช่น PGD₂ PGE₂ PGF₂ และ PGI₂ โดยกลุ่ม PG นี้จะทำหน้าที่จำเพาะในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน (รูปที่ 9) ในมนุษย์สามารถแบ่งได้ 2 ชนิดคือ COX-1 และ COX-2 ซึ่งจะคล้ายกันที่โครงสร้างและกิจกรรม แต่จะแตกต่างกันที่การควบคุมและการแสดงออกของแต่ละเอนไซม์ [33]



รูปที่ 9 การทำงานและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเอนไซม์ COX [33]

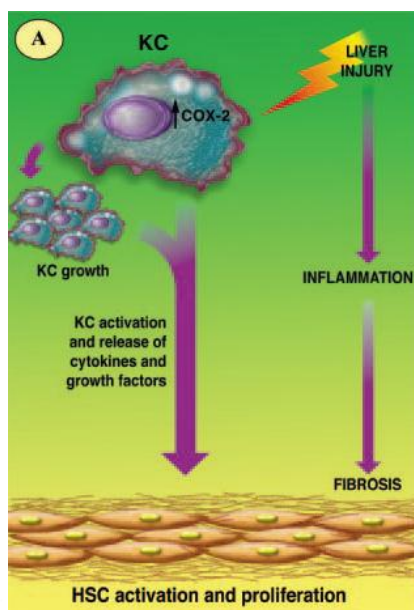
การทำงานของเอนไซม์ COX ทำหน้าที่สำคัญในการเปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น prostaglandin และ thromboxane ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในกลุ่ม PGD₂ PGE₂ PGI₂ และ TXA₂ และจะทำหน้าที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด

ยีน *COX-1* จะมีการแสดงออกคล้าย housekeeping gene คือมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องในเซลล์ทั่วไปอยู่แล้ว ส่วนยีน *COX-2* เป็นยีนที่ตอบสนองต่อความผิดปกติของเซลล์ โดยในเซลล์ปกติจะไม่พบการแสดงออกของ *COX-2* ซึ่ง *COX-2* จะถูกเหนี่ยวนำให้แสดงออกเมื่อมีการกระตุ้น เช่น bacterial lipopolysaccharide (LPS), cytokines และ growth factors ซึ่งจะไปกระตุ้นบริเวณ promoter และ transcription factor binding sites (C/EBP, AP-2, SP1, NF- κ B, CRE, Ets-1, PEA-3 and GATA-1) ทำให้ปริมาณการแสดงออกของ *COX-2* สูงขึ้น มักพบในกรณีที่เซลล์ต้องตอบสนองต่อการอักเสบ หรือความเครียด โดยทำหน้าที่เป็น proinflammatory เช่น การแสดงออกของ *COX-2* ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับ และสามารถใช้เป็น marker สำหรับการตรวจวัดเพื่อรักษาทางคลินิกได้ [32, 34]

การแสดงออกของ COX-2 มีพื้นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบหลายชนิด ได้แก่ Tumor Necrosis Factor- α หรือ TNF- α และ Interleukin-6 (IL-6) ซึ่งการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในบริเวณ 5' flanking region หรือบริเวณ upstream ของยีน COX-2 จะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน และเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคได้ [35] โดยบริเวณ 5' flanking region ของยีน COX-2 ในมนุษย์ประกอบไปด้วยบริเวณที่ควบคุมการถอดรหัสของยีน ได้แก่ TATA box และบริเวณ Transcription-factor binding site หลายบริเวณ เช่น cAMP-responsive element (CREB), Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), Nuclear Factor-IL-6 (NF-IL6), Glucocorticoid response element, Polyomavirus Enhancer Activator 3 (PEA3), Activator Protein-2 (AP-2), CAAT box, stimulatory protein-1 (Sp1) และ Transforming Growth Factor- β response element (TGF- β) ซึ่งบริเวณเหล่านี้จะทำงานร่วมกันในการควบคุมการแสดงออกของยีน COX-2 [36] จากการทดลองการตัดเบส (Deletion) และการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mutation) ในบริเวณดังกล่าวพบว่าส่งผลต่อการแสดงออกของยีน COX-2 การเกิดลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมเช่นนี้สามารถเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติและส่วนหนึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค ซึ่งกลไกที่เปลี่ยนแปลงในบริเวณ 5' flanking region นั้นยังไม่มีอธิบายที่ชัดเจน [37]

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ COX-2 promoter กับการเกิดพังผืดในตับ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เป็นสาเหตุหนึ่งของการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ COX-2 โดยเมื่อมีการติดเชื้อร่างกายจะมีกลไกต่อต้านสิ่งแปลกปลอม โดยหลังไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในหลายกลไก กระตุ้น NF- κ B ให้มีการทำงานการแสดงออกของ COX-2 ในเซลล์สูงขึ้น [38] และสร้าง ROS เข้าสู่กระบวนการกระตุ้นการเกิดพังผืด Kupffer cell และ hepatitis stellate cell ถูกกระตุ้น [39] เกิดกระบวนการ proliferation ยับยั้งการเกิด apoptosis และเกิดพังผืด (รูปที่ 10) ซึ่งในระหว่างที่ Kupffer cell ถูกกระตุ้นจะมีการสร้างสาร proinflammatory และ prostaglandin ที่เป็นตัวกลางในการส่งสัญญาณระหว่าง Kupffer cell กับเซลล์ตับ โดยจะทำให้เซลล์ตับมีการเพิ่มขึ้นของไตรกลีเซอไรด์และรวมกลุ่มกันเพิ่มขึ้น ทำให้การอักเสบเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง จนเกิดพังผืด ตับแข็ง และมะเร็งตับในที่สุด [8]



รูปที่ 10 การกระตุ้นการแสดงออกของ COX-2 เมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บ [39]

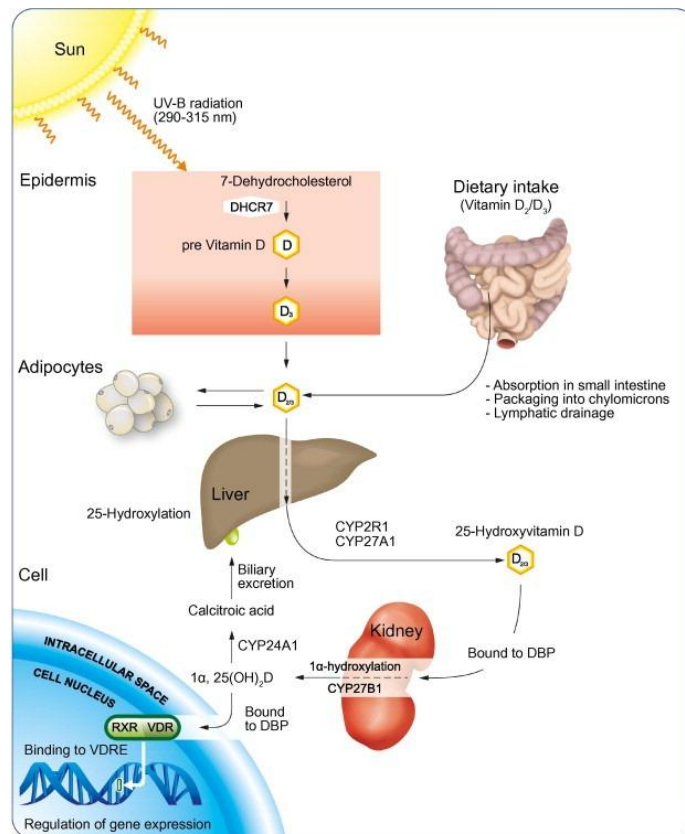
เมื่อเซลล์ตับได้รับการกระตุ้นให้เกิดการบาดเจ็บ ปริมาณการแสดงออกของ COX-2 จะเพิ่มสูงขึ้น กระตุ้นกระบวนการอักเสบและการเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่งผลให้ HSCs มีการทำงานเพิ่มสูงขึ้น กระตุ้นให้เกิดพังผืด

งานวิจัยหลายฉบับได้รายงานความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และการทำงานของ COX-2 พบว่า COX-2 จะมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งระดับของ COX-2 ที่เพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งได้ด้วยการใช้ interferon alpha [40] และมีการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ COX-2 ที่ส่งผลต่อการเกิดโรคมะเร็ง พบว่า SNP บริเวณ promoter ของยีน COX-2 เป็น SNP ที่มีความสำคัญกับการทำงานของเอนไซม์ COX-2 และมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งหลายชนิดอย่างมีนัยสำคัญ เช่น มะเร็งตับ มะเร็งหลอดอาหาร มะเร็งต่อมลูกหมาก เป็นต้น [34, 41, 42] นอกจากนี้ Miyashita M. และคณะ ในปี 2012 ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP บริเวณ COX-2 promoter (rs689465) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ตำแหน่ง 186,681,714 มี major allele คือ A และ minor allele เป็น G พบว่า จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังของประเทศญี่ปุ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [9] ต่อมาได้มีการศึกษาของ Bu และ Zhao ในปี 2013 ที่ศึกษาในประชากรเอเชียรายงานว่าจีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์ในอัตราเสี่ยงสัมพันธ์ของการเกิดมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [43]

7-Dehydrocholesterol reductase (DHCR7)

วิตามินดี (Vitamin D) เป็นสารอาหารสำคัญที่ช่วยควบคุมสมดุลของแคลเซียม (Calcium homeostasis) และการสร้างกระดูกในร่างกาย อีกทั้งยังพบว่าวิตามินดีมีหน้าที่ในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง (Cancer) โดยลดการเพิ่มจำนวน (Anti-proliferative) ลดการตาย (Anti-apoptotic) ลดการแบ่งตัว (Differentiating) ลดการสร้างหลอดเลือด (Anti-angiogenic) และลดการรุกรานของเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียง (Anti-invasive) [10, 44] นอกจากนี้วิตามินดียังมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) ด้านการเกิดการอักเสบของเซลล์ (Anti-inflammatory) และลดการเกิดพังผืด (Anti-fibrotic) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการลดความเสี่ยงของการเกิดโรคตับ [14] โดยกระบวนการสังเคราะห์วิตามินดีเพื่อใช้งานในร่างกายสามารถเกิดได้ 3 ขั้นตอนหลักๆ (รูปที่ 11) คือ

1. การสังเคราะห์วิตามินดีจะเกิดขึ้นหลักๆบริเวณผิวหนัง ผ่านการกระตุ้นด้วยแสงแดด (UVB) และมีเอ็นที่เกี่ยวข้อคือ *DHCR7* ซึ่งถอดรหัสได้ 7-dehydrocholesterol reductase เป็นเอนไซม์ rate-limiting step สามารถเปลี่ยน 7-dehydrocholesterol เป็น cholesterol ควบคุมการสังเคราะห์วิตามินดี ซึ่งโดยปกติ 7-dehydrocholesterol จะเปลี่ยนเป็น vitamin D₃ (Cholecalciferol) ด้วยการกระตุ้นด้วยความแสงแดด นอกจากนั้นแหล่งของวิตามินดีอื่นจะได้จากอาหาร เช่น ปลาทუნ่า แซลมอน และไข่ เป็นต้น ซึ่งจะมีทั้งวิตามิน D₂ (Ergocalciferol) และ D₃ และดูดซึมที่ลำไส้
2. จากนั้นวิตามินดีทั้งจากผิวหนังและอาหารจะถูกเก็บในเซลล์อะดิพไซต์ (Adipocyte) ในตัวในรูปแบบ 25-Hydroxylation โดยเอนไซม์ 25-Hydroxylases ซึ่งมี cytochrome P450 isoform (*CYP2R1*, *CYP27A1*) เป็นตัวกระตุ้นให้อยู่ในรูปที่ยังไม่พร้อมทำงาน (inactive) 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D₃) หรือ Calcitriol ซึ่งรูปแบบนี้จะคงอยู่ในร่างกายได้ 2-3 สัปดาห์
3. จากนั้นเมื่อร่างกายต้องการใช้งานวิตามินดี 25(OH)D₃ จะจับกับ vitamin D binding protein (DBP) และถูกส่งไปยังบริเวณ proximal tubule ที่ไตเพื่อเปลี่ยนรูปให้อยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน โดยการทำงานของเอนไซม์ 1 α -hydroxylases จาก *CYP27A1* ให้กลายเป็น 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ หรือ 1 α ,25(OH)₂D₃ ซึ่งรูปแบบนี้จะจับจำเพาะกับ vitamin D receptor (VDR) มากและเข้าสู่เซลล์เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์ต่างๆ ซึ่งรูปแบบดังกล่าวจะอยู่ในร่างกายได้ประมาณ 4 ชั่วโมง [11, 45-48]

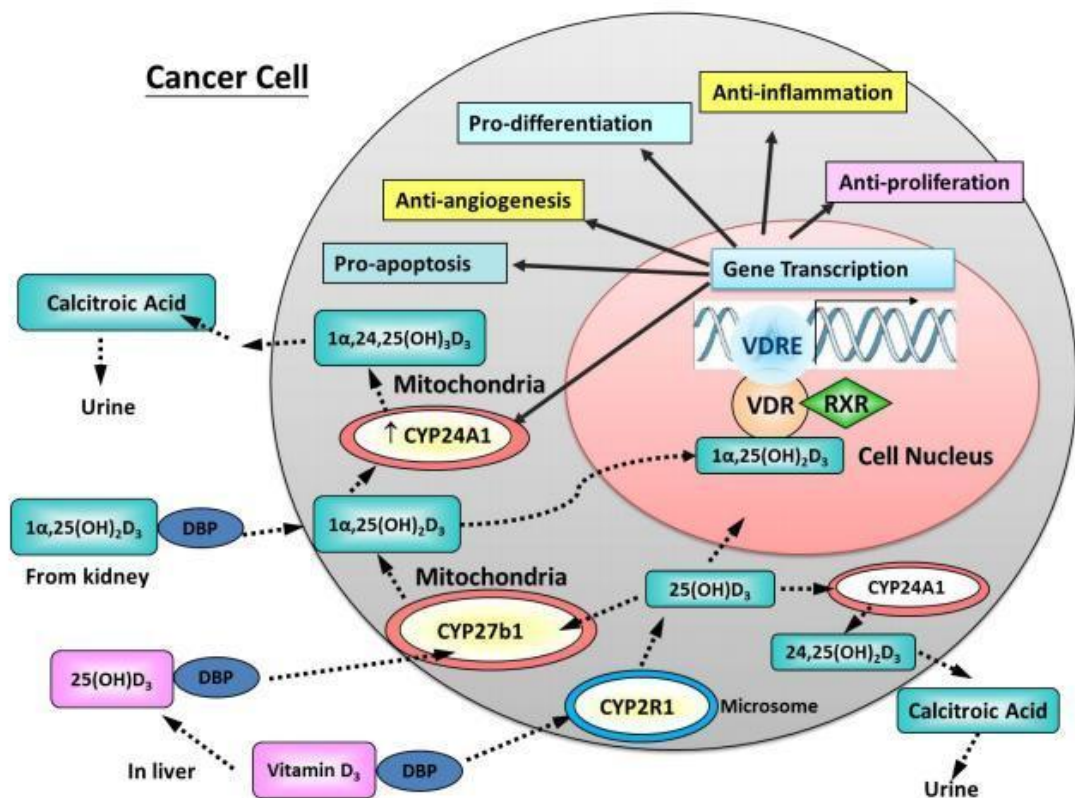


รูปที่ 11 ขั้นตอนการสังเคราะห์และการทำงานของวิตามินดี [14]

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *DHCR7* กับการเกิดพังผืดในตับ

จากการศึกษา genome-wide association studies (GWAS) พบว่า ระดับของ 25(OH)D ในซีรัมมีความสัมพันธ์กับยีนที่สังเคราะห์และขนส่งวิตามินดี ได้แก่ *DHCR7* ที่ถอดรหัสให้ 7-dehydrocholesterol reductase, *CYP2R1* ที่ถอดรหัสให้ cytochrome P450 family 2 และ vitamin D receptor protein (*GC*) ทั้งสามยีนมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบ่อยเรื้อรัง และเป็นยีนที่สำคัญในการควบคุมกลไกการทำงานของวิตามินดีในร่างกาย [11, 49] จากการศึกษาหลายๆ งานวิจัย พบว่าวิตามินดีมีผลต่อการเกิดโรคตับ โดยกระตุ้นและควบคุมภูมิคุ้มกันตัวเอง (Innate immunity) ให้เพิ่มจำนวนและต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ในขั้นตอนดังกล่าวทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย ในอีกทางหนึ่งก็จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันรับมา (Adaptive immunity) เพื่อควบคุมการแสดงออกของ Toll Like Receptor (TLRs) โดยลดการผลิต proinflammatory cytokines ดังนั้นการเสียสมดุลของการผลิตวิตามินดีจะส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบและการเกิดพังผืดในที่สุด [50]

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (single nucleotide polymorphism, SNPs) ของยีน *DHCR7* (rs12785878, G>T) บริเวณ intron อยู่บนโครโมโซมที่ 11 ตำแหน่ง 71456403 มีความสัมพันธ์กับระดับของ 25(OH)D ที่ลดลง และความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ โดยยีนนี้สามารถถอดรหัสให้เอนไซม์ที่เป็น rate-limiting step สำหรับการสังเคราะห์วิตามินดี หากเกิด variation หรือยีนไม่สามารถทำงานได้ จะทำให้ปริมาณของ 25(OH)D ในซีรัมลดลง และ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ ลดลง ทำให้เสียสมดุลการควบคุมกระบวนการการอักเสบ การเพิ่มจำนวน การเกิดพังผืด และกลายเป็นตับแข็งและมะเร็งตับได้ในที่สุด (รูปที่ 12) [11, 51] ในปี 2013, Petta S. และคณะ ได้ศึกษา SNP ของยีน *DHCR7* (rs12785878) พบว่า SNP นี้ที่เป็นจีโนไทป์แบบ GG มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ และสัมพันธ์กับการปริมาณ 25(OH)D ในซีรัมที่ลดลงของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังจีโนไทป์ 1 [13].



รูปที่ 12 การทำงานของ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ในการควบคุมการทำงานภายในเซลล์ [44]

การควบคุมการทำงานของกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ โดย $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ จับกับ vitamin D receptor (VDR) พบได้ในหลายเนื้อเยื่อ มีคุณสมบัติในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ต้านการอักเสบ การตายของเซลล์และการเกิดใหม่ของเซลล์ได้

ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในกลุ่มผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซึ่งร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี โดยใช้เทคนิค allelic discrimination assay โดยใช้ *TaqMan* probe real-time PCR ซึ่งความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจนำไปใช้เป็น biomarker เพื่อวินิจฉัยความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับของกลุ่มผู้ป่วยในประเทศไทย รวมทั้งอาจเป็นประโยชน์ในการรักษาโรคจากความผิดปกติของเซลล์ตับในกลุ่มประชากรไทยได้เป็นอย่างดี



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research design)

รูปแบบการวิจัยเป็นการศึกษาแบบ case-control study ซึ่งได้รับการพิจารณาและผ่านการอนุมัติจริยธรรมจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) ในโครงการวิจัยหมายเลข (IRB No.) 412/57 และ 583/57

ประชากรที่ศึกษา

กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target population)

- กลุ่มประชากรที่ศึกษา (case) แบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง คือ กลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมานานกว่า 6 เดือน และไม่เป็นผู้ป่วยมะเร็งตับ ที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ซึ่งตรวจพบ Anti-HCV เป็น positive และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
2. เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยและตรวจประเมินการแข็งตัวของตับด้วยเครื่อง fibroscan ที่เข้ารับการรักษาและเฝ้าติดตามการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
3. ผู้ที่ลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น ไวรัสตับอักเสบบีหรือเอชไอวี
2. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย หรือไม่สามารถลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย
3. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากแพทย์ว่าเป็นมะเร็งชนิดอื่นร่วมด้วย

- 1.1 กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและสามารถหายได้เอง คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติรักษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และหายได้เองโดยไม่ได้รับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีประวัติรักษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และหายได้เองโดยไม่ได้รับการรักษาซึ่งตรวจพบ Anti-HCV เป็น positive แต่ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
 2. ผู้ที่ลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวិจัย
2. กลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ที่เข้ารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และศูนย์วิจัยโรคเอดส์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งตรวจพบ Anti-HCV เป็น positive และให้ผล Anti-HIV เป็น positive และตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเอชไอวีและไวรัสตับอักเสบบี
2. เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยและตรวจประเมินการแข็งตัวของตับด้วยเครื่อง fibroscan ที่เข้ารับการรักษและเฝ้าติดตามการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และศูนย์วิจัยโรคเอดส์ สภากาชาดไทย
3. ผู้ที่ลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย

เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดออก (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสเอชไอวีเพียงอย่างเดียว หรือผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
2. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการศึกษาวิจัย หรือไม่สามารถลงลายมือชื่อในใบยินยอมเข้าร่วมการศึกษาวิจัย
3. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยยืนยันจากแพทย์ว่าเป็นมะเร็งชนิดอื่นร่วมด้วย

- กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (healthy control) คือ กลุ่มประชากรสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและเชื้อไวรัสเอชไอวี ซึ่งจะได้รับความปลอดภัยตัวอย่างจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample size)

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบ case-control study โดยกลุ่มประชากรที่ศึกษาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มและเป็นอิสระต่อกัน ต้องคำนวณจำนวนกลุ่มประชากรที่ศึกษาที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง กลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี โดยใช้สูตรดังนี้

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

N หมายถึง ประชากรที่ศึกษาในแต่ละกลุ่ม

P_2 หมายถึง โอกาสที่กลุ่มควบคุมจะมีปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดพังผืดในตับเท่ากับ 0.4 [52]

OR หมายถึง odd ratio เท่ากับ 2.05 [20, 53]

P_1 หมายถึง อัตราที่คาดว่าประชากรกลุ่ม case จะมีปัจจัยที่ผู้วิจัยสนใจ

โดย P_1 มีค่าเท่ากับ $\frac{P_2 \times OR}{1 + P_2(OR - 1)} = 0.577$

P มีค่าเท่ากับ $\frac{(p_2 + p_1)}{2} = 0.4885$

Z_{α} ค่าสถิติมาตรฐานใต้โค้งปกติแทนความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 แบบ two-tail test โดย

$$Z_{\alpha/2} = 1.96 \text{ เมื่อกำหนด } \alpha = 0.05$$

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

แทนค่าในสมการข้างต้น

$$\text{จะได้ว่า } N = \frac{[1.96\sqrt{(2 \times 0.4885)(1 - 0.4885)} + 1.28\sqrt{0.577(1 - 0.577) + 0.4(1 - 0.4)}]^2}{(0.577 - 0.4)^2} = \frac{166}{\text{group}}$$

ดังนั้นกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในแต่ละกลุ่ม ต้องมีจำนวนอย่างน้อย 166 ราย เพื่อความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูล เนื่องจากมีเป้าหมายที่จะตีพิมพ์ผลงานวิจัยนี้ลงในวารสารระดับนานาชาติ จึงต้องเก็บตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่จะสามารถเก็บได้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. ตัวอย่างเลือดที่เหลือของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จากโครงการวิจัย หมายเลข 547/55 จำนวน 200 ราย
2. ตัวอย่างเลือดที่เหลือของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี จากโครงการวิจัยหมายเลข 547/55 จำนวน 200 ราย
3. กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 200 ราย

โดยส่วนหนึ่งของตัวอย่างเลือดกลุ่มประชากรเป้าหมายและกลุ่มควบคุม จะใช้เลือดและผลการตรวจวัดพังผืดในตับด้วยเครื่อง fibroscan ของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี ที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคตของ โครงการวิจัย การศึกษาเปรียบเทียบทางระบาดวิทยาระดับโมเลกุลและความรุนแรงของโรคตับอักเสบบีระหว่างการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างเดียวและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับเอชไอวีในประเทศไทย (IRB 547/55) เท่านั้น

การเก็บสิ่งตัวอย่าง (Collecting sample)

โครงการวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีที่ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยเลขที่ 547/55 ที่ได้มาจากการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำชั้นผิวบริเวณรอยพับข้อศอก (cubital fossa) ด้วยการใช้เข็มปลอดเชื้อ และเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ซึ่งกระทำโดยแพทย์หรือพยาบาลผู้ชำนาญการ เจาะเก็บเลือดใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA (EDTA blood) ปริมาตร 5 ml และใส่ในหลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งตัว (Blood clot) ปริมาตร 5 ml จากนั้นปั่นแยกซีรัมนำมาตรวจวิทยาภูมิคุ้มกัน เพื่อหา Anti-HCV และ Anti-HIV หลังจากนั้น เก็บรักษาซีรัมและพลาสมาที่ปั่นแยกแล้วที่อุณหภูมิ -80°C

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.1. Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml (ExtraGene, USA)
- 1.2. Parafilm (Plastic Packaging, USA)
- 1.3. PCR tube (BIOLINE, UK)
- 1.4. Real-time PCR tube (Kisker Biotech, Netherlands)
- 1.5. Pipette tip ขนาด 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (ExtraGene, USA)
- 1.6. Polypropylene conical tube ขนาด 15 ml (GenFollower, China)
- 1.7. Polypropylene conical tube ขนาด 50 ml (ExtraGene, USA)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 2.1. Autoclave (Hirayama, Japan)
- 2.2. Automatic adjustable micropipette ขนาด P2 (0.1-2 μ l), P10 (0.5-10 μ l), P20 (2-20 μ l), P200 (20-200 μ l) และ P1000 (100-1000 μ l) (Eppendorf, Germany)
- 2.3. Balance (Precisa, UK)
- 2.4. Centrifuge Universal 320r (Hettich Centrifuge, UK)
- 2.5. Cylinder ขนาด 250 ml และ 1,000 ml (K-EXAX, USA)
- 2.6. Electrophoresis chamber set (Major Science, USA)
- 2.7. Environmental Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, USA)
- 2.8. Force mini (Lio Lab international, Korea)
- 2.9. Freezer -20 $^{\circ}$ C (Sanyo, Japan)
- 2.10. Freezer -80 $^{\circ}$ C (Panasonic, Japan)
- 2.11. Gel Doc 1000 (Vilber Lourmat, Hong Kong)
- 2.12. Heater block (Bioer Technology, China)
- 2.13. Microwave oven (Sharp, Japan)
- 2.14. Mini Centrifuge (Eppendorf, Germany)

- 2.15. Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, USA)
- 2.16. PCR cabinet
- 2.17. PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany)
- 2.18. Pipette rack (ExtraGene, USA)
- 2.19. Power supply model 250 (Major Science, USA)
- 2.20. Reagent bottle ขนาด 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Schott Duran, Germany)
- 2.21. Refrigerator 4 °C (Panasonic, Japan)
- 2.22. StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)
- 2.23. Stirring-magnetic bar
- 2.24. UV transilluminator (Vilber Lourmat, Hong Kong)
- 2.25. Vacuum (Schott Duran, Germany)
- 2.26. Vortex mixer (Scientific Industries, USA)

3. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

- 3.1. Absolute ethanol (Merck, Germany; Cat No. 1009832500)
- 3.2. Chloroform (RCI Labscan, Thailand; Cat No. EP1027E)
- 3.3. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Bio Basic Canada, Canada, Cat No. EB0185)
- 3.4. Glycogen (USB, Hong Kong; Cat No. G8170-41B1)
- 3.5. Isoamyl alcohol (Carlo Erba Reagenti, Italy; Cat No. 413832)
- 3.6. Nuclease-free water
- 3.7. Phenol (AMRESCO, USA; Cat No. 0945400ML)
- 3.8. Proteinase K (Life Technologies, USA; Cat No. 25530-015)
- 3.9. Sodium acetate (NaOAc) (Merck, Germany; Cat No. 567418)
- 3.10. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (AMRESCO, USA; Cat No. 0227)
- 3.11. Tris-HCl (Sigma, Singapore; Cat No. T5941)

4. สารเคมีที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR

- 4.1. 10X DreamTaq buffer (Thermo Scientific, USA; Cat No. B65)
- 4.2. dNTPs ได้แก่ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP (Thermo Scientific, USA; Cat No. R0181)
- 4.3. Distill water (DW)
- 4.4. DreamTaq polymerase (Thermo Scientific, USA; Cat No. EP0703)
- 4.5. Specific primers (Integrated DNA Technologies, Singapore)

5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ agarose gel electrophoresis

- 5.1. 100 bp DNA ladder H3 RTU (Ready-to-Use) (GeneDireX, Taiwan; Cat No. DM003-R500)
- 5.2. Agarose (Invitrogen, USA; Cat No. 75510-019)
- 5.3. Boric acid (Bio Basic Canada, Canada, Cat No.BB0044)
- 5.4. Ethidium bromide (AMRESCO, USA; Cat No. 0.492)
- 5.5. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma, Singapore, Cat No. E9884)
- 5.6. Tris Base (Bio Basic Canada, Canada, Cat No.TB0196)

6. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)

- 6.1. Nuclease-free water
- 6.2. RBC HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YDF300)

7. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector

- 7.1. 10X Ligation buffer (Thermo Scientific, USA; Cat No. K0771)
- 7.2. RBC TA cloning vector kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. RC013)
- 7.3. T4 DNA ligase (Thermo Scientific, USA; Cat No. #EL0011)

8. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค transformation

- 8.1. Agar (Becton, Dickinson and Company (BD), USA; Cat No. RC013)
- 8.2. Ampicillin (M&H Manufacturing, Thailand; Reg No. 1A 26/36)
- 8.3. Distill water (DW)
- 8.4. Glucose (Ajax Finechem, New Zealand; Cat No. 783)
- 8.5. Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (AMRESCO, USA; Cat No. 0487)
- 8.6. Potassium chloride (KCl) (VWR international, USA; Cat No. 71003-522)
- 8.7. Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany; Cat No. 567440)
- 8.8. Tryptone (Becton, Dickinson and Company (BD), USA; Cat No. 223000)
- 8.9. X-gal (AMRESCO, USA; Cat No. 0428)
- 8.10. Yeast extract (Becton, Dickinson and Company (BD), USA; Cat No. 210934)

9. สารเคมีที่ใช้สำหรับสกัดพลาสมิด (Plasmid extraction)

- 9.1. Nuclease-free water
- 9.2. RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taiwan; Cat No. YPD300)

10. สารเคมีที่ใช้ตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR

- 10.1. 5 PRIME MasterMix (Fisher Scientific, USA; Cat No. 2200110)
- 10.2. Distill wayer (DW)
- 10.3. TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA)
 - *PNPLA3* rs738409 (Assay ID: C_7241_10)
 - *COX-2* rs689465 (Assay ID: C_2517146_10)
 - *DHCR7* rs12785878 (Assay ID: C_32063037_10)

11. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทาง bioinformatics

- 11.1. BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9)
- 11.2. Oligos. Microsoft Visual Studia (version 6.0 SP5, 2001)

12. โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- 12.1. GraphPad Software
(<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/?Format=SD>)
- 12.2. Hardy-Weinberg Equilibrium (<http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>)
- 12.3. MedCalc Statistical Software Version 12.7.7
(http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)
- 12.4. IBM SPSS Statistics Version 22

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค allelic discrimination assay โดยใช้ TaqMan probe real-time PCR หาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

1. การสกัด DNA (DNA Extraction)

การสกัด DNA ใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction มีขั้นตอนดังนี้

- 1.1 นำสารที่ต้องการสกัด DNA (cell line/PBMC) ปริมาตร 100 μ l เติม lysis buffer ปริมาตร 400 μ l (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS) จากนั้นเติม proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 10 μ l ผสมให้เข้ากันในหลอด microcentrifuge tube 1.5 ml แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 1.2 เติมสารละลาย phenol ปริมาตร 250 μ l (ดูสูตรละลายชั้นล่าง) และ chloroform :isoamyl alcohol (49:1) ปริมาตร 250 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที

* ระหว่างนี้เตรียม microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ เติม glycogen ปริมาตร 4 μ l absolute ethanol (ที่แช่เย็น) ปริมาตร 800 μ l และ 2 M NaOAc ปริมาตร 40 μ l ผสมให้เข้ากัน

1.3 ดูดสารละลายชั้นบนที่ได้หลังจากปั่นเหวี่ยงใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex

1.4 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -70°C เป็นเวลา 30 นาที

1.5 นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำส่วนตะกอนที่เหลือมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที

1.6 ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนสีขาวกัน microcentrifuge tube เท่านั้น จากนั้นนำไประเหยให้แห้งด้วย vacuum โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที

1.7 นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) ปริมาตร 30 μ l จากนั้นเก็บสารละลาย DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20°C

1.8 นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer และบันทึกผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้

2. การทำตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive control)

2.1 ยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 และยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465

เพิ่มจำนวน DNA ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 และยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 ด้วยการทำให้ polymerase chain reaction (PCR) จาก DNA extraction ที่ได้จากเซลล์ A549 HeLa และ HepG2 โดยใช้สารเคมี สภาวะในการทำ PCR และ primer ดังตารางที่ 2-5 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 สารที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 และยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	19.88	-
10X DreamTaq buffer	2.50	1X
10 mM dNTPs mixture	0.50	0.5 mM
10 μM Forward primer	0.50	0.5 μM
10 μM Reverse primer	0.50	0.5 μM
DreamTaq DNA polymerase (5 units/μl)	0.12	0.6 Units
DNA template	1	-
Total volume	25	

ตารางที่ 3 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	95	5 นาที	
Denaturation	95	30 วินาที	} 40 รอบ
Annealing	58	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	

ตารางที่ 4 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ของยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	95	5 นาที	
Denaturation	95	30 วินาที	} 35 รอบ
Annealing	60	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 และยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465

ชื่อไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ (bp)	อ้างอิง
Pnpla3_18677_F	Forward	TACCACGCCTCTGAAGGAAG	157	[26]
Pnpla3_18833_R	Reverse	CCCTGCTCACTTGGAGAAAG		
COX-2_391_F	Forward	TGCTGTCATTTTCCTGTAATGC	462	[54]
COX-2_852_R	Reverse	TTTCTCTCCCTGATGCGTGG		
M13_F	Forward	GTTTTCCCAGTCACGAC	171	(RBC)
M13_R	Reverse	TCACACAGGAAACAGCTATGAC		

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นย้อมเจลที่ได้ด้วยสารละลาย Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที และตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการเพื่อสกัดเจลต่อไป

2.2 ยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

การทำ Positive control สำหรับยีน *DHCR7* ใช้การสู่มของการจับกันระหว่าง DNA Extraction (Cell line; HeLa HepG2 และ A549) กับ *TaqMan* probe real-time PCR (อาศัยเทคนิค allelic discrimination assay โดยเมื่อ probe และ primer จับกับ template เพิ่มจำนวน DNA จะได้ขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณ 100 bp) โดยใช้สารเคมี และสภาวะในการทำ real-time PCR ดังตารางที่ 6-7 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 สารที่ใช้ทำ allelic discrimination assay ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	4.75	-
2.5X 5 PRIME mastermix	4	1X
40X SNP assay (primer+probe mixture)	0.25	1X
DNA template	1	-
Total volume	10.0	

ตารางที่ 7 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ allelic discrimination assay ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(°C)	เวลา	หมายเหตุ
Holding stage	95	10 นาที	
Denaturation	95	15 วินาที	} 40 รอบ
Annealing/Extension	60	1 นาที	

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ real-time PCR มาตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นย้อมเจลที่ได้ด้วยสารละลาย Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที และตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการเพื่อสกัดเจลต่อไป

3. การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)

ใช้ชุดสกัดเจล RBC HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit

- 3.1 ตัดเจลบริเวณที่ปรากฏแถบ DNA ตามขนาดที่ต้องการใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- 3.2 เติม DF buffer ปริมาตร 500 μ l (300 mg gel ต่อปริมาตร DF buffer 500 μ l) ลงใน tube ที่มีเจลอยู่ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex
- 3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 15 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายหมดโดยระหว่างบ่มนั้น ควรกลับ microcentrifuge tube ทุก ๆ 2-3 นาที
- 3.4 นำสารละลายที่ได้ใส่ลงใน DF column ที่ใส่อยู่ใน collection tube
- 3.5 หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที และทิ้งของเหลวใน collection tube จากนั้นใส่ DF column กลับไปใน collection tube อีกครั้ง
- 3.6 เติม Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน DF column
- 3.7 นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งของเหลวใน collection tube และใส่ DF column กลับไปใน collection tube อีกครั้ง
- 3.8 นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ DF column แห้งสนิท

3.9 นำ DF column ใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube อันใหม่

3.10 เติม Elution buffer ปริมาตร 30 μl ลงใน DF column และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

3.11 เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

4. การเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector (Ligation)

ใช้ชุด RBC TA cloning vector kit โดยใช้สารเคมีดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 สารที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ TA cloning vector

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Ligation buffer	1	1X
TA cloning vector (RBC) (25 ng/ μl)	2	5 ng/ μl
T4 DNA ligase (5 units/ μl)	1	5 Units
Purified PCR product	6	-
Total volume	10	

จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน

5. การเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค transformation (Heat shock)

5.1 ผสม competent cells (*E. coli*) ปริมาตร 50 μl และสารละลาย ligation ปริมาตร 10 μl ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

5.2 แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

5.3 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที

5.4 แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาทีทันที

5.5 เติม SOC medium ที่มี 2M Mg^{2+} และ 2M Glucose ปริมาตร 950 μl (ผสม 2M Mg^{2+} 10 μl และ 2M Glucose 10 μl ลงใน SOC medium 1 ml)

5.6 หลังจากนั้นนำมาเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

5.7 นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือ ปริมาตรประมาณ 50 μl

- 5.8 ดูดตะกอนและสารละลายที่เหลือมา Spread ลงใน LB agar plate ที่มี Ampicillin (ก่อนหน้านั้นต้อง spread สารละลายผสมของ IPTG 5 μ l และ X-gal 15 μ l ก่อน)
- 5.9 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 5.10 นำโคโลนี *E. coli* ที่มีสีขาวนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin ปริมาตร 2 μ l จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

6. การสกัดพลาสมิด (Plasmid Extraction)

ชุดสกัดพลาสมิดที่ใช้คือ RBC Real Genomics HiYield™ Plasmid Mini Kit

- 6.1 นำโคโลนี *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin ปริมาตร 2 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงมาถ่ายลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
- 6.2 นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ซึ่งสารละลายส่วนใสออก
- 6.3 เติม PD1 buffer ปริมาตร 200 μ l และนำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex
- 6.4 เติม PD2 buffer ปริมาตร 200 μ l และกลับ microcentrifuge tube ไปมา 10 ครั้ง
- 6.5 เติม PD3 buffer ปริมาตร 300 μ l และกลับ microcentrifuge tube ไปมา 10 ครั้ง
- 6.6 จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 6.7 เตรียม PD column ลงใน Collection tube ขนาด 2 ml จากนั้นดูดส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยง ลงใน PD column
- 6.8 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column ใน Collection tube อีกครั้ง
- 6.9 เติม W1 buffer ปริมาตร 400 μ l ลงใน PD column
- 6.10 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column ใน Collection tube อีกครั้ง
- 6.11 เติม Wash buffer ปริมาตร 600 μ l ลงใน PD column
- 6.12 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ PD column ใน Collection tube อีกครั้ง
- 6.13 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ PD column แห้ง
- 6.14 จากนั้นใส่ PD column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

6.15 เติม Elution buffer ปริมาตร 30 μl บริเวณกึ่งกลาง column

6.16 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที และเก็บพลาสติกที่อุณหภูมิ -20°C

7. การทำ PCR พลาสติกที่สกัดได้ (Colony PCR)

เพื่อตรวจสอบการเชื่อมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ใน TA vector โดยการเพิ่มจำนวนบริเวณของยีนที่สนใจโดยใช้ primer ที่สามารถจับได้บน TA vector (M13) ตามตารางที่ 5 ใช้สารเคมี และสภาวะในการทำ colony PCR ดังตารางที่ 9-10

ตารางที่ 9 สารที่ใช้ในการทำ colony PCR

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	9.94	-
10X DreamTaq buffer	1.25	1X
10 mM dNTPs mixture	0.25	0.5 mM
10 μM M13 Forward primer	0.25	0.5 μM
10 μM M13 Reverse primer	0.25	0.5 μM
DreamTaq DNA polymerase (5 units/ μl)	0.06	0.3 Units
LB Broth	1	-
Total volume	12.5	

ตารางที่ 10 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ colony PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	หมายเหตุ
Initial denaturation	95	5 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	95	30 วินาที	
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	5 นาที	

หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบด้วย 2% agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นย้อมเจลที่ได้ด้วยสารละลาย Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที

8. การวิเคราะห์ nucleotide sequencing

วิเคราะห์ผลการทำ Positive control โดยแบ่งพลาสมิดที่สกัดได้ 15 μl ใช้ primer ในการตรวจสอบคือ M13F pUC-40 แล้วส่ง Sequencing (1st Base, Singapore) นำผลที่ได้มา blast ใน NCBI หรือ alignment กับ reference sequence ด้วยโปรแกรม BioEdit

9. การเจือจางความเข้มข้นของพลาสมิด

เจือจางความเข้มข้นของ Positive control ให้มีความเข้มข้นเป็น 10^6 ng/ μl โดยเลือกพลาสมิดที่มี allele ต่างกัน จะได้ความเข้มข้นของ N ในหน่วย copies/ μl

$$\text{ใช้สูตร } \frac{m}{M.W.} = \frac{N}{6.02 \times 10^{23}}$$

เมื่อ m = มวล (g)

N = จำนวน copies ของพลาสมิด (copies/ μl)

$M.W.$ = (ความยาวของ vector (2723 bp)) + ผลิตภัณฑ์ของยีนที่ทำ PCR) \times
 $M.W.$ เฉลี่ยของเบส (660)

จากนั้นเจือจางความเข้มข้นที่ได้ให้เป็น 1×10^{10} copies/ μl ปริมาตร 10 μl

$$\text{ใช้สูตร } C_1 V_1 = C_2 V_2$$

โดย C_1 คือ ความเข้มข้นของพลาสมิดที่ยังไม่ได้เจือจาง

V_1 คือ ปริมาตรของพลาสมิดที่ยังไม่ได้เจือจาง

C_2 คือ ความเข้มข้นของพลาสมิดภายหลังจากการเจือจาง

V_2 คือ ปริมาตรของพลาสมิดภายหลังจากการเจือจาง

$$\text{จะได้ } V_1 (\mu\text{l}) = \frac{10^{10} \times 10}{N}$$

เติม D.W. ให้มีปริมาตรเป็น 10 μl แล้วเจือจางให้ความเข้มข้นเป็น 10^8 และ 10^6 ตามลำดับ

- เจือจางพลาสมิดความเข้มข้น 10^{10} เป็น 10^8 โดยดูดสารพลาสมิดความเข้มข้น 10^{10}

จำนวน 1 μl แล้วใส่ D.W. จำนวน 99 μl จะได้พลาสมิดที่มีความเข้มข้น 10^8 copies/ μl

- เจือจางพลาสมิดความเข้มข้น 10^8 เป็น 10^6 โดยดูดสารพลาสมิดความเข้มข้น 10^8 จำนวน

1 μl แล้วใส่ D.W. จำนวน 99 μl จะได้พลาสมิดที่มีความเข้มข้น 10^6 copies/ μl

*หมายเหตุ การทำ Positive ของ Genotype ที่เป็น heterozygous นำพลาสมิดของทั้ง 2 allele ที่ความเข้มข้น 10^6 copies/ μl มาผสมกันอย่างละ 33 μl

10. การหา genotype ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ด้วยวิธี allelic discrimination assay โดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR

ใช้ DNA extraction จาก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ของกลุ่มประชากรที่ศึกษา และใช้ probe จากบริษัท Applied biosystems โดยการตรวจวัดปริมาณแสงฟลูออเรสเซนส์ที่จำเพาะในแต่ละ allele ของ SNPs ซึ่งในการทดลองนี้ตรวจวัดสัญญาณ VIC และ FAM fluoreacent แสดงในรูป allelic discrimination plot แยกตามแต่ละจีโนไทป์ ใช้สารเคมีและสภาวะตามตารางที่ 11-13

ตารางที่ 11 สารที่ใช้ในการทำ Allelic discrimination assay สำหรับยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	4.75	-
2.5X 5 PRIME mastermix	4	1X
40X SNP assay (primer+probe mixture)	0.25	1X
DNA template	1	-
Total volume	10.0	

ตารางที่ 12 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ Allelic discrimination assay สำหรับยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 และยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(°C)	เวลา	หมายเหตุ
Holding stage	95	10 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	92	15 วินาที	
Annealing/Extension	60	1 นาที	

ตารางที่ 13 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ Allelic discrimination assay สำหรับยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

ขั้นตอน	อุณหภูมิ(°C)	เวลา	หมายเหตุ
Holding stage	95	10 นาที	} 40 รอบ
Denaturation	95	15 วินาที	
Annealing/Extension	60	1 นาที	

11. การเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วย

งานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากโครงการวิจัยหมายเลข 547/55 ที่ได้จากการเจาะเลือด ปริมาตร 5 ml บรรจุลงในหลอดที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกพลาสมา โดยใช้ Lymphocyte separation media (Wisent Inc., Quebec, Canada) แยกออกมาเป็น peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) แล้วละลายในสารละลาย PBS จากนั้นทำการสกัด DNA จาก PBMCs ของกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง กลุ่มผู้ป่วย ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี โดยใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction ต่อไป

12. การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

เก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดยการจดลงสมุดบันทึกผลการทดลอง และบันทึก ข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

13. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. ใช้โปรแกรม Graphpad Software คำนวณ Student's t test เพื่อดูความแตกต่างของ ลักษณะทางคลินิกระหว่าง case และ control
2. เปรียบเทียบการกระจายตัวของความถี่จีโนไทป์ของแต่ละ SNPs ในกลุ่มในกลุ่มประชากรที่ ศึกษา (Observed amount) เปรียบเทียบกับค่าคาดหวัง (Expected amount) โดยใช้ Hardy-Weinberg Equilibrium จากเว็บไซต์ <http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>
3. ใช้โปรแกรม MedCalc Software version 13.2 หาความสัมพันธ์ (correlation) ของ SNPs บนยีน Odd Ratio (OR) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุมสุขภาพดี โดยใช้ สถิติ chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P -value < 0.05)
4. ใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 22 หาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลาย ทางพันธุกรรมของยีนกับความรุนแรงของพังผืดในระดับที่ได้ค่าจากการตรวจด้วยเครื่อง fibroscan ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี ร่วมกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยใช้สถิติ chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05)

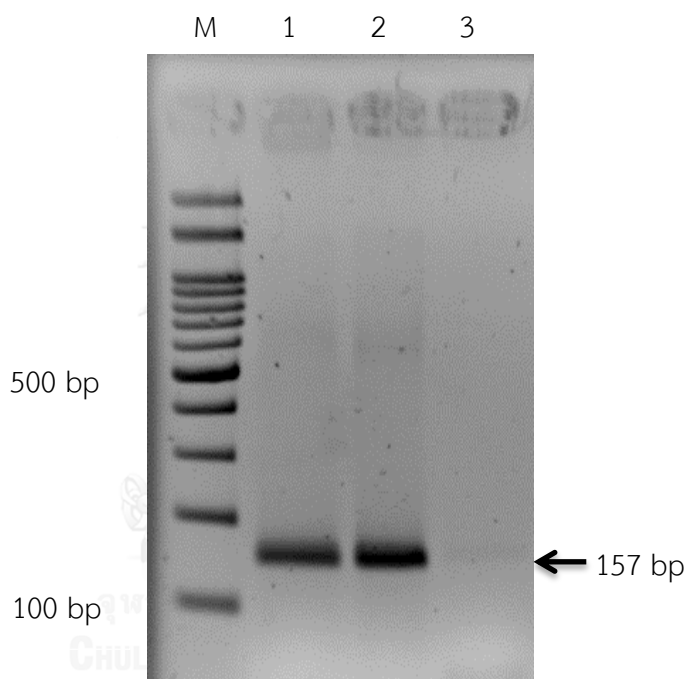
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสร้างตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของยีน *PNPLA3* (rs738409)

1.1 ผลการทำ PCR โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากเซลล์ HeLa

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 เมื่อตรวจสอบด้วย 2% agarose gel โดยวิธี electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที ปรากฏแถบ DNA ขนาด 157 bp ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ผลการทำ PCR ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 จากเซลล์ HeLa

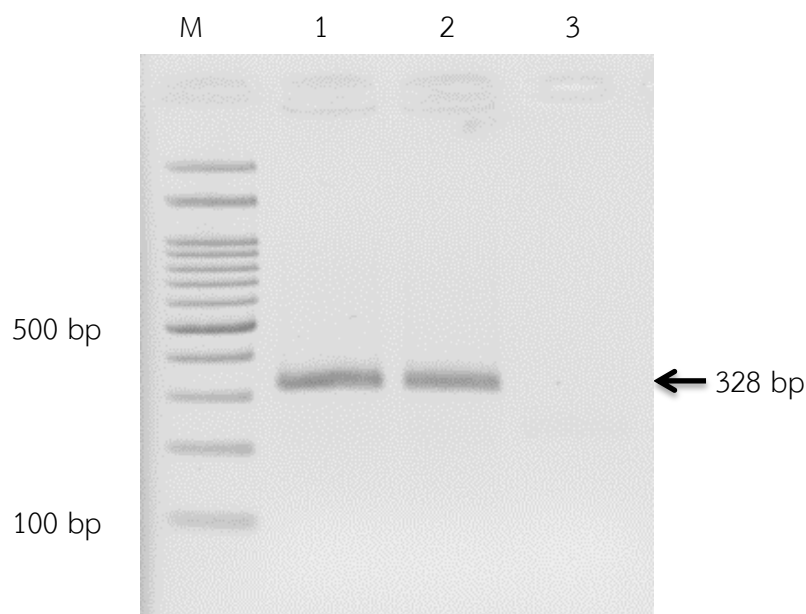
หมายเหตุ

- แถว M คือ 100 bp DNA Ladder
- แถว 1 และ 2 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ DNA ของ HeLa เป็น template
- แถว 3 คือ Negative control ของการทำ PCR

จากนั้นจึงตัดแถบเจลในบริเวณดังกล่าว สกัด DNA ออกจากเจล เชื่อมผลิตภัณฑ์เข้าสู่ TA vector และ transformation ใน *E.coli* จากนั้นทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีนที่สนใจใน TA vector

1.2 ผลการทำ colony PCR โดยใช้ primer คือ M13F และ M13R

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ colony PCR ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 เมื่อตรวจสอบด้วย 2% agarose gel โดย electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที ปรากฏแถบ DNA ขนาด 328 bp ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 ผลการทำ colony PCR ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409

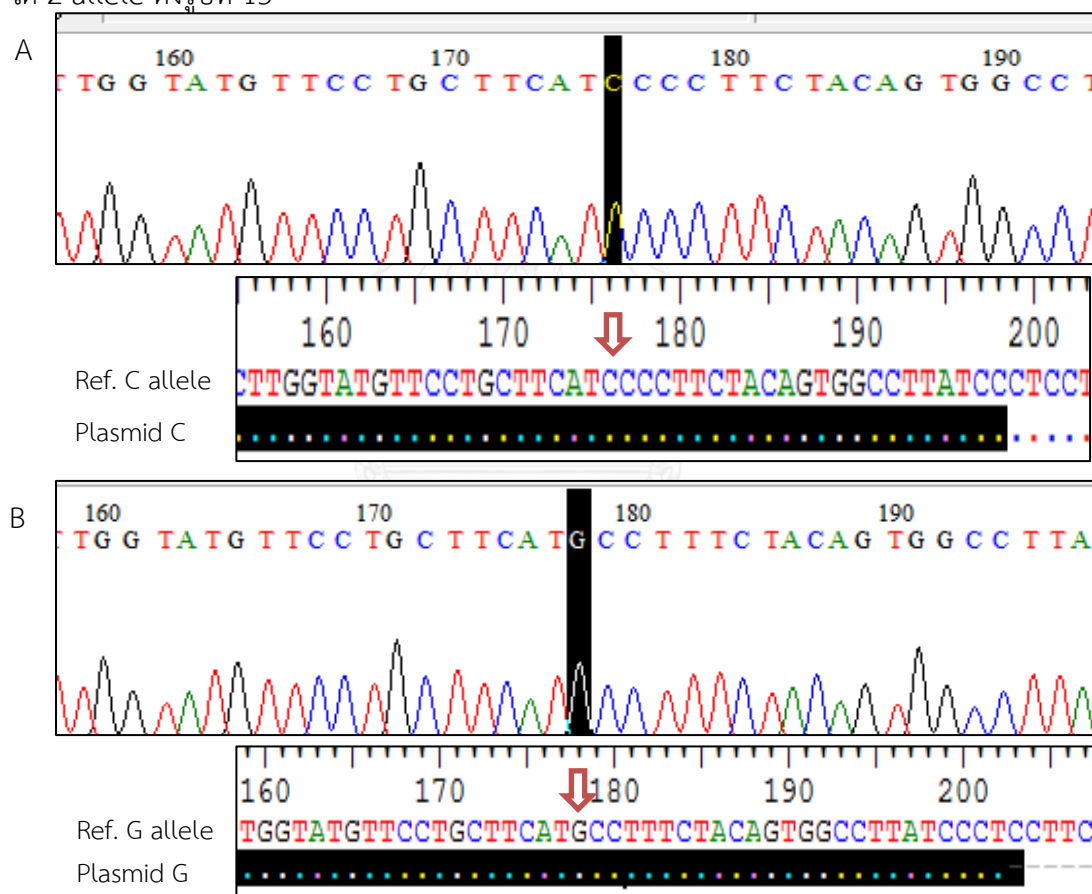
หมายเหตุ

- | | |
|-----------------|---|
| แถว M คือ | 100 bp DNA Ladder |
| แถว 1 และ 2 คือ | ผลิตภัณฑ์จากการทำ colony PCR ของยีนที่มาจาก HeLa cell |
| แถว 3 คือ | Negative control ของการทำ colony PCR |

จากนั้นจึงนำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ที่ได้จากการทำ transformation ด้วยวิธี Heat shock และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing ต่อไป พิจารณา allele ของแต่ละ SNPs จาก chromatogram ที่ได้เปรียบเทียบกับ reference sequence

1.3 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ด้วยวิธี sequencing

SNPs ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 มี major allele คือ C และ minor allele คือ G (REV) ตามลำดับ และผลจากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing พบว่า ทั้ง 2 colony มี SNPs ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ที่แตกต่างกันดัง chromatogram ที่แสดง และเมื่อทำการ alignment ด้วย reference sequence ของบริเวณจับของ *TaqMan* probe ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า การทดลองนี้สามารถสร้าง positive control ได้ 2 allele ดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409

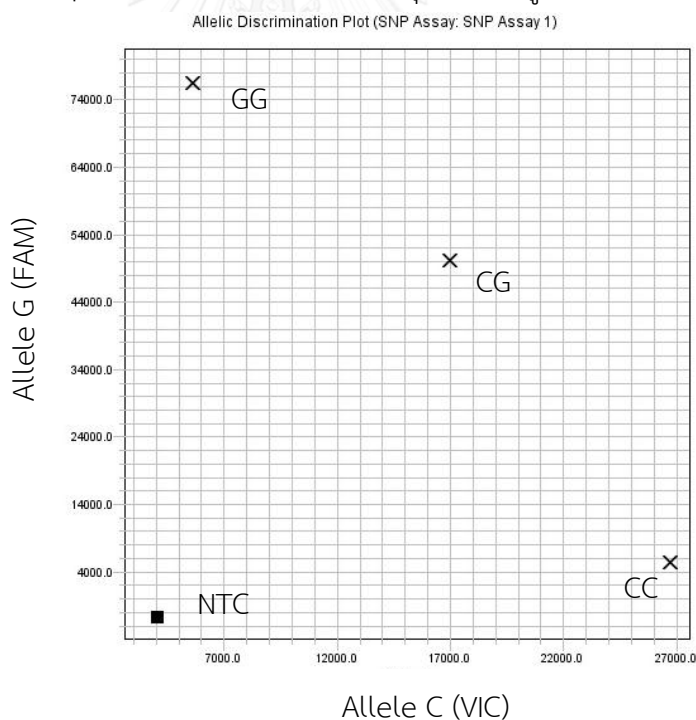
- แสดง Chromatogram ของพลาสมิดที่ C ที่ได้จากการส่ง sequencing และผลจากการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าพลาสมิดนี้เป็น allele C
- แสดง Chromatogram ของพลาสมิดที่ G ที่ได้จากการส่ง sequencing และผลจากการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าพลาสมิดนี้เป็น allele G

1.4 การตรวจสอบ Positive control ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 โดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR

SNPs ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 genotype คือ CC GG และ CG genotype โดยการตรวจสอบบริเวณ SNPs สามารถตรวจวัดโดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR ซึ่งสัญญาณที่ได้เกิดจากการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ของ probe 2 ชนิด (VIC/FAM) ซึ่งในแต่ละ genotype จะมีปริมาณสารฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้แตกต่างกัน คือ

- Genotype CC สามารถวัดปริมาณ VIC fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ FAM fluorescent
- Genotype GG สามารถวัดปริมาณ FAM fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ VIC fluorescent
- Genotype CG สามารถวัดปริมาณ VIC fluorescent ได้ใกล้เคียงกับ FAM fluorescent

ในการตรวจสอบ SNPs ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ในกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ศึกษา จึงทำการทดสอบความถูกต้องของ positive control ที่ได้ ด้วย TaqMan Probe Real-time PCR พบว่าสามารถจำแนก positive control ได้เป็น 3 กลุ่มดังผลในรูปที่ 16



รูปที่ 16 Allelic discrimination plot ของ Positive control สำหรับการหาจีโนไทป์ ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409

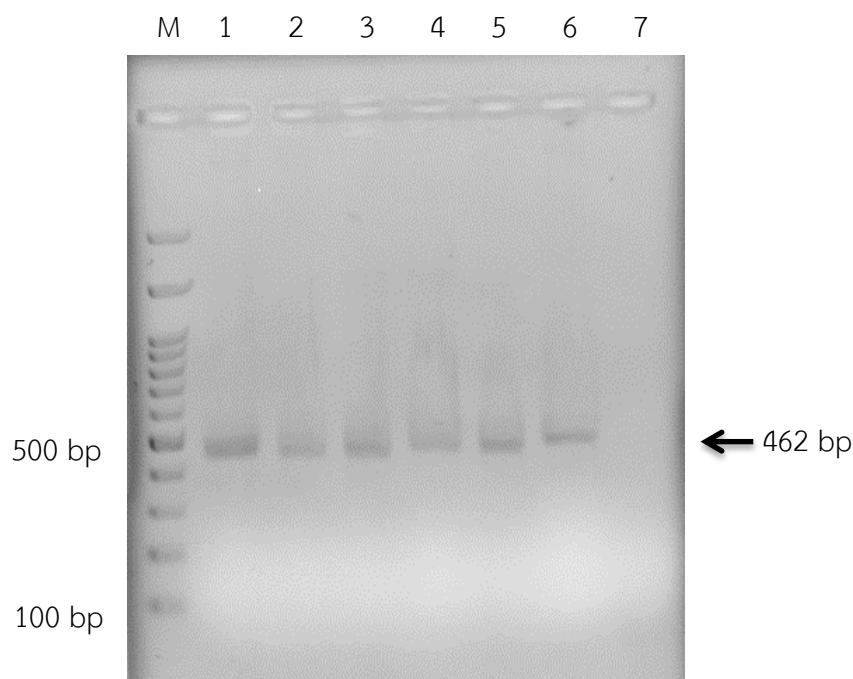
หมายเหตุ ปริมาณ VIC fluorescent แสดง allele C; ปริมาณ FAM fluorescent แสดง allele G;

NTC = No Template Control

2. การสร้างตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของยีน COX-2 (rs689465)

2.1 ผลการทำ PCR โดยใช้ DNA ที่สกัดได้จากเซลล์ A549, HeLa และ HepG2

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 เมื่อตรวจสอบด้วย 2% agarose gel โดยวิธี electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที ปรากฏแถบ DNA ขนาด 462 bp ดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 ผลการทำ PCR ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 จากเซลล์ A549, HeLa และ HepG2

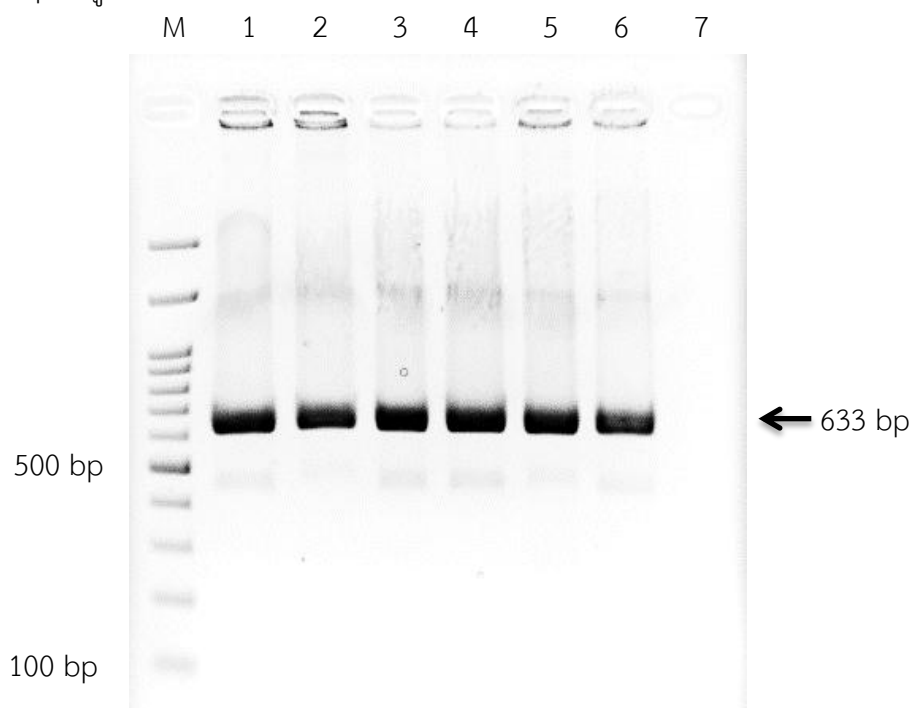
หมายเหตุ

- | | |
|-----------------|--|
| แถว M คือ | 100 bp DNA Ladder |
| แถว 1 และ 2 คือ | ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ DNA ของ HepG2 เป็น template |
| แถว 3 และ 4 คือ | ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ DNA ของ A549 เป็น template |
| แถว 5 และ 6 คือ | ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ DNA ของ HeLa เป็น template |
| แถว 7 คือ | Negative control ของการทำ PCR |

จากนั้นจึงตัดแถบเจลในบริเวณดังกล่าว สกัด DNA ออกจากเจล เชื่อมผลิตภัณฑ์เข้าสู่ TA vector และ transformation ใน *E.coli* จากนั้นจึงทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีนที่สนใจใน TA vector

2.2 ผลการทำ colony PCR โดยใช้ primer คือ M13F และ M13R

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ colony PCR ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 เมื่อตรวจสอบด้วย 2% agarose gel โดยวิธี electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที ปรากฏแถบ DNA ขนาด 633 bp ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 ผลการทำ colony PCR ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465

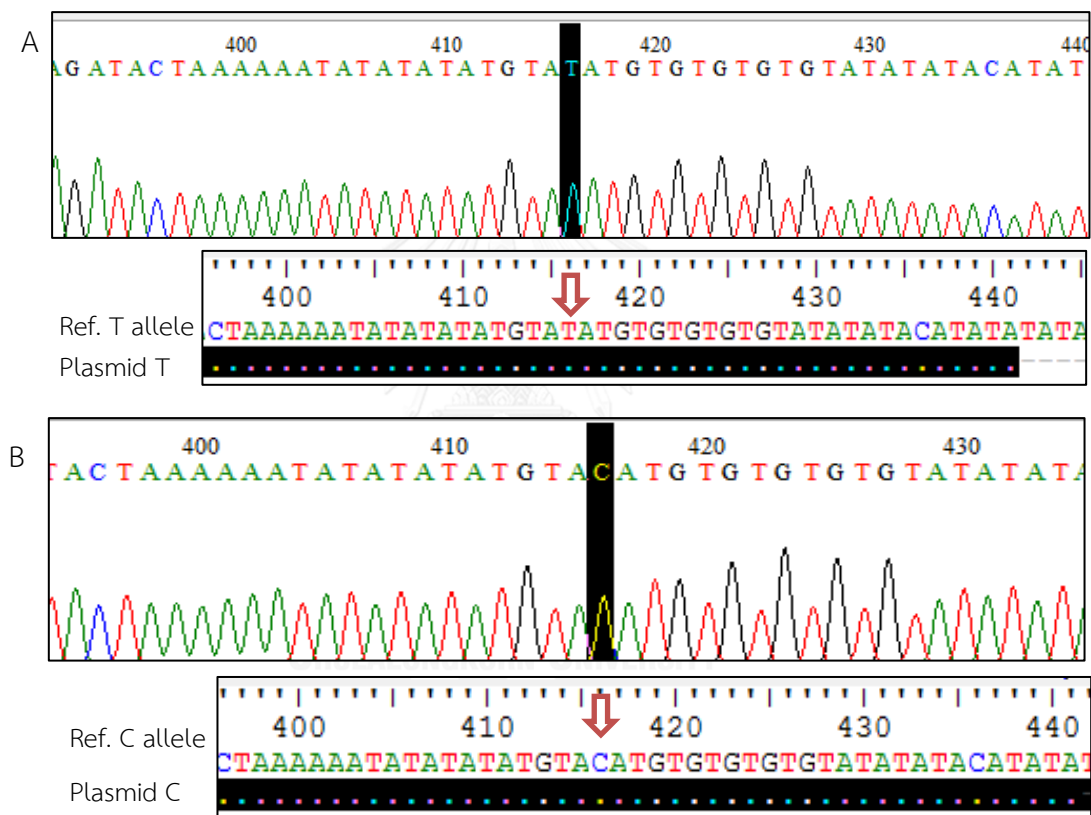
หมายเหตุ

- | | |
|-----------------|--|
| แถว M คือ | 100 bp DNA Ladder |
| แถว 1 และ 2 คือ | ผลิตภัณฑ์จากการทำ colony PCR ของยีนที่มาจาก HepG2 cell |
| แถว 3 และ 4 คือ | ผลิตภัณฑ์จากการทำ colony PCR ของยีนที่มาจาก A549 cell |
| แถว 5 และ 6 คือ | ผลิตภัณฑ์จากการทำ colony PCR ของยีนที่มาจาก HeLa cell |
| แถว 7 คือ | Negative control ของการทำ colony PCR |

จากนั้นจึงนำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 ที่ได้จากการทำ transformation ด้วยวิธี Heat shock ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing

2.3 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 ด้วยวิธี sequencing

SNPs ของยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 มี major allele คือ T และ minor allele คือ C (REV) ตามลำดับ และผลจากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing พบว่า ทั้ง 2 colony มี SNPs ของยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 ที่แตกต่างกันดัง chromatogram ที่แสดง และเมื่อทำการ alignment ด้วย reference sequence ของบริเวณจับของ *TaqMan* probe ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า การทดลองนี้สามารถสร้าง positive control ได้ 2 allele ดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465

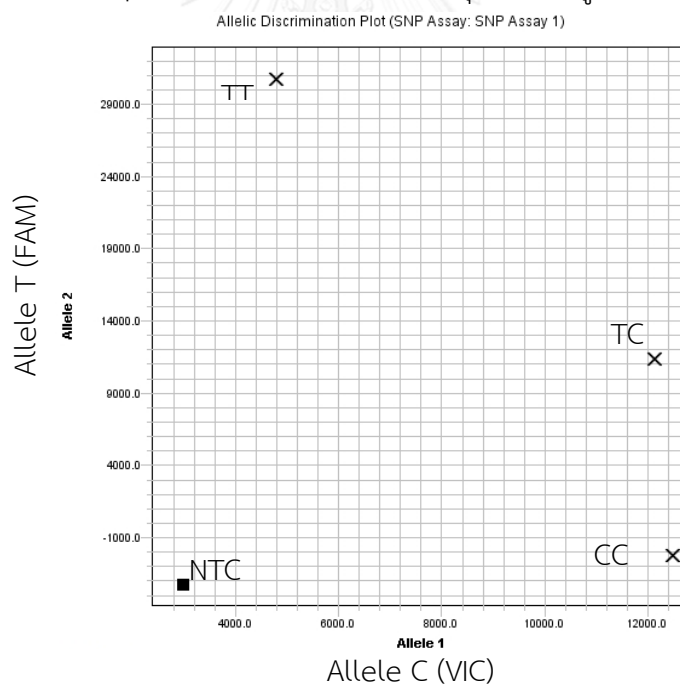
- แสดง Chromatogram ของพลาสมิดที่ T ที่ได้จากการส่ง sequencing และผลจากการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าพลาสมิดนี้เป็น allele T
- แสดง Chromatogram ของพลาสมิดที่ C ที่ได้จากการส่ง sequencing และผลจากการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าพลาสมิดนี้เป็น allele C

2.4 การตรวจสอบ Positive control ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 โดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR

SNPs ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 genotype คือ TT CC และ TC genotype โดยการตรวจสอบบริเวณ SNPs สามารถตรวจวัดโดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR ซึ่งสัญญาณที่ได้เกิดจากการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ของ probe 2 ชนิด (VIC/FAM) ซึ่งในแต่ละ genotype จะมีปริมาณสารฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้แตกต่างกัน คือ

- Genotype TT สามารถวัดปริมาณ FAM fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ VIC fluorescent
- Genotype CC สามารถวัดปริมาณ VIC fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ FAM fluorescent
- Genotype TC สามารถวัดปริมาณ VIC fluorescent ได้ใกล้เคียงกับ FAM fluorescent

ในการตรวจสอบ SNPs ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 ในกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ศึกษา จึงทำการทดสอบความถูกต้องของ positive control ที่ได้ด้วย TaqMan Probe Real-time PCR พบว่าสามารถจำแนก positive control ได้เป็น 3 กลุ่มดังผลในรูปที่ 20



รูปที่ 20 Allelic discrimination plot ของ positive control สำหรับการหาจีโนไทป์ ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465

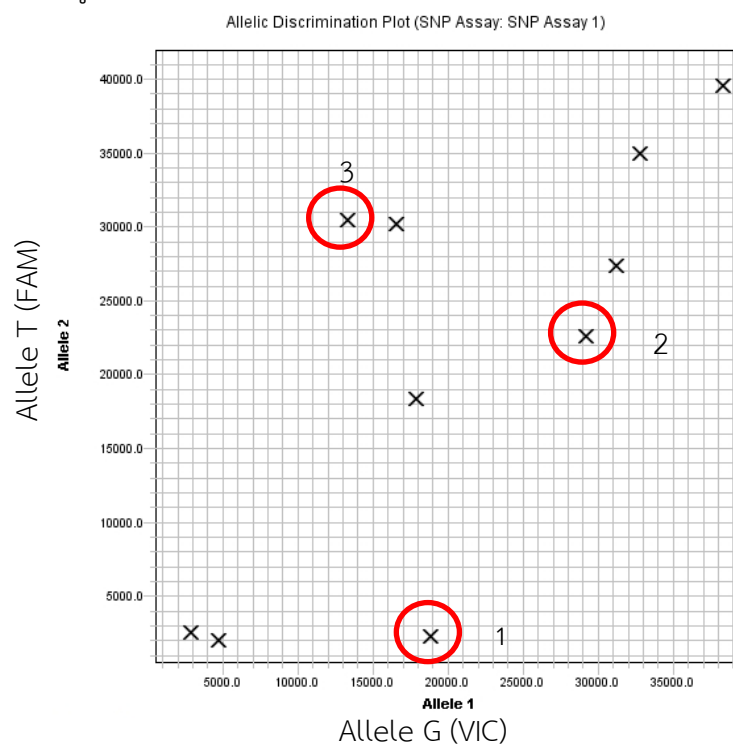
หมายเหตุ ปริมาณ VIC fluorescent แสดง allele C; ปริมาณ FAM fluorescent แสดง allele T;

NTC = No Template Control

3. การสร้างตัวแปรควบคุมเชิงบวก (Positive control) ของยีน *DHCR7* (rs12785878)

3.1 ผลการทำ SNP ของยีน *DHCR7* (rs12785878) (Cell line; HeLa, HepG2 และ A549) ด้วย TaqMan probe real-time PCR

การสร้าง Positive control สำหรับยีน *DHCR7* (rs12785878) โดยใช้ DNA ของ Cell line; HeLa HepG2 และ A549 และ TaqMan probe real-time PCR ที่จำเพาะกับบริเวณ SNPs ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 (อาศัยเทคนิค allelic discrimination assay โดยเมื่อ probe และ primer จับกับ template เพิ่มจำนวน DNA จะได้ขนาดผลิตภัณฑ์ประมาณเท่าความยาวของ probe) ดังรูปที่ 21

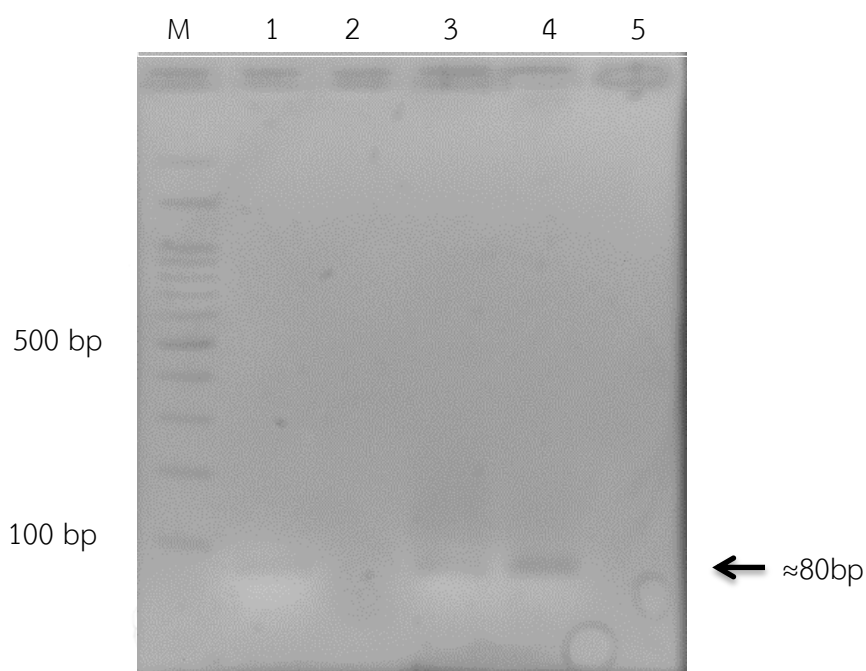


รูปที่ 21 Allelic discrimination plot ของ DNA extraction ของยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465
 หมายเหตุ ปริมาณ VIC fluorescent แสดง allele C; ปริมาณ FAM fluorescent แสดง allele T
 จุดที่ 1 ใช้ HepG2 เป็น template, จุดที่ 2 ใช้ A549 เป็น template และ จุดที่ 3 ใช้ HeLa เป็น template

จากนั้นจึงคัดเลือกผลการทดลองที่เมื่อทำปฏิกิริยาสมบูร์ณสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละ genotype ของ SNPs ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 มาอย่างละ 1 จุด (วงกลมสีแดง) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นยีนที่ได้ด้วย 2% agarose gel โดยวิธี electrophoresis ต่อไป

3.2 ผลการตรวจสอบการจับของ probe กับ DNA extraction

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของ TaqMan probe real-time PCR กับ DNA extraction ของ cell line ต่างๆ สามารถทำได้โดยการตรวจสอบด้วย 2% agarose gel โดยวิธี electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที จะปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 80 bp เนื่องจากความยาวของการทำ PCR ที่ได้ จะเท่ากับความยาวของ probe ที่จับบนสาย DNA ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 ผลการทำ real-time PCR ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

หมายเหตุ

แถวล M คือ 100 bp DNA Ladder

แถวล 1 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ Real-time PCR โดยใช้ A549 เป็น template

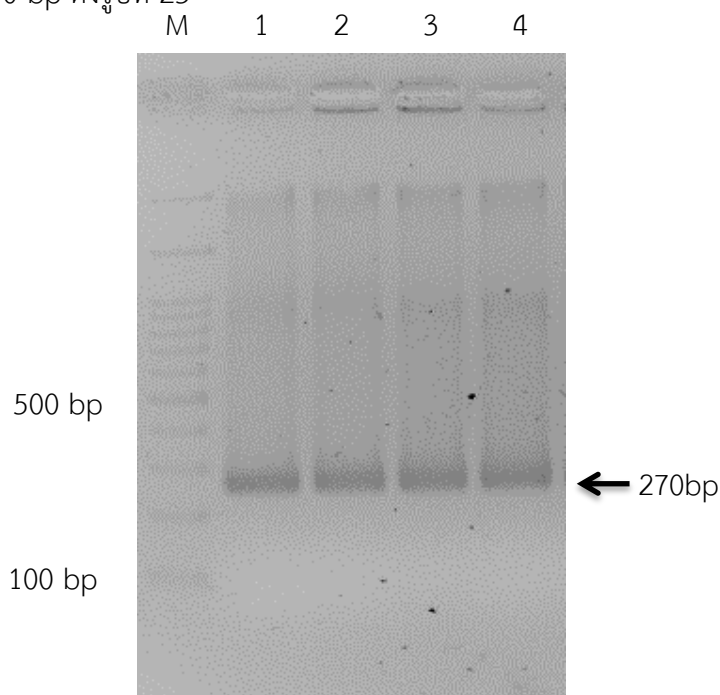
แถวล 3 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ Real-time PCR โดยใช้ HepG2 เป็น template

แถวล 4 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ Real-time PCR โดยใช้ HeLa เป็น template

จากนั้นจึงตัดแถบเจลในบริเวณดังกล่าว สกัด DNA ออกจากเจล เชื่อมผลิตภัณฑ์เข้าสู่ TA vector และ transformation ใน *E.coli* จากนั้นจึงทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อของยีนที่สนใจใน TA vector

3.3 ผลการทำ colony PCR โดยใช้ primer คือ M13F และ M13R

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ colony PCR ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 เมื่อตรวจสอบด้วย 2% agarose gel โดยวิธี electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที ปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 270 bp ดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 ผลการทำ colony PCR ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

หมายเหตุ

แถว M คือ 100 bp DNA Ladder

แถว 1 และ 2 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ colony PCR โดยใช้พลาสมิด HepG2 เป็น template

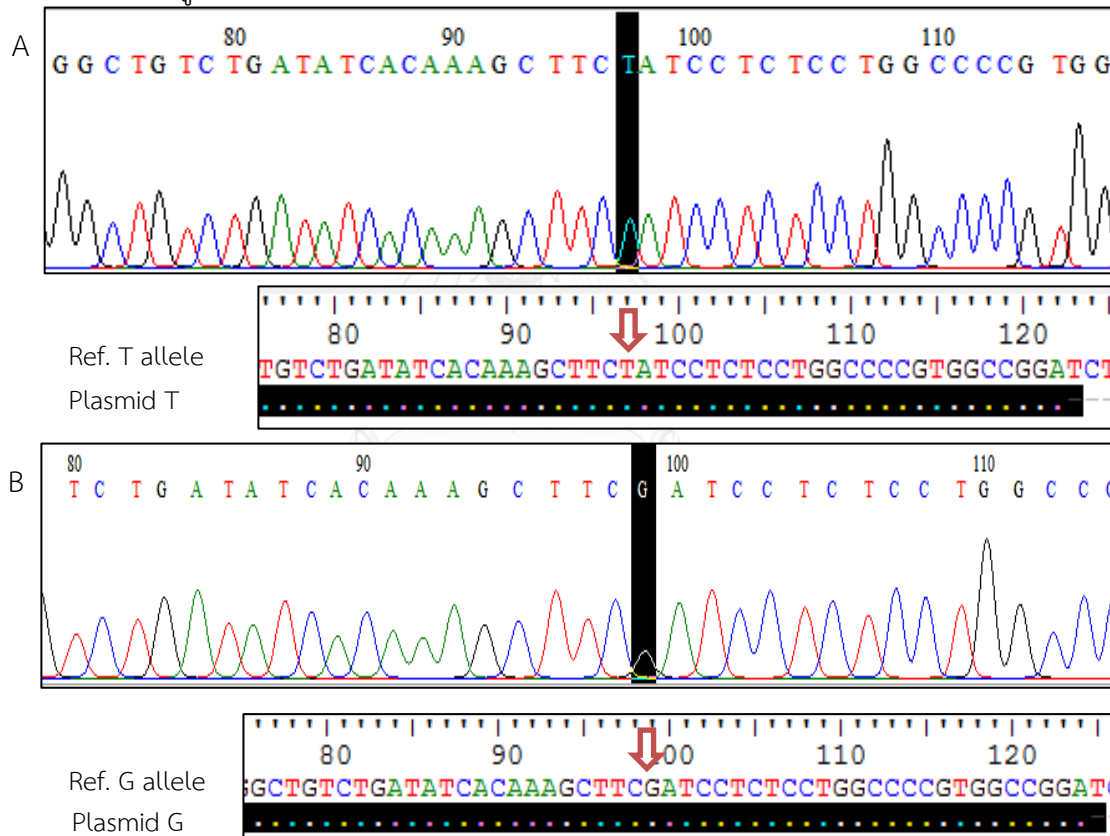
แถว 3 และ 4 คือ ผลิตภัณฑ์จากการทำ colony PCR โดยใช้พลาสมิด HeLa เป็น template

จากนั้นจึงนำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ที่ได้จากการทำ transformation ด้วยวิธี Heat shock ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing ต่อไป พิจารณา allele ของแต่ละ SNPs จาก chromatogram ที่ได้ เปรียบเทียบกับ reference sequence

3.4 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

ด้วยวิธี sequencing

SNPs ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 มี major allele คือ G และ minor allele คือ T (FWD) ตามลำดับ และผลจากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing พบว่า ทั้ง 2 colony มี SNPs ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ที่แตกต่างกันดัง chromatogram ที่แสดง และเมื่อทำการ alignment ด้วย reference sequence ของบริเวณจับของ *TaqMan* probe ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า การทดลองนี้สามารถสร้าง positive control ได้ 2 allele ดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 ผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

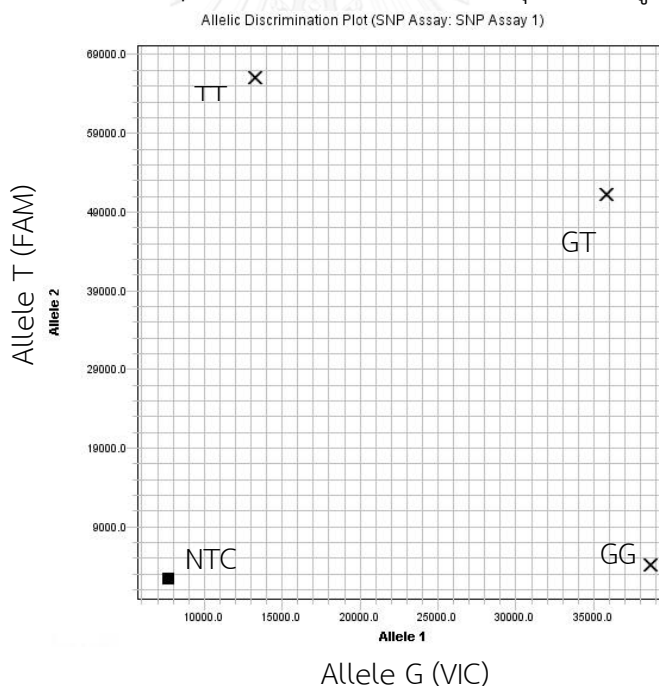
- แสดง Chromatogram ของพลาสมิดที่ T ที่ได้จากการส่ง sequencing และผลจากการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าพลาสมิดนี้เป็น allele T
- แสดง Chromatogram ของพลาสมิดที่ G ที่ได้จากการส่ง sequencing และผลจากการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าพลาสมิดนี้เป็น allele G

3.5 การตรวจสอบ Positive control ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 โดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR

SNPs ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 genotype คือ GG GT และ TT genotype โดยการตรวจสอบบริเวณ SNPs สามารถตรวจวัดโดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR ซึ่งสัญญาณที่ได้เกิดจากการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนต์ของ probe 2 ชนิด (VIC/FAM) ซึ่งในแต่ละ genotype จะมีปริมาณสารฟลูออเรสเซนต์ที่วัดได้แตกต่างกัน คือ

- Genotype GG สามารถวัดปริมาณ VIC fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ FAM fluorescent
- Genotype TT สามารถวัดปริมาณ FAM fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ VIC fluorescent
- Genotype GT สามารถวัดปริมาณ VIC fluorescent ได้ใกล้เคียงกับ FAM fluorescent

ในการตรวจสอบ SNPs ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย ที่ศึกษา จึงทำการทดสอบความถูกต้องของ positive control ที่ได้ด้วย TaqMan Probe Real-time PCR พบว่าสามารถจำแนก positive control ได้เป็น 3 กลุ่มดังผลในรูปที่ 25



รูปที่ 25 Allelic discrimination plot ของ positive control สำหรับการหาจีโนไทป์ ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

หมายเหตุ ปริมาณ VIC fluorescent แสดง allele G; ปริมาณ FAM fluorescent แสดง allele T;

NTC = NoTemplate Control

4. ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้นของพลาสมิดที่ใช้เป็นตัวแปรควบคุมเชิงบวก (positive control) ในหน่วย copies/ μ l

เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดที่ได้ด้วยการส่ง sequencing และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit เทียบกับ reference แล้วพบว่าได้พลาสมิดที่แตกต่างกัน 2 ชนิดต่อการวิเคราะห์ 1 SNP ต่อมาจึงต้องทำการเจือจางความเข้มข้นพลาสมิดของ Positive control ตามวิธีทำในหัวข้อที่ 9 ให้มีความเข้มข้นเป็น 10^6 ng/ μ l (เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาจีโนไทป์ ด้วยวิธี allelic discrimination assay) ซึ่งผลการหาความเข้มข้นแต่ละพลาสมิดแสดงดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ความเข้มข้นของพลาสมิดสำหรับ positive control

SNPs	Allele	ความเข้มข้น (ng/ μ l)	OD _{260/280}	Copies/ μ l
rs738409	C	196.7	1.98	6.23×10^{10}
	G	209.7	1.99	6.64×10^{10}
rs689465	T	173.8	1.90	4.97×10^{10}
	C	239.1	1.95	6.85×10^{10}
rs2785878	T	182.4	2.00	5.56×10^{10}
	G	199.3	1.87	6.07×10^{10}

จากนั้นเจือจางความเข้มข้นที่ได้ ให้เป็น 1×10^{10} copies/ μ l ปริมาตร 10 μ l

$$\text{ใช้สูตร } C_1 V_1 = C_2 V_2$$

- เจือจางพลาสมิดความเข้มข้น 10^{10} เป็น 10^8 โดยดูดสารพลาสมิดความเข้มข้น 10^{10}

จำนวน 1 μ l แล้วใส่ D.W. จำนวน 99 μ l จะได้พลาสมิดที่มีความเข้มข้น 10^8 copies/ μ l

- เจือจางพลาสมิดความเข้มข้น 10^8 เป็น 10^6 โดยดูดสารพลาสมิดความเข้มข้น 10^8 จำนวน

1 μ l แล้วใส่ D.W. จำนวน 99 μ l จะได้พลาสมิดที่มีความเข้มข้น 10^6 copies/ μ l

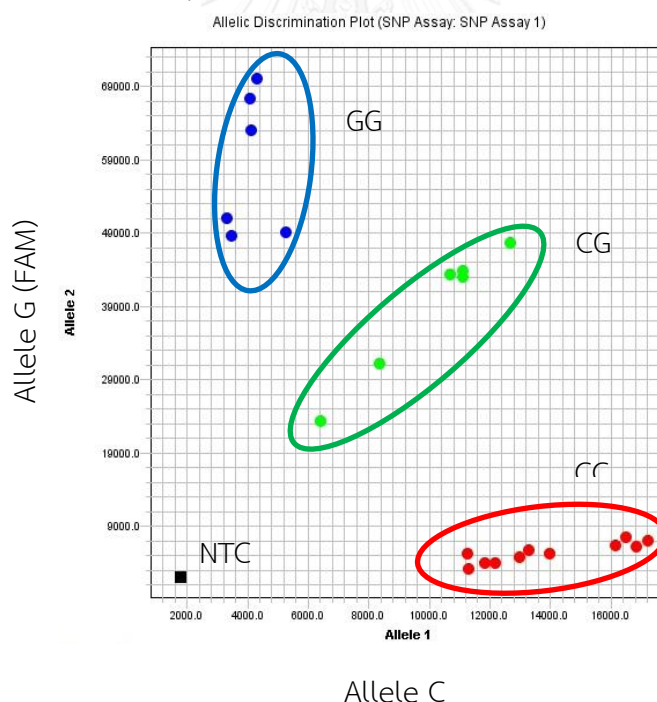
*หมายเหตุ การทำ Positive ของ Genotype ที่เป็น heterozygous โดยนำพลาสมิดของทั้ง 2 allele ที่ความเข้มข้น 10^6 copies/ μ l มาผสมกันอย่างละ 33 μ l

5. การหา genotype ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

ในการศึกษานี้ ใช้ PBMC หรือ Buffy coat จากเลือดของกลุ่มประชากรเป้าหมาย นำมาสกัด DNA แล้วตรวจสอบ genotype ด้วยเทคนิค Allelic discrimination assay โดยใช้ TaqMan Probe Real-time PCR ที่จำเพาะกับบริเวณ SNPs ต่างๆ เพื่อดูการกระจายตัวของจีโนไทป์แต่ละกลุ่มประชากรและหาความสัมพันธ์ของการเกิดโรค

5.1 ตัวอย่างผลการหา genotype ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409

การหา genotype ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ทำได้โดยตรวจวัดปริมาณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น (VIC/FAM) probe และ DNA template ผลที่ได้สามารถแยกออกเป็นกลุ่มตาม genotype โดย CC genotype จะวัด VIC fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ FAM fluorescent ส่วน GG genotype สามารถวัด FAM fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ VIC fluorescent และ CG genotype สามารถวัด VIC fluorescent ได้ใกล้เคียงกับ FAM fluorescent ดังรูปที่ 26

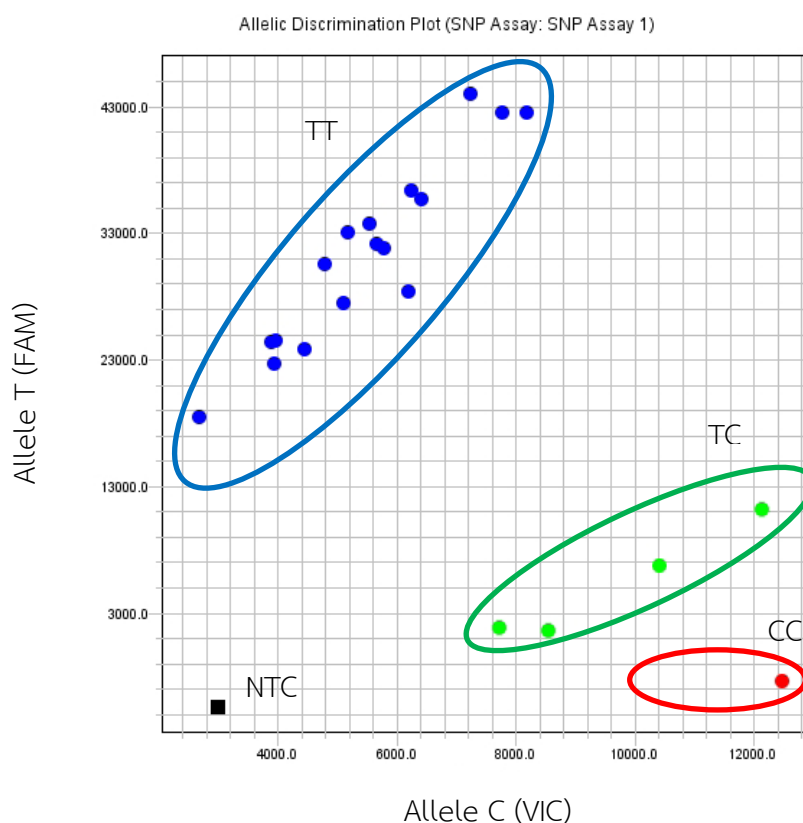


รูปที่ 26 Allelic discrimination plot ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

หมายเหตุ ปริมาณ VIC fluorescent แสดง allele C; ปริมาณ FAM fluorescent แสดง allele G; NTC = No Template Control

5.2 ตัวอย่างผลการหา genotype ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465

การหา genotype ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 ทำได้ด้วยการตรวจวัดปริมาณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น (VIC/FAM) probe และ DNA template ผลที่ได้สามารถแยกออกเป็นกลุ่มตาม genotype โดย TT genotype สามารถวัด FAM fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ VIC fluorescent ส่วน CC genotype สามารถวัด VIC fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ FAM fluorescent และ TC genotype สามารถวัด VIC fluorescent ได้ใกล้เคียงกับ FAM fluorescent ดังรูปที่ 27

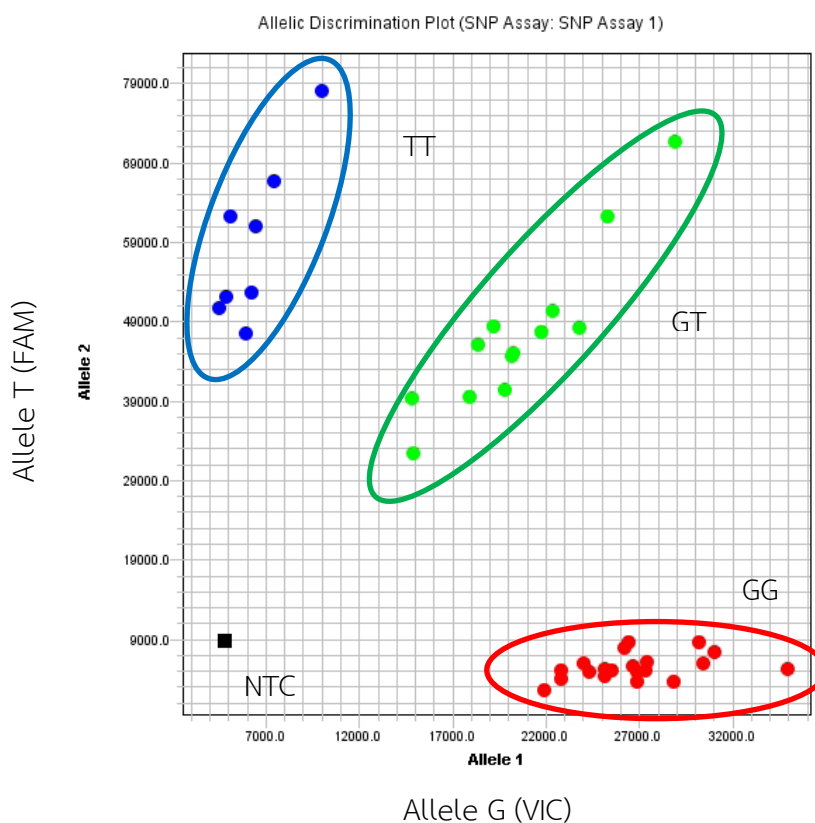


รูปที่ 27 Allelic discrimination plot ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465
ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

หมายเหตุ ปริมาณ VIC fluorescent แสดง allele C; ปริมาณ FAM fluorescent แสดง allele T;
NTC = No Template Control

5.3 ตัวอย่างผลการหา genotype ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

ยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 สามารถตรวจหา genotype ได้ด้วยการตรวจวัดปริมาณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น (VIC/FAM) จากการจับกันของ probe และ DNA template ผลที่ได้สามารถแยกออกเป็นกลุ่มตาม genotype โดย GG genotype จะวัด VIC fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ FAM fluorescent ส่วน TT genotype สามารถวัด FAM fluorescent ได้มากกว่าปริมาณ VIC fluorescent และ GT genotype สามารถวัด VIC fluorescent ได้ใกล้เคียงกับ FAM fluorescent ดังรูปที่ 28



รูปที่ 28 Allelic discrimination plot ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878
ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

หมายเหตุ ปริมาณ VIC fluorescent แสดง allele G; ปริมาณ FAM fluorescent แสดง allele T;
NTC = No Template Control

5.4 ตัวอย่างการบันทึกผลการหา genotype ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ในกลุ่มประชากรเป้าหมาย

ตารางที่ 15 ตัวอย่างการบันทึกผลการทดลองจากประชากรกลุ่มเป้าหมาย

Code	OD _{260/280}	concentration (ng/μl)	<i>PNPLA3</i>	<i>COX-2</i>	<i>DHCR7</i>
			rs738409 C>G	rs689465 C>T	rs12785878 G>T
1	1.81	813.8	CC	TT	GT
2	1.79	210.9	CG	TT	GG
3	1.79	325.1	CG	TT	GT
4	1.67	105.1	CG	TT	TT
5	1.83	635.1	CC	TT	GT
6	1.75	267.7	CG	TT	GT
7	1.82	473.3	CG	TT	GT
8	1.78	417.3	CC	TT	GT
9	1.72	719.8	CG	CC	TT
10	1.62	211	GG	TT	GG
11	1.69	1026.6	CG	TC	GT

ในการสกัด DNA จาก PBMC หรือ Buffy coat ของเลือดกลุ่มประชากรเป้าหมายหลังจากสกัด DNA ได้แล้วต้องวัดความเข้มข้นและคุณภาพของการสกัด DNA โดยอาศัยหลักการ Spectrophotometer จากเครื่อง nanodrop เนื่องจาก DNA สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อช่วงการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (โปรตีนและฟีนอล) ค่า OD_{260/280} ที่ได้ควรอยู่ในช่วง 1.8-2.0 แต่จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ามีบางตัวอย่างที่มีค่า OD_{260/280} ต่ำกว่า 1.8 ซึ่งอาจจะเกิดการปนเปื้อนของโปรตีนและฟีนอลในขั้นตอนของการสกัด DNA ในส่วนของความเข้มข้นของ DNA (ng/μl) ที่สกัดใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณ DNA template ให้อยู่ในช่วง 100-500 ng/μl (ความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน DNA ผลที่ได้จาก allelic discrimination plot จะรวมกลุ่มกันและสามารถจำแนก genotype ได้ง่าย)

6. ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากรเป้าหมายที่ศึกษา

การทดลองการหา genotype ของ SNPs บนยีน *PNPLA3* ยีน *COX-2* และ *DHCR7* ได้กำหนดจำนวนของกลุ่มประชากรที่ศึกษาแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรัง (HCV) จำนวน 200 คน ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (HCV/HIV) จำนวน 200 คน และกลุ่มควบคุมสุขภาพดี (Healthy control) จำนวน 200 คน แต่ในการทดลองนี้ตัวอย่างเลือดบางกลุ่มอาจเก็บไว้นาน หรือสกัด DNA ได้ปริมาณน้อยและคุณภาพจากการสกัดไม่ดี ทำให้ไม่สามารถตรวจหาจีโนไทป์ได้ จึงได้ตัดบางตัวอย่างออก และเนื่องจากตัวอย่างผู้ป่วยกลุ่มติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรังมีจำนวนมาก จึงแบ่งผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวแยกอีกกลุ่มเป็นคือ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและสามารถหายได้เอง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีตัวอย่างกลุ่มประชากรที่ศึกษาสูงสุดในแต่ละกลุ่มแบ่งได้ดังนี้

1. ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรัง จำนวน 250 ราย
2. ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี จำนวน 200 ราย
3. ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีที่สามารถหายได้เอง จำนวน 74 ราย
4. กลุ่มควบคุมสุขภาพดี จำนวน 200 ราย

โดยข้อมูลกลุ่มประชากรที่ศึกษาสามารถวิเคราะห์หาจีโนไทป์ได้ 99.1% ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ SNPs กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับที่รวบรวมได้จะถูกนำมาบันทึก และวิเคราะห์ผล ดังตารางที่ 16

หมายเหตุ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยพยายามคัดเลือกตัวอย่างประชากรที่ศึกษาให้มีอายุ และเพศที่ใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างเลือดต่อจากงานวิจัยอื่นซึ่งมีอยู่จำกัด และในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีร่วมกับไวรัสเอชไอวีส่วนมากเป็นเพศชาย ทำให้ไม่สามารถเทียบอายุและเพศของกลุ่มประชากรที่ศึกษาให้ใกล้เคียงกันได้

ตารางที่ 16 ข้อมูลทางคลินิกของกลุ่มประชากรที่ศึกษาในงานวิจัย

	HCV (n=248)	HCV/HIV (n=199)	HCV clearance (n=74)	Healthy control (n=200)	P-value
Age (years)	42.65±10.35	42.60±7.25	41.23±10.66	47.43±5.19	<0.001 ^{*,†} 0.7298 [‡]
Sex					
Male (%)	175 (70.6%)	178 (89.4%)	41 (55.4%)	111 (55.5%)	<0.002 ^{*,†}
Female (%)	73 (29.4%)	21 (10.6%)	33 (44.6%)	89 (44.5%)	0.012 [‡]
Fibrosis stage					
F0-F1 = mild	118 (47.6%)	59 (29.6%)	ND	ND	
F2 = moderate	48 (19.4%)	38 (19.1%)	ND	ND	
F3 = severe	39 (15.7%)	48 (24.1%)	ND	ND	
F4 = cirrhosis	43 (17.3%)	54 (27.2%)	ND	ND	
Median±SD	7.40±8.26	9.90±10.46	ND	ND	0.0003

HCV, Hepatitis C virus; HIV, Human immunodeficiency virus;

HCV clearance, Hepatitis C virus spontaneous clearance; ND, No Data

Fibrosis stage cutoff; F0-F1<7.1, F2<9.5, F3<14.5 and F4>14.5 kPa

* เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม HCV และกลุ่ม Healthy control

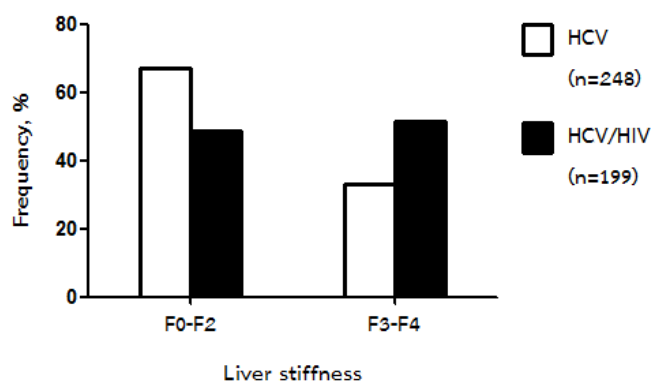
† เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม HCV/HIV และกลุ่ม Healthy control

‡ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม HCV + HCV clearance และกลุ่ม HCV/HIV

จากลักษณะทางคลินิกของกลุ่มประชากรที่ศึกษาดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่า อายุเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมสุขภาพดีสูงกว่าอายุเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยประมาณ 5-6 ปี และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอายุ โดยใช้ค่า P-value ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากสถิติ Student's t test จากโปรแกรม Graphpad Software พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยมีอายุเฉลี่ยที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมสุขภาพดี ในขณะที่เมื่อเทียบระหว่างในกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 3 กลุ่มด้วยกันพบว่า อายุเฉลี่ยของ 3 กลุ่มไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$)

นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรที่ศึกษาเป็นเพศชายมากที่สุดที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี จำนวน 178 จาก 199 ราย คิดเป็น 89.4% ในประชากรกลุ่มอื่น และพบน้อยสุดในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่หายได้เอง และกลุ่มควบคุมสุขภาพดี ประมาณ 55.4-55.5% ในทางตรงกันข้ามเมื่อพิจารณาประชากรเพศหญิงพบว่าพบจำนวนสูงสุดที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่หายได้เอง และกลุ่มควบคุมสุขภาพดี ประมาณ 44.5-44.6% และพบน้อยสุดที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี จำนวน 21 จาก 199 ราย คิดเป็น 10.6% เมื่อเทียบความแตกต่างของเพศในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่าในกลุ่มประชากรที่ศึกษาทั้งหมดมีความแตกต่างของเพศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$)

เมื่อพิจารณาระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับของผู้ป่วยกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี พบว่ามีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม (HCV: $HCV/HIV = 7.40 \pm 8.26: 9.90 \pm 10.46$ kPa, $P = 0.003$) จำนวนผู้ป่วยกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีระยะการเกิดพังผืดในระดับ F0-F1 จำนวน 118 ราย จาก 248 ราย คิดเป็นร้อยละ 47.6 ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีพบผู้ป่วยจำนวนสูงสุดในระยะ F0-F1 จำนวน 59 ราย จาก 199 ราย คิดเป็นร้อยละ 29.6 และระยะ F4 จำนวน 54 ราย จาก 199 ราย คิดเป็นร้อยละ 27.2 ตามลำดับ และเมื่อแบ่งระดับความรุนแรงเป็นการเกิดพังผืดเป็นระดับน้อย-ปานกลาง (Mild-Moderate, F0-F2) และระดับรุนแรง (Advance fibrosis; severe-cirrhosis, F3-F4) พบว่าแนวโน้มของระดับความรุนแรงของพังผืดในตับระดับ F0-F2 พบมากในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง คิดเป็นร้อยละ 67.0 ในขณะที่ระดับความรุนแรงของพังผืดในตับระดับ F3-F4 พบมากในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี คิดเป็นร้อยละ 51.3 ดังรูปที่ 29



รูปที่ 29 จำนวนผู้ป่วย HCV และ HCV/HIV แบ่งตามระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ

7. การกระจายตัวของ genotype ใน Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)

กฎฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (The Hardy-Weinberg principle) กล่าวว่า ในประชากรที่ปราศจากกระบวนการที่จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งได้แก่ การกลายพันธุ์ (mutation) การอพยพ (migration) การผกผันทางพันธุกรรม (genetic drift) และการคัดเลือก (selection) ค่าความถี่ของอัลลีลจะยังคงเหมือนเดิม ไม่ว่าจะถ่ายทอดไปกี่รุ่นก็ตาม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดสอบการกระจายตัวของจีโนไทป์ในแต่ละ SNPs เพื่อทดสอบว่า ไม่มีความเบี่ยงเบนที่ทำให้การกระจายตัวในแต่ละจีโนไทป์เปลี่ยนแปลงไป ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 การกระจายตัวของจีโนไทป์ของแต่ละ SNPs บนยีน *PNPLA3*, *COX-2* และ *DHCR7* ในประชากรที่ศึกษาโดยใช้หลักการของ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)

SNPs	Genotype	ค่า observed	ค่า Expected	P-value
<i>PNPLA3</i> rs738409	CC	350	347.01	0.599
	CG	299	304.98	
	GG	70	67.01	
<i>COX-2</i> rs689465	TT	496	481.53	0.058
	TC	160	168.93	
	CC	33	28.53	
<i>DHCR7</i> rs12785878	TT	55	54.17	0.875
	GT	280	281.67	
	GG	367	366.17	

สถิติที่ใช้คือ Pearson's goodness-of-fit chi-square (degree of freedom = 1) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โปรแกรมจาก <http://ihg.gsf.de/ihg/snps.html>

จากการวิเคราะห์ผลการกระจายตัวของจีโนไทป์ของ SNPs บนยีน *PNPLA3*, *COX-2* และ *DHCR7* พบว่า มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ ตามค่า observed และค่า expected เป็นไปตามสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก แสดงให้เห็นว่ากลุ่มตัวอย่างของประชากรที่ศึกษาไม่มีการเบี่ยงเบนการถ่ายทอดจีโนไทป์ เป็นกลุ่มประชากรศึกษาที่ดี มีความน่าเชื่อถือของข้อมูล และสามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ในลักษณะต่างๆได้

8. ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNPs ต่างๆ ในกลุ่มประชากรที่ศึกษา เทียบกับกลุ่มควบคุม

8.1 *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409

การจำแนกจีโนไทป์ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 สามารถแบ่งได้ 3 จีโนไทป์ คือ CC, CG และ GG โดยในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 248 ราย มีความถี่จีโนไทป์เป็น 132 (53.2%), 100 (40.3%) และ 16 (6.5%) ตามลำดับ กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี จำนวน 199 ราย มีความถี่จีโนไทป์เป็น 101 (50.8%), 78 (39.2%) และ 20 (10.0%) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและหายได้เอง จำนวน 72 ราย มีความถี่จีโนไทป์เป็น 26 (36.1%), 33 (45.8%) และ 13 (18.1%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมสุขภาพดี จำนวน 200 ราย มีความถี่จีโนไทป์เป็น 91 (45.5%), 88 (44.0%) และ 21 (10.5%) ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาแยกตามความถี่อัลลีล C (Major) และ อัลลีล G (Minor) พบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง มีความถี่อัลลีลเป็น 364 (73.4%) และ 132 (26.6%) ตามลำดับ กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี มีความถี่อัลลีลเป็น 280 (70.4%) และ 118 (29.6%) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองมีความถี่อัลลีลเป็น 85 (59.0%) และ 59 (41.0%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมสุขภาพดี มีความถี่อัลลีลเป็น 270 (67.5%) และ 130 (32.5%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 18

การหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ายีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ไม่พบความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี ($P>0.05$) แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง พบว่า จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์ในลักษณะลดความเสี่ยงของการติดเชื้อ HCV และ HCV/HIV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากร
ที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม

Genotype	HCV n=248	HCV/HIV n=199	HCV clearance n=72	Control n=200	HCV vs Control		HCV/HIV vs Control		HCV vs HCV clearance		HCV/HIV vs HCV clearance	
					OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value
CC	132 (53.2%)	101 (50.8%)	26 (36.1%)	91 (45.5%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
CG	100 (40.3%)	78 (39.2%)	33 (45.8%)	88 (44.0%)	0.78 (0.52-1.16)	0.2218	0.79 (0.52-1.21)	0.2895	0.59 (0.33-1.06)	0.0791	0.61 (0.34-1.10)	0.1005
GG	16 (6.5%)	20 (10.0%)	13 (18.1%)	21 (10.5%)	0.53 (0.26-1.06)	0.0727	0.86 (0.43-1.68)	0.6566	0.24 (0.10-0.56)	0.0010*	0.39 (0.17-0.89)	0.0269*
Alleles												
Major (C)	364 (73.4%)	280 (70.4%)	85 (59.0%)	270 (67.5%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Minor (G)	132 (26.6%)	118 (29.6%)	59 (41.0%)	130 (32.5%)	0.75 (0.56-1.01)	0.0544	0.87 (0.64-1.18)	0.3843	0.52 (0.35-0.76)	0.0010*	0.60 (0.41-0.90)	0.0135*

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HCV, Hepatitis C virus; HIV, Human immunodeficiency virus

rs738409 alleles are reported in reverse orientation to genome.

*P-value<0.05, between two groups in *PNPLA3* rs738409 genotypes or alleles by chi-square test

8.2 COX-2 ตำแหน่ง rs689465

จากตารางที่ 19 แสดงการวิเคราะห์การกระจายตัวจีโนไทป์ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 พบว่าสามารถจำแนกได้ 3 จีโนไทป์ คือ TT, TC และ CC ตามลำดับ ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 218 ราย พบความถี่จีโนไทป์เป็น 171 (78.5%), 43 (19.7%) และ 4 (1.8%) ตามลำดับ กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี จำนวน 199 ราย พบความถี่จีโนไทป์เป็น 152 (76.4%), 42 (21.1%) และ 5 (2.5%) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง จำนวน 74 ราย พบความถี่จีโนไทป์เป็น 59 (79.7%), 11 (14.9%) และ 4 (5.4%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมสุขภาพดี จำนวน 198 ราย พบความถี่จีโนไทป์เป็น 114 (57.6%), 64 (32.3%) และ 20 (10.1%) ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาแยกตามความถี่อัลลีล T (Major) และ อัลลีล C (Minor) พบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง มีความถี่อัลลีลเป็น 385 (88.3%) และ 51 (11.7%) ตามลำดับ กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี มีความถี่อัลลีลเป็น 346 (86.9%) และ 52 (13.1%) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง มีความถี่อัลลีลเป็น 129 (87.2%) และ 19 (12.8%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมสุขภาพดี มีความถี่อัลลีลเป็น 292 (73.7%) และ 104 (26.3%) ตามลำดับ

การหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าจีโนไทป์ TC และ CC ของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 มีความสัมพันธ์ในลักษณะลดความเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ OR (95%CI) เท่ากับ 0.45 (0.28-0.70), $P=0.0005$ และ OR (95%CI) เท่ากับ 0.13 (0.04-0.40), $P=0.0003$ ตามลำดับ อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์ในลักษณะลดความเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี OR (95%CI) เท่ากับ 0.49 (0.31-0.78), $P=0.0025$ สำหรับจีโนไทป์ TC และ OR (95%CI) เท่ากับ 0.19 (0.07-0.51), $P=0.0012$ สำหรับจีโนไทป์ CC เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองพบว่า การกระจายของจีโนไทป์ไม่มีความสัมพันธ์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและหายได้เอง ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม

Genotype	HCV n=218	HCV/HIV n=199	HCV clearance n=74	Control n=198	HCV vs Control		HCV/HIV vs Control		HCV vs HCV clearance		HCV/HIV vs HCV clearance	
					OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value
TT	171 (78.5%)	152 (76.4%)	59 (79.7%)	114 (57.6%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
TC	43 (19.7%)	42 (21.1%)	11 (14.9%)	64 (32.3%)	0.45 (0.28-0.70)	0.0005*	0.49 (0.31-0.78)	0.0025*	1.35 (0.65-2.78)	0.4189	1.48 (0.71-3.07)	0.2900
CC	4 (1.8%)	5 (2.5%)	4 (5.4%)	20 (10.1%)	0.13 (0.04-0.40)	0.0003*	0.19 (0.07-0.51)	0.0012*	0.34 (0.08-1.42)	0.1411	0.49 (0.12-1.86)	0.2933
Alleles												
Major (T)	385 (88.3%)	346 (86.9%)	129 (87.2%)	292 (73.7%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Minor (C)	51 (11.7%)	52 (13.1%)	19 (12.8%)	104 (26.3%)	0.37 (0.25-0.53)	<0.0001*	0.42 (0.29-0.60)	<0.0001*	0.89 (0.51-1.58)	0.7121	1.02 (0.58-1.79)	0.944

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HCV, Hepatitis C virus; HIV, Human immunodeficiency virus

rs689465 alleles are reported in reverse orientation to genome.

*P-value<0.05, between two groups in COX-2 rs689465 genotypes or alleles by chi-square test

8.3 DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878

ผลการวิเคราะห์ยีน DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878 พบว่า มีการกระจายตัวจีโนไทป์โดยสามารถจำแนกได้ 3 จีโนไทป์ คือ TT, GT และ GG ตามลำดับ ในกลุ่มประชากรที่ศึกษาพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 231 ราย พบความถี่จีโนไทป์เป็น 13 (5.6%), 89 (38.5%) และ 129 (55.9%) ตามลำดับ กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี จำนวน 199 ราย พบความถี่จีโนไทป์เป็น 7 (3.5%), 78 (39.2%) และ 114 (57.3%) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง จำนวน 74 ราย พบความถี่จีโนไทป์เป็น 11 (14.9%), 30 (40.5%) และ 33 (44.6%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมสุขภาพดี จำนวน 198 ราย พบความถี่จีโนไทป์เป็น 24 (12.1%), 83 (41.9%) และ 91 (46.0%) ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาแยกตามความถี่อัลลีล T (Minor) และ อัลลีล G (Major) พบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง มีความถี่อัลลีลเป็น 115 (24.9%) และ 347 (75.1%) ตามลำดับ กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีมีความถี่อัลลีลเป็น 92 (23.1%) และ 306 (76.9%) ตามลำดับ ส่วนกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เอง มีความถี่อัลลีลเป็น 52 (35.1%) และ 96 (64.9%) ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมสุขภาพดี มีความถี่อัลลีลเป็น 131 (33.1%) และ 265 (66.9%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 20

การหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าจีโนไทป์ GG ของยีน DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878 มีความสัมพันธ์ในลักษณะเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ OR (95%CI) เท่ากับ 2.62 (1.27-5.41), $P=0.0094$ อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์ในลักษณะเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี OR (95%CI) เท่ากับ 3.22 (1.31-7.90), $P=0.0106$ สำหรับจีโนไทป์ GT และ OR (95%CI) เท่ากับ 4.29 (1.77-10.42), $P=0.0013$ สำหรับจีโนไทป์ GG ในขณะเดียวกันพิจารณาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองเอง พบว่าการกระจายของจีโนไทป์ความสัมพันธ์ในลักษณะเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อ HCV และ HCV/HIV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 และความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่ม

ประชากรที่ศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม

Genotype	HCV n=231 (5.6%)	HCV/HIV n=199 (3.5%)	HCV clearance n=74 (14.9%)	Control n=198 (12.1%)	HCV vs Control		HCV/HIV vs Control		HCV vs HCV clearance		HCV/HIV vs HCV clearance	
					OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value	OR (95%CI)	P-value
TT	13 (5.6%)	7 (3.5%)	11 (14.9%)	24 (12.1%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
TG	89 (38.5%)	78 (39.2%)	30 (40.5%)	83 (41.9%)	1.98 (0.95-4.14)	0.0698	3.22 (1.31-7.90)	0.0106*	2.51 (1.02-6.94)	0.0458*	4.09 (1.45-11.52)	0.0078*
GG	129 (55.9%)	114 (57.3%)	33 (44.6%)	91 (46.0%)	2.62 (1.27-5.41)	0.0094*	4.29 (1.77-10.4)	0.0013*	3.30 (1.36-8.05)	0.0084*	5.42 (1.95-15.11)	0.0012*
Alleles												
Minor (T)	115 (24.9%)	92 (23.1%)	52 (35.1%)	131 (33.1%)	1.00	-	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Major (G)	347 (75.1%)	306 (76.9%)	96 (64.9%)	265 (66.9%)	1.49 (1.11-2.01)	0.0084*	1.64 (1.20-2.25)	0.0018*	1.63 (1.10-2.43)	0.0155*	1.80 (1.19-2.71)	0.0049*

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HCV, Hepatitis C virus; HIV, Human immunodeficiency virus

rs12785878 alleles are reported in forward orientation to genome.

*P-value<0.05, between two groups in *DHCR7* rs12785878 genotypes or alleles by chi-square test

9. ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNPs ต่างๆ กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ

เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนต่างๆกับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ แบ่งระดับความรุนแรงของพังผืดเป็น 2 กลุ่มได้แก่ ระดับน้อย-ปานกลาง (Mild-Moderate, F0-F2) และระดับรุนแรง (Advance fibrosis; severe-cirrhosis, F3-F4) โดยมีค่าการแบ่งระดับความรุนแรงที่ 9.5 kPa

9.1 *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409

จากตารางที่ 21 พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 248 ราย จำแนกตามจีโนไทป์ได้ CC จำนวน 132 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 91 ราย คิดเป็นร้อยละ 68.9 และ F3-F4 จำนวน 41 ราย คิดเป็นร้อยละ 31.1 จีโนไทป์ CG จำนวน 100 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 66 ราย คิดเป็นร้อยละ 66.0 และ F3-F4 จำนวน 34 ราย คิดเป็นร้อยละ 34.0 และจีโนไทป์ GG จำนวน 16 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 56.3 และ F3-F4 จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 43.7 จากผลการทดลองพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมกับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ (Chi-square=1.104, $P>0.05$)

และเมื่อเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน \pm ความแปรปรวน (Median \pm SD) ของความรุนแรงของพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ พบว่ากลุ่มจีโนไทป์ CC มีค่าเท่ากับ 7.60 ± 7.57 kPa, จีโนไทป์ CG มีค่าเท่ากับ 7.00 ± 9.17 kPa และจีโนไทป์ GG มีค่าเท่ากับ 7.85 ± 8.21 kPa ซึ่งผลที่ได้พบว่า ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในแต่ละจีโนไทป์ ($P>0.05$)

ตารางที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* (rs738409) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

HCV (n=248)	CC (n=132)	CG (n=100)	GG (n=16)	chi-square	P-value
F0-F2	91 (68.9%)	66 (66.0%)	9 (56.3%)	1.104	0.576
F3-F4	41 (31.1%)	34 (34.0%)	7 (43.7%)		
liver stiffness	7.60\pm7.57	7.00\pm9.17	7.85\pm8.21		0.677

Liver stiffness presented in Median \pm SD; * P -value $<$ 0.05, between three groups in *PNPLA3* (rs738409) genotypes by chi-square test; Fibrosis cutoff; F0-F1 $<$ 7.1, F2 $<$ 9.5, F3 $<$ 14.5 and F4 $>$ 14.5 kPa

ขณะเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี จำนวน 199 ราย พบว่าสามารถจำแนกตามจีโนไทป์ได้ CC จำนวน 101 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 53 ราย คิดเป็น 52.5% และ F3-F4 จำนวน 48 ราย คิดเป็น 47.5% จีโนไทป์ CG จำนวน 78 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 36 ราย คิดเป็น 46.2% และ F3-F4 จำนวน 42 ราย คิดเป็น 53.8% และจีโนไทป์ GG จำนวน 20 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 7 ราย คิดเป็น 35.0% และ F3-F4 จำนวน 13 ราย คิดเป็น 65.0% จากผลการทดลองพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมกับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ (Chi-square=2.266, $P>0.05$)

และเมื่อเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน \pm ความแปรปรวน (Median \pm SD) ของความรุนแรงของพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ พบว่ากลุ่มจีโนไทป์ CC มีค่าเท่ากับ 9.10 ± 11.76 kPa, จีโนไทป์ CG มีค่าเท่ากับ 10.10 ± 8.70 kPa และจีโนไทป์ GG มีค่าเท่ากับ 13.40 ± 10.12 kPa ซึ่งผลที่ได้พบว่า ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในแต่ละจีโนไทป์ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* (rs738409) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี

HCV/HIV (n=199)	CC (n=101)	CG (n=78)	GG (n=20)	chi-square	P-value
F0-F2	53 (52.5%)	36 (46.2%)	7 (35.0%)	2.266	0.322
F3-F4	48 (47.5%)	42 (53.8%)	13 (65.0%)		
liver stiffness	9.10\pm11.76	10.10\pm8.70	13.40\pm10.12		0.616

Liver stiffness presented in Median \pm SD; * P -value <0.05 , between three groups in *PNPLA3* (rs738409) genotypes by chi-square test; Fibrosis cutoff; F0-F1 <7.1 , F2 <9.5 , F3 <14.5 and F4 >14.5 kPa

9.2 COX-2 ตำแหน่ง rs689465

ผลการทดลองจากตารางที่ 23 พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 218 ราย จำแนกตามจีโนไทป์ได้ TT จำนวน 171 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 118 ราย คิดเป็น 69.0% และ F3-F4 จำนวน 53 ราย คิดเป็น 31.0% จีโนไทป์ TC จำนวน 43 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 30 ราย คิดเป็น 69.8% และ F3-F4 จำนวน 13 ราย คิดเป็น 30.2% และจีโนไทป์ CC จำนวน 4 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 1 ราย คิดเป็น 25.0% และ F3-F4 จำนวน 3 ราย คิดเป็น 75.0% จากผลการทดลองพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมกับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ (Chi-square=3.549, $P>0.05$)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน \pm ความแปรปรวน (Median \pm SD) ของความรุนแรงของพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ พบว่ากลุ่มจีโนไทป์ TT มีค่าเท่ากับ 7.40 \pm 8.36 kPa, จีโนไทป์ TC มีค่าเท่ากับ 6.80 \pm 8.22 kPa และจีโนไทป์ CC มีค่าเท่ากับ 11.20 \pm 18.96 kPa ซึ่งผลที่ได้พบว่า ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในแต่ละจีโนไทป์ ($P>0.05$)

ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COX-2 (rs689465) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

HCV (n=218)	TT (n=171)	TC (n=43)	CC (n=4)	chi-square	P-value
F0-F2	118 (69.0%)	30 (69.8%)	1 (25.0%)	3.549	0.170
F3-F4	53 (31.0%)	13 (30.2%)	3 (75.0%)		
liver stiffness	7.40 \pm 8.36	6.80 \pm 8.22	11.20 \pm 18.96		0.081

Liver stiffness presented in Median \pm SD; * P -value $<$ 0.05, between three groups in COX-2 (rs689465) genotypes by chi-square test; Fibrosis cutoff; F0-F1 $<$ 7.1, F2 $<$ 9.5, F3 $<$ 14.5 and F4 $>$ 14.5 kPa

ขณะเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี จำนวน 199 ราย พบว่าสามารถจำแนกตามจีโนไทป์ได้ TT จำนวน 152 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 72 ราย คิดเป็น 47.4% และ F3-F4 จำนวน 80 ราย คิดเป็น 52.6% จีโนไทป์ TC จำนวน 42 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 24 ราย คิดเป็น 57.1% และ F3-F4 จำนวน 18 ราย คิดเป็น 42.9% และจีโนไทป์ CC จำนวน 5 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 1 ราย คิดเป็น 20.0% และ F3-F4 จำนวน 4 ราย คิดเป็น 80.0% เมื่อหาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมกับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ (Chi-square=2.954, $P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 24

และจากตารางที่ 23 แสดงค่ามัธยฐาน \pm ความแปรปรวน (Median \pm SD) ของความรุนแรงของพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ พบว่ากลุ่มจีโนไทป์ TT มีค่าเท่ากับ 10.00 \pm 10.84 kPa, จีโนไทป์ TC มีค่าเท่ากับ 8.50 \pm 9.04 kPa และจีโนไทป์ CC มีค่าเท่ากับ 17.30 \pm 10.76 kPa อีกทั้งยังพบว่า ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในแต่ละจีโนไทป์ ($P>0.05$)

ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COX-2 (rs689465) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี

HCV/HIV (n=199)	TT (n=152)	TC (n=42)	CC (n=5)	chi-square	P-value
F0-F2	72 (47.4%)	24 (57.1%)	1 (20.0%)	2.954	0.228
F3-F4	80 (52.6%)	18 (42.9%)	4 (80.0%)		
liver stiffness	10.00 \pm 10.84	8.50 \pm 9.04	17.30 \pm 10.76		0.365

Liver stiffness presented in Median \pm SD; * P -value $<$ 0.05, between three groups in COX-2 (rs689465) genotypes by chi-square test; Fibrosis cutoff; F0-F1 $<$ 7.1, F2 $<$ 9.5, F3 $<$ 14.5 and F4 $>$ 14.5 kPa

9.3 DHCR7 ตำแหน่ง rs12785878

การหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมกับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จำนวน 231 ราย จำแนกตามจีโนไทป์ได้ TT จำนวน 13 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 11 ราย คิดเป็น 84.6% และ F3-F4 จำนวน 2 ราย คิดเป็น 15.4% จีโนไทป์ GT จำนวน 89 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 51 ราย คิดเป็น 57.3% และ F3-F4 จำนวน 38 ราย คิดเป็น 42.7% และจีโนไทป์ GG จำนวน 129 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 95 ราย คิดเป็น 73.6% และ F3-F4 จำนวน 34 ราย คิดเป็น 26.4% จากผลการทดลองพบว่าความแตกต่างของความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์และส่งผลต่อระดับความรุนแรงของพังผืดในตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Chi-square=8.212, $P=0.016$)

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่ามัธยฐาน \pm ความแปรปรวน (Median \pm SD) ของความรุนแรงของพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ พบว่ากลุ่มจีโนไทป์ TT มีค่าเท่ากับ 7.80 \pm 5.84 kPa, จีโนไทป์ GT มีค่าเท่ากับ 8.40 \pm 8.93 kPa และจีโนไทป์ GG มีค่าเท่ากับ 6.70 \pm 8.25 kPa ซึ่งผลที่ได้พบว่า ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในแต่ละจีโนไทป์ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน DHCR7 (rs12785878) กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

HCV (n=231)	TT (n=13)	GT (n=89)	GG (n=129)	chi-square	P-value
F0-F2	11 (84.6%)	51 (57.3%)	95 (73.6%)	8.212	0.016*
F3-F4	2 (15.4%)	38 (42.7%)	34 (26.4%)		
liver stiffness	7.80 \pm 5.84	8.40 \pm 8.93	6.70 \pm 8.25		0.116

Liver stiffness presented in Median \pm SD; * P -value $<$ 0.05, between three groups in DHCR7 (rs12785878) genotypes by chi-square test; Fibrosis cutoff; F0-F1 $<$ 7.1, F2 $<$ 9.5, F3 $<$ 14.5 and F4 $>$ 14.5 kPa

เมื่อพิจารณาในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี จำนวน 199 ราย พบว่าสามารถจำแนกตามจีโนไทป์ได้ TT จำนวน 7 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 3 ราย คิดเป็น 42.9% และ F3-F4 จำนวน 4 ราย คิดเป็น 57.1% จีโนไทป์ GT จำนวน 78 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 41 ราย คิดเป็น 52.6% และ F3-F4 จำนวน 37 ราย คิดเป็น 47.4% และจีโนไทป์ GG จำนวน 114 ราย มีระดับความรุนแรงของพังผืดที่ F0-F2 จำนวน 53 ราย คิดเป็น 46.5% และ F3-F4 จำนวน 61 ราย คิดเป็น 53.5% เมื่อหาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมกับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ (Chi-square=0.784, $P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 26

เมื่อวิเคราะห์หาค่ามัธยฐาน \pm ความแปรปรวน (Median \pm SD) ของความรุนแรงของพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ พบว่ากลุ่มจีโนไทป์ TT มีค่าเท่ากับ 9.60 \pm 3.54 kPa, จีโนไทป์ GT มีค่าเท่ากับ 9.05 \pm 11.49 kPa และจีโนไทป์ GG มีค่าเท่ากับ 9.05 \pm 11.49 kPa อีกทั้งยังพบว่า ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในแต่ละจีโนไทป์ ($P>0.05$)

ตารางที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *DHCR7* (rs12785878)

กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี

HCV/HIV (n=199)	TT (n=7)	GT (n=78)	GG (n=114)	chi-square	P-value
F0-F2	3 (42.9%)	41 (52.6%)	53 (46.5%)	0.784	0.676
F3-F4	4 (57.1%)	37 (47.4%)	61 (53.5%)		
liver stiffness	9.60 \pm 3.54	9.05 \pm 11.49	9.05 \pm 11.49		0.571

Liver stiffness presented in Median \pm SD; * P -value $<$ 0.05, between three groups in *DHCR7* (rs12785878) genotypes by chi-square test; Fibrosis cutoff; F0-F1 $<$ 7.1, F2 $<$ 9.5, F3 $<$ 14.5 and F4 $>$ 14.5 kPa

9.4 ระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ จำแนกตาม HCV genotype

การหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมกับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในโดยแบ่งตามจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี พบว่ากลุ่มผู้ป่วยสามารถจำแนกได้ 3 จีโนไทป์ ได้แก่ จีโนไทป์ 1, 3 และ 6 ตามลักษณะการกระจายตัวของจีโนไทป์ในประเทศไทย

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* (rs738409), *COX-2* (rs689465) และ *DHCR7* (rs12785878) ต่อระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง พบว่าทั้ง 3 จีโนไทป์ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไม่มีความแตกต่างของระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ ($P>0.05$) แต่ขณะเดียวกัน พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *DHCR7* (rs12785878) ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 3 มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการเกิดพังผืดในตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.009$) ตามตารางที่ 27

ขณะที่ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนต่างๆ ต่อระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี พบว่า ไม่มีความแตกต่างของระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ ($P>0.05$) ในแต่ละจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่พบว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *COX-2* (rs689465) ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 3 มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการเกิดพังผืดในตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.047$) ตามตารางที่ 28

ตารางที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

HCV Genotype	SNP Genotype	Fibrosis stage		chi-square	P-value	liver stiffness (Median±SD)	P-value
		F0-F2	F3-F4				
rs738409							
G1 (n=86)	CC (n=51)	38 (74.5%)	13 (25.5%)	0.364	0.546	7.00±6.80	0.271
	non-CC (n=35)	24 (68.6%)	11 (31.4%)			6.60±10.19	
G3 (n=113)	CC (n=56)	32 (57.1%)	24 (42.9%)	0.012	0.914	8.25±8.70	0.673
	non-CC (n=57)	32 (56.1%)	25 (43.9%)			8.40±6.94	
G6 (n=49)	CC (n=25)	21 (84.0%)	4 (16.0%)	0.191	0.662	6.80±5.57	0.399
	non-CC (n=24)	19 (79.2%)	5 (20.8%)			6.20±11.56	
rs689465							
G1 (n=78)	TT (n=63)	48 (76.2%)	15 (23.8%)	1.614	0.204	6.50±7.96	0.276
	non-TT (n=15)	9 (60.0%)	6 (40.0%)			7.20±11.53	
G3 (n=100)	TT (n=78)	45 (57.7%)	33 (42.3%)	0.014	0.907	8.35±7.57	0.703
	non-TT (n=22)	13 (59.1%)	9 (40.9%)			8.25±8.16	
G6 (n=40)	TT (n=30)	25 (83.3%)	5 (16.7%)	0.261	0.609	6.55±10.78	0.353
	non-TT (n=10)	9 (90.0%)	1 (10.0%)			6.00±2.00	
rs12785878							
G1 (n=82)	GG (n=45)	34 (75.6%)	11 (24.4%)	0.642	0.423	5.40±10.22	0.912
	NON-GG (n=37)	25 (67.6%)	12 (32.4%)			7.70±6.05	
G3 (n=106)	GG (n=59)	39 (66.1%)	20 (33.9%)	3.175	0.075	7.00±5.22	0.009*
	NON-GG (n=47)	23 (48.9%)	24 (51.1%)			10.00±10.12	
G6 (n=43)	GG (n=25)	22 (88.0%)	3 (12.0%)	0.802	0.370	6.00±10.20	0.716
	NON-GG (n=18)	14 (77.8%)	4 (22.2%)			6.25±8.07	

Liver stiffness presented in Median±SD; *P-value<0.05, between two groups in *PNPLA3* (rs738409), *COX-2*

(rs689465) and *DHCR7* (rs12785878) genotypes by chi-square test; Fibrosis cutoff; F0-F1<7.1, F2<9.5, F3<14.5 and F4>14.5 kPa

ตารางที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับจำแนกตามจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี

HCV Genotype	SNP Genotype	Fibrosis stage		chi-square	P-value	liver stiffness (Median±SD)	P-value
		F0-F2	F3-F4				
rs738409							
G1 (n=85)	CC (n=43)	22 (51.2%)	21 (48.8%)	0.977	0.323	9.10±12.06	0.758
	non-CC (n=42)	17 (40.5%)	25 (59.5%)			11.25±10.45	
G3 (n=82)	CC (n=42)	23 (54.8%)	19 (45.2%)	1.790	0.194	8.85±8.89	0.578
	non-CC (n=40)	16 (40.0%)	24 (60.0%)			10.65±8.01	
G6 (n=32)	CC (n=16)	8 (50.0%)	8 (50.0%)	0.508	0.476	10.00±16.62	0.252
	non-CC (n=16)	10 (62.5%)	6 (37.5%)			8.70±7.09	
rs689465							
G1 (n=86)	TT (n=71)	32 (45.1%)	39 (54.9%)	0.340	0.560	10.10±11.75	0.407
	non-TT (n=15)	8 (53.3%)	7 (46.7%)			8.40±8.21	
G3 (n=81)	TT (n=57)	28 (49.1%)	29 (50.9%)	0.073	0.787	9.60±7.08	0.047*
	non-TT (n=24)	11 (45.8%)	13 (54.2%)			10.85±10.79	
G6 (n=32)	TT (n=24)	12 (50.0%)	12 (50.0%)	1.524	0.217	9.60±14.32	0.216
	non-TT (n=8)	6 (75.0%)	2 (25.0%)			7.85±4.56	
rs12785878							
G1 (n=86)	GG (n=49)	24 (49.0%)	25 (51.0%)	0.279	0.597	9.50±10.78	0.707
	NON-GG (n=37)	16 (43.2%)	21 (56.8%)			11.00±11.90	
G3 (n=81)	GG (n=45)	20 (44.4%)	25 (55.6%)	0.556	0.456	10.50±9.32	0.210
	NON-GG (n=36)	19 (52.8%)	17 (47.2%)			8.85±7.25	
G6 (n=32)	GG (n=20)	9 (45.0%)	11 (55.0%)	2.743	0.098	10.50±10.19	0.979
	NON-GG (n=12)	9 (75.0%)	3 (25.0%)			8.85±16.92	

Liver stiffness presented in Median±SD; *P-value<0.05, between two groups in *PNPLA3* (rs738409), *COX-2*

(rs689465) and *DHCR7* (rs12785878) genotypes by chi-square test; Fibrosis cutoff; F0-F1<7.1, F2<9.5, F3<14.5 and F4>14.5 kPa

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409

ยีน *PNPLA3* หรือ Patatin-Like Phospholipase Domain containing Protein 3 เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 22q13 พบได้มากที่สุดบริเวณตับ การทำงานของยีนนี้ยังไม่มีหน้าที่แน่นอน แต่จากการทดลอง *in vitro* พบว่าทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์ไลเปส ช่วยย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ และควบคุมสมดุลพลังงาน [55] จากการศึกษาใน GWAS พบว่า SNP ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 อยู่บน exon ที่ 3 มีความสัมพันธ์กับการสะสมของไขมันในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับคั่งไขมัน (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) และผู้ป่วยที่เป็นโรคตับจากการดื่มแอลกอฮอล์ (Alcoholic Liver Disease, ALD) [56] ปัจจุบันมีรายงานจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของ SNP บนยีน *PNPAL3* (C>G) ส่งผลต่อการสะสมของปริมาณไขมันในตับ และการพัฒนาความรุนแรงของโรคเป็นตับแข็งและมะเร็งตับได้ [6, 26, 29, 57] โดยการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (Ile) เป็นเมทไทโอนีน (Met) ที่ตำแหน่ง 148 จะทำให้การจับกับซีสเทรทบริเวณเร่งของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ทำให้การทำงานของโปรตีนลดลง การย่อยสลายไขมันลดลง และเกิดการสะสมของไขมันในตับในที่สุด [28]

ผลจากงานวิจัยนี้พบว่า SNP ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 มีความถี่จีโนไทป์ GG ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและกลุ่มควบคุมสุขภาพดีเป็น 6.5% และ 10.5% ตามลำดับ ซึ่งความถี่จีโนไทป์ GG ที่พบในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง จะต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมสุขภาพดี นอกจากนี้เมื่อพิจารณาอัตราเสี่ยงสัมพันธ์ (Odd ratio, OR) ของการเกิดพังผืดในตับในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมสุขภาพดี พบว่าทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน ($P>0.05$) ซึ่งผลการศึกษาที่พบแตกต่างจากงานวิจัยของ Falletti E. และคณะ ในปี 2011 ที่ศึกษาในประชากรอิตาลีผิวขาวจำนวน 483 ราย พบว่าความถี่จีโนไทป์ GG ในกลุ่มผู้ป่วยตับแข็งและกลุ่มควบคุมเป็น 19.7% และ 8.2% ตามลำดับ โดยมี OR (95%CI) เท่ากับ 3.52 (2.28-5.44), $P<0.001$ [26] และแตกต่างจากงานวิจัยของ Valenti L. และคณะ ในปี 2011 ที่ศึกษาในประชากรอิตาลีผิวขาวจำนวน 819 ราย พบว่าความถี่จีโนไทป์ GG ในกลุ่มผู้ป่วย

ไวรัสตับอักเสบบีและกลุ่มควบคุมเป็น 10.4% และ 2.8% ตามลำดับ มี OR (95%CI) เท่ากับ 2.09 (1.62-2.67), $P < 0.001$ [53] อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ยังพบว่าความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและหายได้เองกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยจีโนไทป์ GG จะสัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่ OR (95%CI) เท่ากับ 0.24 (0.10-0.56), $P = 0.001$ ซึ่งมีผลตรงข้ามกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยอัฟริกาเหนือที่พบว่า SNP นี้ลดอัตราการกำจัดไวรัสตับอักเสบบีและไม่มีความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่สามารถหายได้เองกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [58] จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อชาติของกลุ่มประชากรที่ศึกษามีผลต่อสำคัญอย่างยิ่งต่อการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี พบว่า SNP ของยีน *PNPLA3* ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม ($P > 0.05$) ขัดแย้งกับหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า SNP ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของพังผืดในตับและตับแข็ง [6] ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง OR (95%CI) เท่ากับ 1.47 (1.15-1.87), $P = 0.002$ นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ผู้ป่วยกลุ่มย่อยพบว่า SNP นี้มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับ (HCC) ได้อีกด้วย OR (95%CI) เท่ากับ 2.16 (1.33-3.59), $P = 0.002$ [53] แต่ในขณะเดียวกัน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบก่อนหน้านี้ของ Nakamura M. และคณะ ปี 2013 ที่ศึกษาในประชากรญี่ปุ่น จำนวน 260 ราย และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง SNP rs738409 กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง [30] และสอดคล้องกับการศึกษาของ Petta S. และคณะ ในปี 2015 ที่ศึกษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสรับอักเสบบีเรื้อรัง 434 ราย พบว่า rs738409 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตับแข็งไขมัน (NASH) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าว [59]

อย่างไรก็ตามการอธิบายความแตกต่างของผลการวิจัยนี้กับผลการทดลองก่อนหน้านี้ยังไม่การอธิบายถึงกลไกที่แน่ชัด แต่ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดพังผืดในตับมีหลายชนิด เช่น ภาวะโรคอ้วน เบาหวาน ระดับน้ำตาลหรือภาวะดื้ออินซูลิน รวมถึงระดับการบริโภคแอลกอฮอล์ และเชื้อชาติผู้ป่วยที่ศึกษา เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ถูกจำกัดและควบคุมแตกต่างกันในแต่ละการทดลอง [30] โดยมี

หลักฐานการศึกษาของ Romeo S. และคณะ ในปี 2008 ที่ศึกษาความแตกต่างของ SNP นี้ในผู้ป่วย NAFLD ต่างเชื้อชาติกัน (ผิวดำ ผิวขาว ละตินอเมริกา และเชื้อชาติอื่นๆ) พบว่า SNP นี้มีการกระจายของจีโนไทป์ต่างกัน และมีปริมาณการสะสมของไขมันในตับที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [60] อีกทั้งยังมีหลักฐานที่พยายามอธิบายความแตกต่างของความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ โดยมีการทดลองในหนูที่ถูกดัดแปลง (*in vivo*) ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองใน *in vitro* ที่ว่ายีน *PNPLA3* มีหน้าที่คล้ายเอนไซม์ไลเปส ช่วย ในการทดลองได้ทำการใส่ยีน *PNPLA3* ของมนุษย์เข้าไปในหนูแล้วเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน พบว่าปริมาณไขมันในตับไม่มีแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งเมื่อทำการ knockdown การแสดงออกของยีน *PNPLA3* ก็ไม่พบความแตกต่างของการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์และปริมาณไขมันในตับหรือในเนื้อเยื่ออื่นๆ ซึ่งยังต้องมีการศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไป [29, 61]

นอกจากกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแล้ว ในงานวิจัยนี้ยังศึกษากลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี พบว่าไม่มีความแตกต่างของจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมสุขภาพดี และไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ ให้ผลเหมือนในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง โดยมีรายงานของ Mandorfer M. และคณะ ในปี 2015 ศึกษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี พบว่ามีปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดในตับ เช่น ปริมาณของ $CD4^+$ ระดับวิตามินดี (25(OH)D) ปริมาณแอลกอฮอล์ ระยะเวลาการติดเชื้อ และจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบบี เป็นต้น อีกทั้งยังพบว่าจีโนไทป์ GG ของ rs738409 มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาการเกิดพังผืดในตับ แต่ผู้วิจัยยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนเนื่องจากจำนวนผู้ป่วยที่พบมีจำนวนน้อย ($n=4$) [31] นอกจากนี้ยังมีหลักฐานยืนยันว่า SNP rs738409 มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับเฉพาะกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี เพียงอย่างเดียว แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของระดับไขมันในตับในกลุ่มผู้ป่วยผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี เพราะ SNP นี้อาจจัดเป็นปัจจัยเสี่ยงลำดับสองถัดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ดังที่กล่าวข้างต้น [17, 62]

ตารางที่ 29 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน PNP1A3 ตำแหน่ง rs738409 กับความเสี่ยงของการเกิดโรค

PNPLA3 (rs738409, GG)		Population	Total patients	Risk factor	OR (95%CI)	P-value
Rotman Y., 2010	Caucasian	894 adult patients with NAFLD	Steatosis	1.46 (1.07-2.01)	0.005	
Nischalke H.D., 2011	Germany	81 HCV cirrhosis without HCC	Cirrhosis	3.89 (1.46-10.39)	<0.005	
Valenti L., 2011	Italian	819 CHC patients	Steatosis stage	2.13 (1.4-3.4)	<0.005	
Cai T., 2011	Switzerland	183 patients with HCV genotypes non-3	Steatosis progression	2.09 (1.62-2.67)	<0.001	
Falletti E., 2011	Italian	483 cirrhosis patients	Steatosis	1.578 (1.331-1.870)	0.007	
Trépo E., 2011	European	765 CHC patients	Cirrhosis	3.52 (2.28-5.44)	<0.001	
Sato M., 2013	Japanese	358 HCV-associated HCC patients	Fibrosis stage	2.43 (1.24-4.78)	0.008	
Yasui K., 2014	Japanese	276 patients with CHC	Steatosis	-	0.01	
Ezzikouri S., 2014	North-African	437 HCV patients	Steatosis	2.58 (1.37-4.84)	0.003	
Price J., 2014	US	421 HIV patients	Severe necroinflammatory	2.16 (1.12-4.16)	0.02	
Mandoifer M., 2015	Austrians	86 HIV/HCV-coinfected patients	Advanced fibrosis	2.10 (1.07-4.11)	0.03	
Petta S., 2015	Italian and Australian	434 CHC patients	HCC	2.95 (1.31-6.71)	0.005	
Nakamura M., 2013	Japanese	260 HCV patients	Spontaneous clearance	1.39 (0.60-3.18)	0.980	
Moritou Y., 2014	Japanese	266 HCV patients	Fatty liver	3.30 (1.66, 6.57)	0.001	
			FPR	-	0.03	
			NASH	-	0.02	
			Advanced fibrosis	0.93 (0.69-1.29)	0.69	
			Fatty liver, yes/no	-	0.935	
			Cirrhosis, yes/no	-	0.876	
			Steatosis	0.29 (0.081-1.0)	0.059	

OR, odds ratio; CI, confidence interval; HCV, Hepatitis C virus; HIV, Human immunodeficiency virus; HCC, Hepatocellular carcinoma; FPR, fibrosis progression rate

ยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465

ยีน COX-2 หรือ cyclooxygenase2 เป็นเอนไซม์ rate-limiting step ที่สำคัญในการเปลี่ยน arachidonic acid (AA) เป็น prostaglandin (PG) และ thromboxane (TX) COX-2 เป็นยีนที่ตอบสนองต่อความผิดปกติของเซลล์ โดยกระตุ้นบริเวณ promoter และ transcription factor binding sites (C/EBP, AP-2, SP1, NF- κ B, CRE, Ets-1, PEA-3 and GATA-1) ทำให้ปริมาณการแสดงออกของ COX-2 สูงขึ้น มักพบในกรณีที่เซลล์ต้องตอบสนองต่อการอักเสบ หรือความเครียด โดยทำหน้าที่เป็น proinflammatory เช่น การแสดงออกของ COX-2 ที่เพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับ และสามารถใช้เป็น marker สำหรับการตรวจวัดเพื่อรักษาทางคลินิกได้ [32, 33] มีรายงานว่าบริเวณ 5' flanking region ของยีน COX-2 จะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน และเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคต่างๆได้ [35] ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP rs689465 ของยีน COX-2 พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายชนิด เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ [63] มะเร็งหลอดอาหาร [41] และมะเร็งตับ [32] เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ศึกษา SNP rs689465 (-1195) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 1 บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน COX-2 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีในประเทศไทย พบว่ามีการกระจายของจีโนไทป์ CC ในลักษณะลดความเสี่ยงของการเกิดโรคที่ OR (95%CI) เท่ากับ 0.13 (0.04-0.40) $P=0.0003$ และ 0.19 (0.07-0.51) $P=0.0012$ ตามลำดับ ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Bu และ Zhao ปี 2013 ที่ศึกษาในประชากรเอเชีย รายงานว่าจีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์ในอัตราเสี่ยงสัมพันธ์ของการเกิด HCC ที่ OR (95%CI) เท่ากับ 1.26 (1.05-1.51) $P=0.011$ [43] นอกจากนี้มีการศึกษาในผู้ป่วย HCC หลายงานวิจัยพบว่า rs689465 มีอัตราเสี่ยงสัมพันธ์ของการเกิด HCC มากกว่า 1.0 [43] แต่ในขณะที่เดียวกันผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Sakaki M. และคณะ ในปี 2010 ที่ศึกษาในประชากรญี่ปุ่นที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและดูความสัมพันธ์ของการเกิดโรคตับ พบว่า SNP rs689465 มีการกระจายของจีโนไทป์ CC ในลักษณะลดความเสี่ยงของการติดเชื้อ HCV ที่ OR (95%CI) เท่ากับ 0.23 (0.09-0.59) $P=0.005$ และเมื่อมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน OPN (-443TT) ร่วมด้วยจะส่งเสริมกระบวนการอักเสบและการพัฒนาของโรคตับต่อไปได้ [64]

ลักษณะการทำงานร่วมกันของ SNP rs689465 และ SNP อื่นๆ (Haplotype) แล้วมีความสัมพันธ์ต่อระดับการแสดงออกของพีโนไทป์สามารถพบได้ในหลายงานวิจัย [54] ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Zheng J. และคณะ ในปี 2011 ที่ศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยประชากรจีนที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมอีลอยด์ พบว่าการกระจายตัวของจีโนไทป์ใน SNP rs689465 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค แต่เมื่อพิจารณา SNPs อื่นที่อยู่ใน Haplotype เดียวกัน พบว่าอัตราการแสดงออกของยีน COX-2 เพิ่มขึ้นและส่งผลให้ความรุนแรงของการเกิดโรคเพิ่มสูงขึ้นได้ [65] จากหลักฐานงานวิจัยนี้อาจเป็นข้อสันนิษฐานได้ว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมของ SNP rs689465 อาจมีความสัมพันธ์ต่อระดับความรุนแรงของพังผืดในตับได้ก็ต่อเมื่อมีความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณอื่นร่วมด้วย อีกทั้งยังมีรายงานระดับของไวรัสที่ติดส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีน COX-2 ที่แตกต่างกันต่อการเกิด HCC พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HBV จะมีการแสดงออกของยีนและลักษณะทางคลินิกที่แตกต่างจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [66, 67] ดังนั้นนี้อาจเป็นหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างของผลการทดลองที่ได้กับงานวิจัยในก่อนหน้า

ในการศึกษานี้ยังพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี ซึ่งแตกต่างจากผลการรายงานของ Miyashita M. และคณะ ในปี 2012 ที่ศึกษา Multivariate analysis ในประชากรญี่ปุ่นที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีพบว่า SNP rs689465 จีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในระดับ F3-F4 ที่ OR (95%CI) เท่ากับ 1.48 (1.02-2.13) $P=0.0386$ [68] แต่ผลสอดคล้องกับการทดลองในหนูตัดต่อพันธุกรรมของ Yu J. และคณะ ในปี 2008 ที่ทดลองใส่ยีน COX-2 ของมนุษย์แล้วเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน และ knockout ยีน โดยกระตุ้นให้หนูเกิดการบาดเจ็บที่ตับด้วย Carbon tetrachloride (CCl_4) หรือให้อาหารเพิ่มไขมันในตับ แล้วเปรียบเทียบ ความแตกต่างของ wild type และ mutant พบว่าระดับ mRNA ของยีน COX-2 มีระดับการแสดงออกสูงขึ้นในตับที่มีการอักเสบจาก CCl_4 และจากอาหาร แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณไขมัน ระดับการแสดงออกของ hepatic stellate cell หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพังผืดในตับ [7] ซึ่งความแตกต่างของผลการทดลองนี้ยังต้องมีการศึกษาในระดับโมเลกุลต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 30 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน COX-2 ตำแหน่ง rs689465 กับความเสี่ยงของการเกิดโรค

COX-2 (rs689465, CC)	Population	Total patients	Risk factor	OR (95%CI)	P-value
Zhang X.,2005	Chinese	1026 patients with ESCC	ESCC	1.72 (1.35-2.20)	<0.05
Sakaki M.,2010	Japanese	104 CHC patients	HCV infection	0.23 (0.09-0.59)	0.005
Miyashita M.,2012	Japanese	249 CHC patients	fibrosis stage	1.48 (1.02-2.13)	0.0386
Bu and Zhao.,2013	overall	1,690 patients with HCC	HCC	1.26 (1.05-1.51)	0.011
(meta-analysis)	Asians		HCC	1.27 (1.05-1.54)	0.013
Zhang J.,2011	Chinese	446 patients with AML	AML	3.53 (0.28-43.98)	0.542

OR, odds ratio; CI, confidence interval; CHC, chronic hepatitis C; HCC, Hepatocellular carcinoma; ESCC, Esophageal Squamous Cell Carcinoma;

AML, Acute myeloid leukemia

ยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878

ยีน *DHCR7* หรือ 7-dehydrocholesterol reductase เป็นยีนที่สามารถถอดรหัสให้เอนไซม์ที่เป็น rate-limiting step สำหรับการสังเคราะห์วิตามินดี SNP ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 (G>T) อยู่บริเวณ intron อยู่บนโครโมโซมที่ 11 ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการอักเสบ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ และกระบวนการเกิดพังผืดในตับ โดยหลายงานวิจัยพบว่า rs12785878 มีความสัมพันธ์กับระดับของ 25(OH)D และ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ และความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ [11, 69] ในงานวิจัยนี้พบว่าการกระจายตัวของจีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี ในลักษณะเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ OR (95%CI) เท่ากับ 2.62 (1.27-5.41), $P=0.0094$ ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และ OR (95%CI) เท่ากับ 4.29 (1.77-10.42), $P=0.0013$ ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Petta S. และคณะ ในปี 2012 ที่ศึกษาในประชากรอิตาลีที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จีโนไทป์ 1 และมีประวัติข้อมูลระดับพังผืดในตับ พบว่าจีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์ในลักษณะเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรคที่ OR (95%CI) เท่ากับ 4.22 (1.10-16.12), $P=0.03$

ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและสามารถหายได้เอง พบว่า การกระจายตัวของจีโนไทป์ GG ในลักษณะเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อ HCV มากขึ้นที่ OR (95%CI) เท่ากับ 3.30 (1.36-8.05), $P=0.0084$ และเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อ HCV/HIV ที่ OR (95%CI) เท่ากับ 5.42 (1.95-15.11), $P=0.0012$ ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีสนับสนุนผลในการหาพื้นที่เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมสุขภาพดีที่ว่าจีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์ในลักษณะเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรค ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นอีกหนึ่งหลักฐานว่า SNP นี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกักระดับวิตามินดีในร่างกาย อีกทั้งเมื่อศึกษาเปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับแล้วพบว่า จีโนไทป์ GG ในกลุ่มผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของพังผืดในตับที่เพิ่มสูงขึ้น ($P=0.003$) [13]

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังพบความสัมพันธ์ของระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ (F3-F4) กับการกระจายตัวของจีโนไทป์ของ SNP rs12785878 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ($P=0.016$) ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า จีโนไทป์ GG เป็นจีโนไทป์เสี่ยงที่ทำให้ระดับวิตามินดีลดลง ส่งผลต่อการควบคุมสมดุลของวิตามินดี การควบคุมการทำงานของยีนต่างๆ ลดลง การอักเสบและการเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มสูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณพังผืดที่สูงขึ้น [46, 70] ซึ่งมีหลักฐานมากมายสนับสนุนผลการทดลองดังกล่าว จากการศึกษาพบว่า $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ มีสมบัติเป็น antifibrotic และ profibrotic ซึ่งถูกกระตุ้นผ่าน vitamin D receptor (VDR) ที่บริเวณ Hepatic stellate cell สัมพันธ์กับการศึกษาในหนูทดลอง (*in vitro*) ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดพังผืดในตับ ขณะที่ยับยั้งการทำงานของ VDR พบว่า เกิดการกระตุ้นและพัฒนาของพังผืดในตับมากขึ้น [31, 71]

อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีพบว่า จีโนไทป์ของ SNP นี้ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ ($P=0.676$) ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Grunhage F. และคณะ ในปี 2012 ที่ศึกษาในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับเรื้อรัง (Chronic liver disease) ในประเทศเยอรมันนี้ จำนวน 712 ราย พบว่า SNP rs12785878 มีการกระจายตัวในลักษณะเดียวกับงานทดลองนี้ (TT : GT : GG = 57.4% : 35.0% : 7.6%) มากกว่าร้อยละ 60 ของผู้ป่วยทั้งหมดมีระดับวิตามินดีที่ต่ำ (<30 ng/ml) และเมื่อวิเคราะห์ดูปัจจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า SNP นี้มีความสัมพันธ์กับระดับวิตามินดี ($P=0.008$) และสัมพันธ์กับความรุนแรงของพังผืดในตับ ($P=0.03$) ในระดับ F0-F2 (cut-off = 9.5 kPa) เท่านั้น [11] อีกทั้งในการศึกษาของ Milazzo L. และคณะ ในปี 2011 พบว่า ระดับวิตามินดีที่ต่ำกว่าเกณฑ์ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีไม่ส่งผลต่อสมดุลของวิตามินดีและการพัฒนาของโรคตับ ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจมาจากปริมาณภูมิคุ้มกันในร่างกาย หรือปริมาณการรับวิตามินดี พฤติกรรมและภูมิภาคที่อยู่อาศัยของผู้ป่วยที่แตกต่างกัน [72] จากหลักฐานข้างต้นแสดงให้เห็นว่า SNP นี้มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในระยะเริ่มต้นเท่านั้น ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด แต่อาจมีปัจจัยแวดล้อมอื่นที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับปริมาณวิตามินดี เช่น ปริมาณการรับวิตามินดี หรือการเกิดความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมสมดุลวิตามินดีและสมดุลการสร้างพังผืดในตับ

จากงานวิจัยในทางคลินิกและการทดลองต่างๆ พบว่า 25(OH)D และ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ มีผลต่อกระบวนการสร้างพังผืด วิตามินดีที่ถูกระงับจะช่วยป้องกันโรคเรื้อรังต่างๆได้ เช่น chronic kidney disease และ cardiovascular disorders [73, 74] โดยยับยั้งการเกิดพังผืด และกระบวนการอักเสบ อีกทั้งวิตามินดีจะช่วยลดปริมาณการสังเคราะห์คอลลาเจน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคตับเรื้อรัง ได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีที่ลดต่ำกว่าเกณฑ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี มีหลายงานวิจัยสนับสนุนว่าผู้ป่วยที่มีระดับวิตามินดีที่ต่ำกว่าเกณฑ์ จะมีความเสี่ยงของระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ และการพัฒนาของโรคตับได้มากกว่าปกติ [12, 46, 75, 76] ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนควบคุมระดับของวิตามินดีกับความรุนแรงของพังผืดในตับจะต้องมีการศึกษาต่อเพื่อหาคำอธิบายต่อในระดับโมเลกุลต่อไป



ตารางที่ 31 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 กับความเสี่ยงของการเกิดโรค

DHCR7 (rs12785878, GG)	Population	Total patients	Risk factor	OR (95%CI)	P-value
Wang T.J.,2010	European	16,125 individuals	vitamin D insufficiency	1.21 (1.14-1.29)	4.7×10^{-9}
Grunhage F.,2012	Germany	712 patients with CLD	vitamin D levels liver stiffness	- -	0.008 0.03
Zhang Y.,2012	China	506 Han Chinese children	25(OH)D concentrations	-	0.002
Petta S.,2013	Italian	260 patients with G1 CHC	vitamin D serum levels severe fibrosis	- 4.22 (1.11–16.12)	0.008 0.03
Mandorfer M.,2015	Austrians	86 HIV/HCV-coinfected patients	vitamin D levels vs highFPR	5.47 (1.92-15.7)	0.002
Lange C.M.,2013	Japanese	CHC patients	HCC	1.13 (0.95–1.36)	0.15
	European	CHC patients	HCC	1.00 (0.63–1.58)	1.00

OR, odds ratio; CI, confidence interval; CHC, chronic hepatitis C; HIV, Human immunodeficiency virus; HCC, Hepatocellular carcinoma;

FPR, fibrosis progression rate; CLD, chronic liver disease

ตารางที่ 32 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับวิตามินดีและความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Luo Y., 2014)

Source	HCV type	Ethnic	Severe fibrosis vs. zero or lesser degrees	How fibrosis assessed and diagnosis criteria	OR/relative risk (95% CI)
Petta S.,2013	G1	Italy	F3-F4 vs. F0-F1	Biopsy according to Scheuerscoring system numerical	0.958 (0.919-0.999)
Lange C.M., 2011	G1, 2, 3	Germany	F2-F4 vs. F0-F1	Biopsy according to METAVIR model	0.74 (0.548-1.000)
Arteh J.,2010		Caucasians, African American	Cirrhosis vs. without cirrhosis	By liver biopsy or by clinical or biochemical evidence of hepatocellular failure and/or portal hypertension	0.681 (0.377-1.229)
White D.L., 2013	G1, 2, 3, 4	African American	F3/F4-F4 vs. F0-F3	By biochemical evidence according to FibroSURE-ActiTest model	12.91 (1.30-128.16)
Kitson M.T.,2013	G1	Caucasians, Asian	F3/F4 vs. F0-F2	Liver biopsy according to METAVIR model	-0.21 (-0.53-0.12)
Amanzada A.,2013	G1	Germany	Severe fibrosis/cirrhosis vs. absent/mild/moderate	Liver specimens	-0.80 (-1.10--0.50)

OR, odds ratio; CI, confidence interval

ในการตรวจสอบความรุนแรงของพังผืดในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ร่วมกับไวรัสเอชไอวีแบบเรื้อรังและผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีของงานวิจัยนี้ ใช้การตรวจวัดความยืดหยุ่นของตับ ด้วยเครื่อง Fibroscan โดยใช้หลักการสะท้อนกลับของคลื่นอัลตราซาวด์ตรวจจับความเร็วของคลื่นที่ออกไปกระทบกับเนื้อตับและประเมินค่าความนิ่มหรือแข็งของตับออกมาโดยใช้หลักที่ว่าถ้าตับเริ่มแข็งคลื่นเสียงที่สะท้อนกลับจะเดินทางได้เร็วกว่าที่ได้จะสูง รายงานผลในหน่วย kPa (กิโลปาสคาล) ที่สำคัญคือ ไม่สร้างบาดแผลให้กับผู้ป่วย สะดวก รวดเร็ว และให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำมากกว่าการตรวจแบบเดิม [3] อีกทั้งการวิเคราะห์การหาจีโนไทป์ในการวิจัยนี้ใช้หลักการ TaqMan probe real-time PCR ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณจับของ SNP สูง อาศัยการตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้นในแต่ละอัลลีล สามารถจำแนกจีโนไทป์ได้อย่างถูกต้อง สะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ไม่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หรือ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี อีกทั้งไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ ในขณะที่ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465 มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีในลักษณะลดความเสี่ยงของการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของพังผืดในตับ และที่สำคัญยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวีในลักษณะเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดโรค อีกทั้งในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังยังพบว่าจีโนไทป์มีผลต่อระดับความรุนแรงการพังผืดในตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการค้นพบนี้อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สำคัญในการทำนายระดับความรุนแรงของพังผืดในตับในประชากรไทยได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดในด้านต่างๆ คือ 1) อายุ และเพศของกลุ่มประชากรที่ศึกษาไม่สัมพันธ์กัน อีกทั้งข้อมูลทางคลินิกด้านอื่นๆ ที่ไม่ครบถ้วน อาจส่งผลต่อการวิเคราะห์ปัจจัยร่วมของการเกิดพังผืดในตับ 2) SNP ของยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 จำเป็นต้องมีการวัดปริมาณวิตามินดีในผู้ป่วยเพื่อเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดในตับ ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปจึงต้องแก้ไขและปรับปรุงเพื่อให้ได้ความสมบูรณ์และน่าเชื่อถือของผลการทดลอง

รายการอ้างอิง

1. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(2):209-18.
2. Afdhal NH. FibroScan in the Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology and Hepatology*. 2013;9(8):533-5.
3. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph J-M, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound in medicine & biology*. 2003;29(12):1705-13.
4. Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P, Negro F. Steatosis in chronic hepatitis C: Why dose it really matter? *Gut*. 2006;55(1):123-30.
5. Dubuquoy C, Burnol A-F, Moldes M. PNPLA3, a genetic marker of progressive liver disease, still hiding its metabolic function? *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2013;37(1):30-5.
6. Trépo E, Pradat P, Potthoff A, Momozawa Y, Quertinmont E, Gustot T, et al. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C>G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011;54(1):60-9.
7. Yu J, Wu CW, Chu ESH, Hui AY, Cheng ASL, Go MYY, et al. Elucidation of the role of COX-2 in liver fibrogenesis using transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;372(4):571-7.
8. Mohammed NA, El-Aleem SA, El-Hafiz HA, McMahon RFT. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *Journal of Clinical Pathology*. 2004;57(4):350-4.
9. Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Kajiwara A, Nozawa H, Hiroishi K, et al. Genetic polymorphism in cyclooxygenase-2 promoter affects hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*. 2012;19(9):608-14.
10. Finkelmeier F, Kronenberger B, Koberle V, Bojunga J, Zeuzem S, Trojan J, et al. Severe 25-hydroxyvitamin D deficiency identifies a poor prognosis in patients

- with hepatocellular carcinoma - a prospective cohort study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2014;39(10):1204-12.
11. Grunhage F, Hochrath K, Krawczyk M, Hoblinger A, Obermayer-Pietsch B, Geisel J, et al. Common genetic variation in vitamin D metabolism is associated with liver stiffness. *Hepatology*. 2012;56(5):1883-91.
 12. Avihingsanon A, Jitmitraparp S, Tangkijvanich P, Ramautarsing RA, Apornpong T, Jirajariyavej S, et al. Advanced liver fibrosis by transient elastography, fibrosis 4, and alanine aminotransferase/platelet ratio index among Asian hepatitis C with and without human immunodeficiency virus infection: role of vitamin D levels. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2014;29(9):1706-14.
 13. Petta S, Grimaudo S, Marco VD, Scazzone C, Macaluso FS, Camma C, et al. Association of vitamin D serum levels and its common genetic determinants, with severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *Journal of viral hepatitis*. 2013;20(7):486-93.
 14. Kitson MT, Roberts SK. D-livering the message: the importance of vitamin D status in chronic liver disease. *Journal of hepatology*. 2012;57(4):897-909.
 15. Di Martino V, Rufat P, Boyer N, Renard P, Degos F, Martinot-Peignoux M, et al. The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. *Hepatology*. 2001;34(6):1193-9.
 16. Martín-Carbonero L, Benhamou Y, Puoti M, Berenguer J, Mallolas J, Quereda C, et al. Incidence and Predictors of Severe Liver Fibrosis in Human Immunodeficiency Virus—Infected Patients with Chronic Hepatitis C: A European Collaborative Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;38(1):128-33.
 17. Macías J, Márquez M, Téllez F, Merino D, Jiménez-Aguilar P, López-Cortés LF, et al. Risk of Liver Decompensation Among HIV/Hepatitis C Virus–Coinfected Individuals With Advanced Fibrosis: Implications for the Timing of Therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 2013;57(10):1401-8.
 18. Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *Journal of Hepatology*. 38:38-53.

19. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut*. 2006;55(3):403-8.
20. Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, et al. Impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology Research*. 2014:1-8.
21. Hussain Z. Genomic Heterogeneity of Hepatitis Viruses (A-E): Role in Clinical Implications and Treatment 2013 2013-05-29.
22. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microbial & comparative genomics*. 2000;5(3):129-51.
23. Cai T, Dufour J-F, Muellhaupt B, Gerlach T, Heim M, Moradpour D, et al. Viral genotype-specific role of PNPLA3, PPARG, MTTP, and IL28B in hepatitis C virus-associated steatosis. *Journal of Hepatology*. 55(3):529-35.
24. Rosen HR. Chronic Hepatitis C Infection. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(25):2429-38.
25. Macías J, Berenguer J, Japón MA, Girón JA, Rivero A, López-Cortés LF, et al. Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology*. 2009;50(4):1056-63.
26. Falletti E, Fabris C, Cmet S, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, et al. PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence. *Liver International*. 2011;31(8):1137-43.
27. Basantani MK, Sitnick MT, Cai L, Brenner DS, Gardner NP, Li JZ, et al. Pnpla3/Adiponutrin deficiency in mice does not contribute to fatty liver disease or metabolic syndrome. *Journal of Lipid Research*. 2011;52(2):318-29.
28. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, et al. A Sequence Variation (I148M) in PNPLA3 Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Disrupts Triglyceride Hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(9):6706-15.
29. Valenti L, Dongiovanni P, Ginanni Corradini S, Burza MA, Romeo S. PNPLA3 I148M variant and hepatocellular carcinoma: A common genetic variant for a rare disease. *Digestive and Liver Disease*. 2013;45(8):619-24.

30. Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Miyamura T, Jiang X, Wu S, et al. No Correlation between PNPLA3 rs738409 Genotype and Fatty Liver and Hepatic Cirrhosis in Japanese Patients with HCV. *PLoS ONE*. 2013;8(12):1-7.
31. Mandorfer M, Payer BA, Schwabl P, Steiner S, Ferlitsch A, Aichelburg MC, et al. Revisiting liver disease progression in HIV/HCV-coinfected patients: the influence of vitamin D, insulin resistance, immune status, IL28B and PNPLA3. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2015;35(3):876-85.
32. Wu T. Cyclooxygenase-2 in hepatocellular carcinoma. *Cancer treatment reviews*. 2006;32(1):28-44.
33. Cervello M, Montalto G. Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006;12(32):5113-21.
34. Sugie S, Tsukino H, Mukai S, Akioka T, Shibata N, Nagano M, et al. Cyclooxygenase 2 genotypes influence prostate cancer susceptibility in Japanese Men. *Tumor Biology*. 2014;35(3):2717-21.
35. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Molecular immunology*. 1997;34(5):391-9.
36. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, et al. Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002;22(10):1631-6.
37. Yang X, Hou F, Taylor L, Polgar P. Characterization of human cyclooxygenase 2 gene promoter localization of a TGF-beta response element. *Biochimica et biophysica acta*. 1997;1350(3):287-92.
38. Horrillo R, Planagumà A, González-Pérez A, Ferré N, Titos E, Miquel R, et al. Comparative Protection against Liver Inflammation and Fibrosis by a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor and a Nonredox-Type 5-Lipoxygenase Inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;323(3):778-86.
39. Planagum, agrave A, Clària J, Miquel R, López-Parra M, Titos E, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms

- involving non-parenchymal cell apoptosis and PPAR γ activation. *The FASEB Journal*. 2005;19:1120-2.
40. Manning DS, Sheehan KM, Byrne MF, Kay EW, Murray FE. Cyclooxygenase-2 expression in chronic hepatitis C and the effect of interferon α treatment. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007;22(10):1633-7.
 41. Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, et al. Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and Their Association With Risk of Esophageal Cancer. *Gastroenterology*. 2005;129(2):565-76.
 42. Young Kwan S, Sun Young H, Jin Oh K, Han Ik B, Jung-Chul K, Moon Kyu K. The Correlation between Cyclooxygenase-2 Expression and Hepatocellular Carcinogenesis. *Mol Cells*. 2004;17(1):35-8.
 43. Bu X, Zhao C. The association between cyclooxygenase-2 1195 G/A polymorphism and hepatocellular carcinoma: evidence from a meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013;34(3):1479-84.
 44. Chiang KC, Chen TC. The anti-cancer actions of vitamin D. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2013;13(1):126-39.
 45. Yousefzadeh P, Shapses SA, Wang X. Vitamin D Binding Protein Impact on 25-Hydroxyvitamin D Levels under Different Physiologic and Pathologic Conditions. *International journal of endocrinology*. 2014;2014:981581.
 46. Lange CM, Miki D, Ochi H, Nischalke HD, Bojunga J, Bibert S, et al. Genetic analyses reveal a role for vitamin D insufficiency in HCV-associated hepatocellular carcinoma development. *PloS one*. 2013;8(5):e64053.
 47. Falletti E, Cmet S, Fabris C, Fattovich G, Cussigh A, Bitetto D, et al. Genetic polymorphisms of vitamin D pathway predict antiviral treatment outcome in slow responder naive patients with chronic hepatitis C. *PloS one*. 2013;8(11):e80764.
 48. Grammatikos G, Lange C, Susser S, Schwendy S, Dikopoulos N, Buggisch P, et al. Vitamin D levels vary during antiviral treatment but are unable to predict treatment outcome in HCV genotype 1 infected patients. *PloS one*. 2014;9(2):e87974.

49. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet*. 2010;376(9736):180-8.
50. Iruzubieta P, Teran A, Crespo J, Fabrega E. Vitamin D deficiency in chronic liver disease. *World journal of hepatology*. 2014;6(12):901-15.
51. Zhang Y, Wang X, Liu Y, Qu H, Qu S, Wang W, et al. The GC, CYP2R1 and DHCR7 genes are associated with vitamin D levels in northeastern Han Chinese children. *Swiss medical weekly*. 2012;142:w13636.
52. Robert L., Carithers, McClain C. Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 8th ed. 1771-8 p.
53. Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, Aghemo A, Del Menico B, De Nicola S, et al. Patatin-Like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2011;53(3):791-9.
54. Piranda D, Festa-Vasconcellos J, Amaral L, Bergmann A, Vianna-Jorge R. Polymorphisms in regulatory regions of Cyclooxygenase-2 gene and breast cancer risk in Brazilians: a case-control study. *BMC Cancer*. 2010;10(1):613.
55. Dubuquoy C, Burnol AF, Moldes M. PNPLA3, a genetic marker of progressive liver disease, still hiding its metabolic function? *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2013;37(1):30-5.
56. Chambers JC, Zhang W, Sehmi J, Li X, Wass MN, Van der Harst P, et al. Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nature genetics*. 2011;43(11):1131-8.
57. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ, the NC. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;52(3):894-903.
58. Ezzikouri S, Alaoui R, Tazi S, Nadir S, Elmdaghri N, Pineau P, et al. The adiponutrin I148M variant is a risk factor for HCV-associated liver cancer in North-African patients. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;21(0):179-83.

59. Petta S, Vanni E, Bugianesi E, Rosso C, Cabibi D, Camma C, et al. PNPLA3 rs738409 I748M is associated with steatohepatitis in 434 non-obese subjects with hepatitis C. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2015;41(10):939-48.
60. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*. 2008;40(12):1461-5.
61. Chen W, Chang B, Li L, Chan L. Patatin-like phospholipase domain-containing 3/adiponutrin deficiency in mice is not associated with fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;52(3):1134-42.
62. Price JC, Seaberg EC, Latanich R, Budoff MJ, Kingsley LA, Paella FJ, Jr., et al. Risk factors for fatty liver in the Multicenter AIDS Cohort Study. *The American journal of gastroenterology*. 2014;109(5):695-704.
63. Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature reviews Cancer*. 2001;1(1):11-21.
64. Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, et al. Cyclooxygenase-2 gene promoter polymorphisms affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2010;40(12):1219-26.
65. Zheng J, Chen S, Jiang L, You Y, Wu D, Zhou Y. Functional genetic variations of cyclooxygenase-2 and susceptibility to acute myeloid leukemia in a Chinese population. *European journal of haematology*. 2011;87(6):486-93.
66. Chen TH, Tseng LM, Chau GY, Lui WY, Tsay SH, King KL, et al. Clinicopathologic and prognostic differences between patients with hepatitis B- and C-related resectable hepatocellular carcinoma. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2001;100(7):443-8.
67. Roayaie S, Haim MB, Emre S, Fishbein TM, Sheiner PA, Miller CM, et al. Comparison of surgical outcomes for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B versus hepatitis C: a western experience. *Annals of surgical oncology*. 2000;7(10):764-70.
68. Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Kajiwara A, Nozawa H, Hiroishi K, et al. Genetic polymorphism in cyclooxygenase-2 promoter affects hepatic inflammation and

- fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Journal of viral hepatitis*. 2012;19(9):608-14.
69. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(5):342-57.
70. Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*. 2013;153(3):601-13.
71. Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, Brazowski E, et al. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut*. 2011;60(12):1728-37.
72. Milazzo L, Mazzali C, Bestetti G, Longhi E, Foschi A, Viola A, et al. Liver-related factors associated with low vitamin D levels in HIV and HIV/HCV coinfecting patients and comparison to general population. *Current HIV research*. 2011;9(3):186-93.
73. Valdivielso JM, Cannata-Andia J, Coll B, Fernandez E. A new role for vitamin D receptor activation in chronic kidney disease. *American journal of physiology Renal physiology*. 2009;297(6):F1502-9.
74. Wolf M, Betancourt J, Chang Y, Shah A, Teng M, Tamez H, et al. Impact of activated vitamin D and race on survival among hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(7):1379-88.
75. Terrier B, Carrat F, Geri G, Pol S, Piroth L, Halfon P, et al. Low 25-OH vitamin D serum levels correlate with severe fibrosis in HIV-HCV co-infected patients with chronic hepatitis. *Journal of hepatology*. 2011;55(4):756-61.
76. Guzman-Fulgencio M, Garcia-Alvarez M, Berenguer J, Jimenez-Sousa MA, Cosin J, Pineda-Tenor D, et al. Vitamin D deficiency is associated with severity of liver disease in HIV/HCV coinfecting patients. *The Journal of infection*. 2014;68(2):176-84.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย Lysis Buffer ปริมาตร 50 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Tris-HCl	0.1050 g
EDTA	0.1245 g
SDS	0.3350 g

จากนั้นเติม DW ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 50 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave รอให้เย็นจากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อต้องการใช้ให้นำมาละลายตะกอนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

2. การเตรียมสารละลาย 2M NaOAc ปริมาตร 25 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
NaOAc	4.101 g

จากนั้นเติม DW ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 25 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave รอให้เย็นจากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3. การเตรียมสารละลาย 5X Tris borate buffer (5X TBE buffer) ปริมาตร 1000 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Tris-Base	54.0 g
Boric acid	27.5 g
EDTA	4.16 g

จากนั้นเติม DW ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 1000 ml ผสมสารละลายให้เข้ากัน หากไม่ละลายให้ตั้งบน Hot plate แล้วกวนด้วย Stirring-magnetic bar เมื่อต้องการใช้งานให้เตรียมสารละลายเป็น 1X TBE buffer โดยใช้ 5X TBE buffer ปริมาตร 200 ml จากนั้นเติม DW อีก ปริมาตร 800 ml แล้วผสมให้เข้ากัน

4. การเตรียม 2% (W/V) Agarose gel ปริมาตร 100 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Agarose	2.0 g
1X TBE buffer	100 ml

5. การเตรียมสารละลาย 10% (V/V) Ethidium bromide ปริมาตร 250 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Ethidium bromide	25 μ l
DW	250 ml

6. การเตรียม LB argar Plate ปริมาตร 100 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Agar	1.5 g
Yest Extract	0.5 g
Tryptone	1.0 g
NaCl	0.5 g

จากนั้นเติม DW ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave รอให้สารละลายอุ่น แล้วเติม Ampicillin (100mg/ml) ปริมาตร 100 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเทใส่ plate โดยแบ่ง plate ละ 33-35 ml

7. การเตรียม LB argar broth ปริมาตร 100 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Yest Extract	0.5 g
Tryptone	1.0 g
NaCl	0.5 g

จากนั้นเติม DW ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave รอให้สารละลายอุ่น แล้วเติม Ampicillin (100mg/ml) ปริมาตร 100 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

8. การเตรียมสารละลาย SOC Medium ปริมาตร 100 ml

สารเคมีที่ใช้	ปริมาณ
Yest Extract	0.5 g
Tryptone	2.0 g
1M NaCl	1.0 ml
1M KCl	0.25 ml

จากนั้นเติม DW ให้มีปริมาตรสุทธิเป็น 100 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave รอให้สารอุ่น จากนั้นเติม 2M Glucose และ 2M Mg²⁺ อย่างละ 1 ml แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

9. การเตรียม Stock Competent Cell (*E.coli*)

- 9.1 Spread *E.coli* ลงบน LB agar plate แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 9.2 ใช้โคลนเดี่ยวที่ได้นำมาเลี้ยงใน LB Broth ปริมาตร 50 ml แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 9.3 นำเชื้อ *E.coli* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาเลี้ยงต่อใน flask (10% v/v) ที่มี LB Broth ปริมาตร 200 ml และบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่า 200 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 9.4 วัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *E.coli* ที่ความยาวคลื่น 600 nm (ให้อยู่ในช่วง 0.4-0.6 เนื่องจากเป็นช่วงที่แบคทีเรียเจริญเติบโต และไม่แก่เกินไป)
- 9.5 แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *E.coli* ใส่ conical tube ขนาด 50 ml และแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที
- 9.6 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที
- 9.7 เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือเฉพาะตะกอน *E.coli* จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ *E.coli* ด้วย 0.1 M CaCl₂ ปริมาตร 10 ml แล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที
- 9.8 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที
- 9.9 เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือเฉพาะตะกอน *E.coli* จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ *E.coli* ด้วย 0.1 M CaCl₂ มี 15% (w/v) glycerol (15% v/v) ปริมาตร 1 ml แล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที
- 9.10 แช่ในน้ำแข็ง 2-3 ชั่วโมง และแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 100 µl
- 9.11 เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C

ดัชนี

ผลการหาจีโนไทป์ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465
และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ในกลุ่ม HCV

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
1	6	2	69	4.9	CC	TT	GG
2	3	1	42	16.6	CC	TT	GT
3	1	1	41	5.4	CG	TT	GG
4	6	1	53	7.3	CC	TT	GG
5	1	2	56	3.7	GG	TT	GG
6	1	1	51	6.4	CC	TT	GT
7	3	1	39	9.7	CC	TT	GG
8	1	1	40	12.3	CC	TT	GG
9	3	2	54	10	CC	TT	GT
10	6	1	61	11.1	CG	TC	GG
11	3	1	55	10.5	CC	TC	GT
12	1	1	63	21.1	CG	TT	GT
13	6	2	58	7.6	CC	TT	GG
14	3	1	59	17.3	GG	TT	TT
15	1	2	48	3.3	CG	TT	GT
16	6	1	30	4.9	CC	TC	GT
17	3	2	29	6	CC	TT	GG
18	3	1	29	8.3	CC	TT	GT
19	3	1	46	13.1	CG	TT	GT
20	1	2	52	4.6	CG	TT	GT
21	1	1	32	6.8	CG	TT	GG
22	3	1	36	4.7	CC	TC	GG
23	6	1	35	6.2	CG	TT	GT
24	6	1	39	5.3	CG	TC	GG
25	3	1	40	9.3	CG	TT	GT
26	1	2	43	6.5	CG	TT	GT
27	1	2	34	3.6	CC	TT	GT
28	3	2	31	7.9	CC	TT	GG

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
29	1	1	35	7.6	CC	TT	GG
30	1	2	44	4.6	CC	TT	GG
31	1	2	30	6.1	CC	TT	GG
32	1	1	36	6.7	CG	TT	GG
33	3	1	47	6.9	CG	TC	GG
34	6	1	53	5.8	CG	TC	GT
35	3	2	36	5.5	CG	TT	GG
36	6	1	42	8.6	CC	TT	GT
37	1	1	47	7.8	CG	TT	GT
38	3	1	37	9.5	GG	TT	GG
39	3	1	43	8	CC	TC	GG
40	3	1	34	8.2	CG	TT	GG
41	1	2	42	3.7	CC	TT	GG
42	3	1	33	4.9	CC	TT	GT
43	3	2	52	17.1	CC	TT	GG
44	3	1	46	10.9	CC	TT	GG
45	3	2	37	5.8	CC	TT	GG
46	1	2	56	21.3	CG	TT	GT
47	3	1	38	8.2	CC	TT	GT
48	3	1	62	48	CC	CC	GT
49	6	1	33	4	CC	TT	GG
50	3	2	54	34.3	CG	TT	GT
51	1	2	49	4.6	CG	TT	GT
52	1	1	56	7.2	CC	TC	GT
53	1	1	34	7.7	CG	TT	GT
54	3	1	46	11.1	CC	TT	GT
55	3	1	38	7.1	CG	TT	GG
56	6	2	43	4	CC	TT	GG
57	1	2	51	5.1	CG	TT	GG
58	1	1	48	4.9	CC	TT	GG
59	6	2	41	5.4	CC	TT	GG
60	1	2	43	4	GG	TC	GT
61	1	1	39	5.4	CC	TT	GG

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
62	6	1	43	5.4	CG	TT	GG
63	1	2	81	27	CG	TC	GT
64	3	1	53	21.3	CG	TT	GG
65	6	1	38	4.7	CG	TC	GT
66	3	1	60	15	CC	TT	GG
67	3	1	22	4.8	CG	TC	GG
68	6	1	55	8	CG	TT	GT
69	3	1	43	4.7	CC	TT	GG
70	3	2	44	6.9	CG	TT	GT
71	1	1	41	6.6	CC	TT	GT
72	3	1	40	20.6	CC	TC	GG
73	3	1	37	8.1	CG	TT	GT
74	6	1	38	5.9	CG	TT	GT
75	6	1	49	8.3	CC	CC	GT
76	3	2	37	7.1	CC	TT	GT
77	1	1	52	6.8	CC	TT	GG
78	3	1	55	7.9	CG	TT	GT
79	3	2	37	4.4	CG	TT	GG
80	3	1	36	4.9	CG	TC	GG
81	3	1	39	4.4	GG	TT	GG
82	1	1	28	7.4	CG	TT	GG
83	3	1	45	16.8	CC	TT	GG
84	6	2	34	5.4	CC	TT	GG
85	6	1	36	6.9	CG	TT	GG
86	3	1	35	5.3	CG	TC	GG
87	1	1	39	4.2	CG	TT	GG
88	1	1	54	18.8	GG	TT	GG
89	1	2	32	3.7	CG	TT	GG
90	1	1	35	3.8	CG	TT	GG
91	1	1	52	10.9	CC	TT	GT
92	6	1	48	4.4	CC	TT	GG
93	3	1	40	6.3	CC	TC	GT
94	3	2	23	5.9	CC	TT	GG

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
95	6	1	45	6.3	CG	TT	TT
96	3	1	44	8	CC	TT	GT
97	3	1	44	48.8	CC	TT	GT
98	3	2	25	5.4	CG	TT	GG
99	1	1	45	20.9	CG	TT	GG
100	1	1	55	45.7	CC	TC	GG
101	6	1	40	56.1	CG	TT	GG
102	3	1	35	27.4	CG	TC	GT
103	1	2	33	4.2	CC	TT	GG
104	1	1	51	34.3	GG	TT	GG
105	6	1	35	9.4	CG	TT	GG
106	3	2	54	21.3	CC	TT	GG
107	3	1	36	19.3	CG	TC	GG
108	3	1	37	20.6	CC	TT	GG
109	3	1	50	19.2	CC	TT	GT
110	6	1	43	25.4	CC	TT	GT
111	1	1	53	4.8	CC	TT	GT
112	1	1	63	8.9	CC	TT	GG
113	3	1	33	6	GG	TT	GG
114	1	1	37	7.7	CC	TT	GG
115	1	2	47	24.2	CC	TT	TT
116	1	1	48	50.5	CG	TT	GG
117	1	1	37	20.2	CC	TC	GG
118	1	1	29	4.9	CC	TT	GT
119	3	2	60	10.6	CC	TT	GT
120	6	1	55	5.9	CC	TC	GG
121	3	1	35	4.8	CG	TT	GT
122	3	2	60	14.5	CC	TT	GT
123	6	1	47	7.6	CG	TT	GG
124	3	1	32	5.2	CC	TT	GG
125	1	2	31	3	CC	TT	TT
126	1	1	32	8.3	CC	TT	GG
127	1	1	80	4.7	CC	TC	GT

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
128	3	2	23	7.4	CC	TC	GG
129	3	1	33	7	CC	TC	GG
130	3	2	54	3.2	CG	TT	GT
131	3	1	35	10	CC	TT	GG
132	3	1	45	20.2	CC	TT	GG
133	3	2	60	20.9	CG	TT	GT
134	1	1	38	11.3	CC	TT	GG
135	6	1	51	8.4	CC	TC	GT
136	3	1	36	19	CC	TC	GG
137	3	2	46	9.9	CC	TC	GG
138	3	1	56	12	CG	TT	GT
139	1	1	27	4.9	CC	TC	GG
140	3	1	51	5.8	CC	TT	TT
141	3	1	32	4.7	CG	TT	GG
142	1	1	36	6.1	CG	TT	GG
143	1	2	33	3.8	CC	TT	GG
144	3	1	39	5.2	CG	TT	GT
145	3	1	41	8.6	CG	TT	GG
146	3	1	51	7.6	CG	TT	GG
147	1	1	29	4.5	CC	TT	GG
148	3	1	57	20	CG	TT	GT
149	1	2	42	4.9	CG	TT	GG
150	3	2	34	5.3	CC	TT	GG
151	6	1	31	8	CC	TT	GG
152	3	1	55	6.6	CC	TT	TT
153	3	1	41	9.1	CC	TT	GT
154	1	1	59	4.8	CG	TC	GG
155	3	1	52	12.2	CG	CC	GT
156	6	1	34	4.3	CG	TT	GG
157	1	2	38	3.8	CC	TT	GG
158	3	1	35	8.8	CC	TT	TT
159	1	1	54	13.4	CG	TC	GT
160	6	1	33	8	CC	TT	GG

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
161	1	2	35	3.8	CC	TT	GG
162	1	1	47	11.4	CC	TT	GG
163	6	1	34	6.8	CC	TT	GG
164	1	1	51	9	GG	TT	GG
165	6	2	33	6.2	GG	TC	GG
166	3	1	35	5	CC	TT	GT
167	6	2	59	33.8	CG	TT	GT
168	3	1	41	7	CC	TT	GG
169	1	1	30	6.6	CG	TT	GT
170	3	2	49	11.6	CG	TT	GG
171	3	2	32	5.3	GG	TC	GG
172	1	1	37	10.5	CC	TT	GG
173	1	2	44	8.5	CC	TT	GT
174	6	1	32	17.1	GG	undetermine	GT
175	1	2	32	4.7	CG	TT	GG
176	3	2	31	9.5	GG	TC	GG
177	1	1	27	4.9	CC	TC	GG
178	1	1	44	7.8	CC	TC	TT
179	3	2	37	5.3	CC	TC	GG
180	6	2	51	6.1	CG	TC	GT
181	3	2	55	11.6	CG	TT	GT
182	3	1	44	7.7	CC	TT	GT
183	3	1	33	5.1	CC	TT	GG
184	1	1	43	8.6	CC	TT	TT
185	3	1	36	12.1	CG	TT	GT
186	1	1	33	4	CC	TC	GG
187	3	1	51	11.8	CG	TT	GT
188	3	2	31	6.6	CG	TT	GG
189	6	2	63	14.8	CC	TT	GG
190	3	1	35	6.6	CC	TT	GG
191	3	1	46	17.8	CC	TT	GG
192	6	1	52	6	CG	TT	GG
193	1	1	50	7.6	CC	TT	GT

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
194	3	1	40	8.4	CG	TT	GT
195	6	1	47	11.8	CC	TT	GT
196	1	1	38	10.1	CC	TT	GT
197	1	1	36	5.3	CC	TT	GT
198	3	1	53	6.6	CC	TT	GG
199	1	1	52	10.9	CC	TC	GT
200	1	1	57	17.5	CC	TT	GT
201	3	1	43	6.7	GG	TT	GG
202	6	1	34	3.7	CC	TT	GG
203	3	1	55	4.9	CC	TT	GT
204	3	2	49	33.3	CG	TT	GT
205	1	1	48	4.5	CC	TC	GT
206	3	2	54	15.8	GG	TT	GT
207	3	1	38	7.6	undertermine	undertermine	GT
208	3	2	46	17.3	CG	TT	GT
209	6	2	33	5.7	CC	TT	TT
210	1	1	49	5.3	CC	TT	GG
211	1	2	36	3.7	CG	TT	GT
212	1	1	58	13.1	CC	TT	GT
213	3	1	36	6.8	CC	TC	GG
214	3	2	26	8.9	CG	TT	TT
215	6	1	36	5.9	CG	TT	GG
216	3	1	40	4.7	CG	TT	GG
217	1	2	56	5.1	CG	TT	GG
218	3	1	40	9.5	CG	TT	GG
219	3	1	56	8.6	CC	TC	GG
220	1	1	45	10.2	CG	CC	GG
221	3	1	38	14.6	CG	ND	GG
222	1	1	33	14.1	CC	ND	GT
223	3	2	34	3	CG	ND	GG
224	1	1	37	8.6	CC	ND	TT
225	6	1	21	3	CC	ND	TT
226	3	1	33	11.8	CC	ND	GT

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
227	6	2	24	3.5	CC	ND	GT
228	1	2	58	13.2	CG	ND	GT
229	3	1	26	7.2	CG	ND	GG
230	3	2	33	6.8	CG	ND	GG
231	1	2	38	8.6	CC	ND	GT
232	3	1	49	9.5	CG	ND	ND
233	6	1	45	4.6	CG	ND	ND
234	3	1	33	9.6	CC	ND	ND
235	3	1	46	11.8	CG	ND	ND
236	3	1	48	5.4	CG	ND	ND
237	1	1	36	10.4	CG	ND	ND
238	3	1	45	10.6	CG	ND	ND
239	3	1	43	7.1	undertermine	ND	ND
240	1	1	33	7	CC	ND	ND
241	3	1	40	20.6	CG	ND	ND
242	1	1	34	7.7	CC	ND	ND
243	6	2	47	23.1	CC	ND	ND
244	3	1	52	6.4	CG	ND	ND
245	1	1	27	6.8	CC	ND	ND
246	6	2	54	6.6	CG	ND	ND
247	3	1	41	5.8	CC	ND	ND
248	6	1	28	3.7	GG	ND	ND
249	6	1	43	7.4	CC	ND	ND
250	6	2	54	11.9	CG	ND	ND

Sex: 1=Male, 2=Female; ND, Not done

ผลการหาจีโนไทป์ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465
และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ในกลุ่ม HCV/HIV

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
1	1	1	42	7.1	CC	TT	TT
2	1	1	44	22.0	CC	TT	GT
3	3	2	34	17.3	CC	CC	GG
4	3	1	50	8.4	GG	TT	GT
5	1	1	41	7.7	CC	TT	GG
6	3	1	40	8.8	CC	TT	GT
7	1	1	37	7.8	CG	TT	GG
8	1	2	43	24.0	GG	TT	GT
9	3	1	36	12.9	CC	TT	GT
10	3	1	58	12.0	CC	TT	TT
11	3	2	48	6.9	CC	TT	GT
12	6	1	44	7.5	CC	TT	GT
13	3	1	52	34.3	CG	TT	GT
14	3	1	49	10.4	CG	undertermine	undertermine
15	1	1	42	21.3	CC	TT	GT
16	3	1	37	21.3	CC	TT	GG
17	3	1	48	10.5	CC	TT	GG
18	6	1	49	18.6	CC	TT	GG
19	3	1	39	9.6	CG	TT	TT
20	6	2	52	19.5	CC	TC	GT
21	1	1	48	13.6	CC	TT	GT
22	6	2	38	10.1	CG	TT	GG
23	1	1	41	9.4	CG	TT	GT
24	3	1	39	8.9	CC	TT	GG
25	1	1	39	51.5	CG	TT	GG
26	1	1	39	7.7	CC	TT	GG
27	3	1	55	44.3	CC	TC	GG
28	3	1	36	5.9	CG	TT	GT
29	3	1	56	7.1	CC	TC	GT
30	3	1	37	4.0	CC	TT	GG

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
31	1	1	37	8.9	CG	TT	GG
32	3	1	51	38.5	CG	TT	GG
33	1	1	40	14.0	CG	TT	GG
34	3	2	38	5.6	CC	TT	GT
35	1	1	49	6.7	CG	TT	GG
36	3	1	53	10.9	CG	TT	GG
37	1	1	42	12.6	CC	TT	GG
38	3	1	31	4.8	CC	TC	GT
39	3	1	34	6.8	CC	TC	GG
40	3	1	46	3.8	CC	TT	GG
41	3	1	39	12.0	CG	TT	GG
42	3	1	51	15.5	CG	TT	GG
43	6	1	40	8.7	CG	TT	GT
44	6	2	35	5.5	GG	TC	GG
45	3	1	39	15.1	CG	TT	GG
46	1	1	33	5.4	CC	TT	GG
47	6	1	36	23.1	CG	TT	GG
48	1	1	45	16.6	CG	TT	GG
49	3	1	62	13.6	CC	TT	GG
50	3	1	43	5.9	CG	TC	GT
51	1	1	38	8.5	CG	TT	GT
52	6	1	44	9.0	CC	TC	GT
53	6	1	40	66.4	CC	TT	GT
54	3	1	41	13.1	CC	TT	GT
55	3	1	36	12.3	CG	TT	GG
56	3	1	38	7.6	CG	TT	GT
57	1	1	39	6.7	CC	TC	GG
58	6	1	52	32.5	CG	TT	GG
59	1	1	43	11	CG	TT	TT
60	1	1	40	28.0	CC	TT	GG
61	3	1	37	7.9	CC	TT	GT
62	1	1	35	14.3	CG	TT	GT
63	3	1	40	16.9	GG	TT	GG

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
64	1	1	56	6.1	CG	TT	GT
65	3	2	54	11.7	CG	TT	GT
66	1	1	36	11.5	CG	TT	GG
67	3	1	49	6.7	CG	TT	GG
68	1	1	38	18	CG	TT	GT
69	1	1	49	21.3	CG	TT	GT
70	6	1	65	10.9	CC	TC	GG
71	6	1	45	14.3	CG	TT	GG
72	1	1	38	9	CG	TT	GG
73	3	1	38	6.8	CC	TC	GG
74	1	1	44	20.5	CC	TT	GG
75	6	2	39	9	CC	TT	GT
76	1	1	39	16.3	GG	TT	GG
77	3	1	56	22.5	GG	TT	GG
78	3	1	44	31.6	CC	TT	GG
79	6	1	47	7.8	CG	TT	GG
80	6	1	35	7.8	CG	TT	GG
81	3	1	42	4.3	CC	TT	GG
82	3	2	39	7.4	CG	TC	GG
83	1	1	38	10.5	CC	TT	GT
84	3	1	36	5.4	GG	TT	GG
85	1	1	32	4.9	CC	TT	GG
86	3	1	51	11.3	CG	TT	GG
87	1	1	33	31.2	CC	TT	GG
88	6	1	35	6.7	GG	TT	GT
89	3	1	38	10.4	CG	TT	GG
90	3	1	46	11.3	CC	TC	GG
91	3	1	43	17.3	CC	TT	GG
92	1	1	45	11.1	CC	TT	GT
93	1	1	49	25.7	CC	TT	GT
94	1	1	45	46.4	GG	TT	GG
95	3	1	49	8.9	CG	TT	GT
96	1	1	45	26	CG	TC	GG

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
97	1	1	39	8.4	CC	TC	GT
98	1	1	39	3.7	CG	TC	GT
99	1	1	59	35.3	CC	TT	GG
100	3	1	47	5.4	GG	TT	GT
101	1	1	50	21.1	CC	TT	GG
102	6	1	37	7.7	CG	TT	GG
103	3	1	48	9.9	CC	TT	GG
104	3	1	44	17.1	CC	TC	GT
105	3	1	49	36.3	CC	CC	GT
106	1	1	57	11.5	CC	TT	GG
107	3	1	41	11.5	CG	TT	GT
108	1	1	43	6.8	CG	TT	GT
109	1	1	38	35.3	CG	TT	GG
110	6	1	47	46.4	CC	TT	GG
111	1	1	27	6.3	CG	TT	GG
112	3	1	50	5.4	CC	TT	GT
113	3	1	51	6.1	CG	TT	GG
114	3	1	35	6.1	GG	TC	GG
115	1	1	43	7.3	CC	TT	GT
116	6	1	38	11.7	GG	TT	GT
117	3	1	41	27	CC	TC	GG
118	3	1	53	5.7	CG	TT	GT
119	6	1	37	9.1	CC	TT	GT
120	3	1	46	8.6	CG	TC	GT
121	3	1	46	10.4	GG	TC	GT
122	1	1	38	22.5	GG	TT	GT
123	1	1	31	4.7	CC	TT	GT
124	3	1	58	13.1	GG	TT	GT
125	6	1	50	15.6	CC	TT	GG
126	3	1	34	5.4	CC	TT	GG
127	3	1	37	6	CG	TC	GG
128	3	1	38	27	GG	TC	GG
129	1	1	45	22	CG	TC	GG

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
130	3	1	38	14.3	CC	TT	GG
131	1	1	37	4.5	undetermine	TT	GG
132	1	1	54	26.6	CC	TT	GT
133	1	1	38	8.8	CC	TT	GT
134	3	1	44	14.4	CG	TC	GG
135	3	1	38	7.9	CC	TT	GG
136	1	2	51	10.7	CG	TC	GT
137	1	1	38	10.1	CC	TT	GG
138	6	1	50	8.7	CG	TT	GG
139	6	1	41	17.3	CC	TT	GG
140	6	1	44	14.5	CC	TT	GG
141	6	1	42	8.6	CG	TT	GT
142	3	1	44	29.5	CG	TC	GG
143	1	2	41	20.4	GG	TT	GT
144	3	2	35	7.4	CC	TT	GG
145	1	1	42	11.9	CG	TT	GT
146	3	1	36	8.6	CG	TC	GG
147	1	1	34	5.6	CC	TT	GG
148	3	1	46	12.6	CG	TT	GT
149	1	1	41	9.1	CC	TT	GG
150	1	1	47	29.9	CC	TC	GT
151	6	1	36	4.4	CC	TT	GT
152	6	1	37	6.2	CG	TC	GG
153	1	1	27	6.4	CG	TT	GG
154	3	1	49	10.1	CC	TT	GT
155	3	1	58	5.4	CC	TC	GG
156	6	1	49	7.0	CC	TC	GT
157	1	1	36	3.6	CC	TC	GT
158	3	1	26	5.6	CC	TT	GG
159	1	2	45	6.3	GG	TT	GG
160	1	1	38	9.6	CC	TT	GG
161	3	1	37	5.9	CC	TT	GT
162	1	1	41	69.1	CC	TT	GT

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
163	6	1	33	5.6	CC	TT	GG
164	1	1	39	13.7	GG	TT	GT
165	6	2	37	8.7	CG	CC	GG
166	3	1	51	15.3	CC	TC	GG
167	1	1	40	5.8	CC	TT	GG
168	1	1	27	3.8	CC	TC	GT
169	1	1	38	12.3	CG	TC	GG
170	1	1	47	20.8	CG	TT	GT
171	1	1	35	8.4	CC	TC	GG
172	3	2	33	21.8	CG	CC	GT
173	1	1	38	6.2	CG	TT	GG
174	1	1	57	10.1	CG	TT	GG
175	1	1	41	12.2	CC	CC	GG
176	6	1	39	6.2	CC	TC	GG
177	1	1	57	11.9	CC	TT	GG
178	1	1	46	14.9	CG	TC	GG
179	3	1	43	6.1	CC	TT	GG
180	3	1	54	17.3	GG	TC	GT
181	3	1	43	3.8	CG	TT	TT
182	1	1	36	6.4	CC	TC	GT
183	3	1	50	14.1	CG	TT	TT
184	1	1	36	3.3	CG	TT	GT
185	3	1	52	4.7	CC	TT	GT
186	6	1	44	14.4	CG	TT	GG
187	1	1	44	6.9	CC	TC	GG
188	1	1	35	6.1	CC	TT	GG
189	1	1	51	9.5	CG	TT	GG
190	3	2	40	9.3	CC	TT	GG
191	3	2	44	11.5	CC	TT	GT
192	1	1	40	6.1	CG	TT	GG
193	1	1	40	11.5	CC	TT	GG
194	1	1	62	5.5	CC	TT	GG
195	1	2	33	6.8	CC	TT	TT

No	HCV Genotype	Sex	Age	Fibrosis (kPa)	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
196	3	1	43	5.6	CC	TT	GT
197	1	1	41	5.1	CG	TT	GT
198	1	2	38	7.4	CG	TT	GG
199	1	1	52	16.5	CG	TT	GT
200	1	2	33	5.4	CC	TT	GG

Sex: 1=Male, 2=Female



ผลการหาจีโนไทป์ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465
และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ในกลุ่ม HCV spontaneous clearance

No	Sex	Age	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
1	1	52	CG	CC	GG
2	2	69	CG	TT	GT
3	1	60	GG	TC	GT
4	1	40	CC	TT	GT
5	1	54	GG	TT	GG
6	1	44	CC	TT	GT
7	2	37	CC	TT	GG
8	2	36	CC	TC	GG
9	1	42	CG	TT	GG
10	1	55	CC	TT	GT
11	2	45	CG	TT	GT
12	1	20	CG	TT	TT
13	2	41	CG	TT	GT
14	2	30	CC	TT	GG
15	1	68	CC	TT	GG
16	1	32	CC	TT	GT
17	1	47	CC	TT	GT
18	1	52	CG	TT	GT
19	1	44	GG	TT	GG
20	2	58	GG	TT	GG
21	1	41	GG	TC	GG
22	2	35	CG	TT	GT
23	1	47	CG	TT	TT
24	1	48	CC	TC	TT
25	2	56	CC	TT	TT
26	2	39	GG	TT	GG
27	2	61	undertermine	TT	GT
28	2	26	CC	TC	GG
29	2	31	CG	TT	GT
30	1	32	CG	TT	GT

No	Sex	Age	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
31	1	39	CG	TC	GT
32	1	40	CG	TT	TT
33	1	51	CG	TC	GG
34	1	37	CG	TT	GG
35	1	37	undertermine	TT	GT
36	1	30	CC	TC	GT
37	2	26	CG	TT	GG
38	2	48	CG	TC	GT
39	1	53	CG	TC	GT
40	2	39	CG	CC	GG
41	1	45	CC	TT	TT
42	2	46	CG	TT	GG
43	2	21	CC	CC	GG
44	1	51	CG	TT	TT
45	1	55	CG	TC	TT
46	1	31	CC	TT	GG
47	2	35	CG	TT	GG
48	2	45	GG	TT	GT
49	1	37	CC	TT	GG
50	2	36	CC	TT	GG
51	1	31	CC	TT	GG
52	2	45	CG	TT	GT
53	1	35	CG	CC	GT
54	2	35	GG	TT	GT
55	1	46	CG	TT	GG
56	1	35	CG	TT	GG
57	1	24	CC	TT	GT
58	1	37	CC	TT	GG
59	2	24	GG	TT	TT
60	2	31	CG	TT	GG
61	1	45	CG	TT	GT
62	1	44	CG	TT	GG
63	2	47	CG	TT	GT

No	Sex	Age	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
64	1	53	CG	TT	GG
65	2	42	CC	TT	GT
66	1	55	CG	TT	GT
67	2	38	GG	TT	GG
68	2	31	CC	TT	TT
69	2	29	GG	TT	GG
70	1	44	CC	TT	GG
71	2	26	GG	TT	GT
72	2	28	CC	TT	GT
73	1	40	CC	TT	TT
74	2	42	GG	TT	GG

Sex: 1=Male, 2=Female



ผลการหาจีโนไทป์ของยีน *PNPLA3* ตำแหน่ง rs738409 ยีน *COX-2* ตำแหน่ง rs689465
และยีน *DHCR7* ตำแหน่ง rs12785878 ในกลุ่ม Healthy control

No	Sex	Age	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
1	1	42	CC	TT	GG
2	2	40	CG	TT	GG
3	2	55	CC	TT	TT
4	1	49	CG	TT	GT
5	2	48	GG	TT	GT
6	2	40	CG	TT	GT
7	2	50	CC	TT	GG
8	2	48	GG	TT	GG
9	2	46	CC	TT	GG
10	1	49	GG	TT	GT
11	2	47	CC	TT	GT
12	2	54	CG	TT	GG
13	2	50	CG	TT	GT
14	2	42	CG	TT	TT
15	1	51	CC	TT	GT
16	2	50	CG	TT	GT
17	1	49	CG	TT	GT
18	1	47	CC	TT	GT
19	1	42	CG	TT	TT
20	1	46	GG	TT	GG
21	1	41	CG	TC	GT
22	1	50	CC	CC	GT
23	1	47	CG	undertermine	GT
24	1	47	CC	TT	GG
25	1	41	CC	CC	GG
26	1	45	CC	CC	GG
27	1	49	CG	TT	GT
28	2	43	CC	TT	GG
29	1	41	CC	CC	GT
30	1	59	CG	CC	GG

No	Sex	Age	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
31	1	48	CG	CC	GG
32	1	49	CC	CC	GG
33	1	45	CG	TT	GG
34	2	40	CC	CC	GG
35	1	50	GG	CC	GG
36	2	54	CG	CC	GT
37	2	40	CC	TT	GT
38	2	45	CG	CC	GT
39	2	62	CG	CC	GT
40	2	40	CG	CC	GT
41	2	54	CG	TC	GG
42	2	58	CG	TC	GT
43	2	47	GG	TC	GT
44	2	48	CC	CC	GG
45	2	48	CC	TC	GG
46	2	48	CG	TC	GG
47	2	51	GG	TT	TT
48	2	50	GG	TC	GT
49	2	54	CG	TC	GG
50	2	49	CC	TC	GG
51	2	40	CG	TC	GT
52	2	42	CG	TC	GT
53	1	50	CC	TT	GG
54	1	42	CC	TC	GT
55	1	54	CG	TC	GT
56	2	43	CG	TC	GG
57	2	55	CG	TC	GT
58	1	49	CG	TC	GG
59	2	40	CG	TC	GG
60	1	49	CC	TC	GT
61	1	40	CG	TC	GG
62	2	41	CC	TC	GT
63	2	42	CC	TC	GT

No	Sex	Age	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
64	1	45	CG	TC	GT
65	1	58	CG	TC	GT
66	1	44	CG	CC	TT
67	1	52	CG	TC	GT
68	1	41	CC	TC	GT
69	1	44	GG	TC	GG
70	1	44	CC	TC	TT
71	1	44	CG	TC	GG
72	2	49	CG	TC	TT
73	1	46	CC	TT	GT
74	1	53	GG	TT	GT
75	1	41	CG	TC	TT
76	1	41	CG	TT	TT
77	1	51	GG	TT	GG
78	2	40	CC	TC	GT
79	1	60	CC	TT	GG
80	1	46	CC	TC	GG
81	1	53	GG	TT	GT
82	1	41	CG	CC	GG
83	1	41	CC	TT	GT
84	1	43	CC	TT	GG
85	1	59	CG	TT	GG
86	2	48	CC	CC	GG
87	2	46	CG	CC	GT
88	1	41	CC	CC	GG
89	1	47	CC	TT	GT
90	2	52	CG	TT	TT
91	1	54	CC	TT	GG
92	1	56	CC	TT	GT
93	1	55	CC	TT	GT
94	1	54	CC	TT	GG
95	1	41	GG	TT	GG
96	1	44	GG	TT	GT

No	Sex	Age	<i>PNPLA3</i>	<i>COX-2</i>	<i>DHCR7</i>
			rs738409	rs689465	rs12785878
97	1	45	CG	TT	GT
98	1	47	CG	TT	GG
99	2	43	CC	TT	TT
100	2	55	CG	TT	GT
101	2	46	CC	TT	GG
102	1	49	CC	TT	GG
103	2	42	GG	TT	GG
104	2	40	CG	TT	GT
105	2	44	CC	TT	GT
106	1	42	GG	TT	GG
107	2	42	CG	undetermine	GG
108	2	42	CG	TT	GG
109	1	41	CC	TT	TT
110	2	56	CG	TT	GT
111	1	41	CC	TT	GT
112	1	46	CC	TT	GG
113	1	51	CC	TT	GG
114	2	53	CG	TT	GG
115	2	51	CC	TT	GG
116	1	53	CG	TT	GG
117	1	46	CC	TT	GT
118	1	55	CG	TT	TT
119	1	42	CG	TT	GT
120	1	46	CG	TT	TT
121	1	54	CC	TT	undetermine
122	2	46	CC	TC	TT
123	2	49	CC	TT	GG
124	2	54	CG	TT	GT
125	2	47	CC	TT	GG
126	1	51	CG	TT	undetermine
127	2	47	CG	TT	TT
128	2	54	CG	TT	GG
129	2	42	CG	TT	GT

No	Sex	Age	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
130	2	47	CC	TT	GG
131	1	53	CG	TT	GG
132	2	43	CC	TT	GG
133	1	48	CC	TT	TT
134	1	52	CC	TT	GT
135	2	54	CC	TC	GG
136	2	43	CC	TT	GT
137	1	45	CC	TT	TT
138	1	49	GG	TT	GT
139	1	51	CC	TT	TT
140	1	56	CG	TT	GG
141	1	50	CG	TT	GG
142	2	41	CC	TT	GG
143	1	43	CC	TT	GT
144	2	51	CG	TT	GT
145	2	43	CC	TT	GG
146	1	43	CC	TT	GG
147	2	40	CC	TT	TT
148	1	45	CG	TT	GG
149	1	53	CG	TT	GG
150	1	54	CC	TT	GG
151	1	45	CG	TT	GT
152	1	46	CC	CC	GG
153	2	40	CG	TT	GG
154	2	41	CG	TT	TT
155	2	42	CG	TC	GG
156	2	41	CG	TC	GG
157	1	49	CG	TC	GT
158	2	42	GG	TC	GT
159	1	49	GG	TC	GT
160	2	51	CC	TC	GT
161	2	42	CC	TC	GT
162	2	48	CC	TC	GT

No	Sex	Age	PNPLA3 rs738409	COX-2 rs689465	DHCR7 rs12785878
163	1	42	CG	TC	TT
164	2	47	CC	TC	GG
165	1	58	CC	TC	GG
166	2	41	CG	TT	GG
167	1	48	CG	TT	TT
168	1	55	CG	TT	GT
169	1	58	CC	TT	GT
170	2	47	CG	TC	GT
171	1	47	CG	TC	GG
172	1	49	CC	TC	GT
173	1	48	CG	TT	GG
174	2	42	CG	TC	GG
175	1	56	CC	TC	GT
176	2	54	CC	TC	GT
177	2	44	GG	TC	GG
178	1	53	CG	TC	GT
179	2	49	CC	TC	GT
180	2	52	CC	TC	GT
181	1	44	CC	TC	GT
182	2	47	CG	TC	GG
183	1	46	CC	TT	GT
184	2	43	CG	TT	GG
185	1	46	CG	TC	GG
186	2	42	CC	TC	GG
187	2	46	CG	TC	GG
188	2	42	CC	TC	GT
189	1	45	CC	TC	GT
190	1	49	CG	TT	GG
191	1	51	CC	TC	GG
192	1	49	CC	TC	GT
193	1	55	CC	TT	GG
194	1	50	CC	TT	GT
195	1	50	GG	TT	GG

No	Sex	Age	<i>PNPLA3</i> rs738409	<i>COX-2</i> rs689465	<i>DHCR7</i> rs12785878
196	1	53	CC	TT	TT
197	1	56	CG	TT	GG
198	2	53	CC	TT	GG
199	1	41	CC	TT	GG
200	1	47	CG	TT	GT

Sex: 1=Male, 2=Female



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวรัตนพร เกียรติบำรุง
(ภาษาอังกฤษ) Miss Rattanaporn Kiatbumrung

วัน/เดือน/ปีเกิด 28 พฤศจิกายน 2533

สัญชาติไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนา พุทธ

ที่อยู่ปัจจุบันเลขที่ 128 หมู่ 1 ต.นครหลวง อ.นครหลวง จ.พระนครศรีอยุธยา 13260

ประวัติการศึกษา ระดับปริญญาตรี : วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.) ภาควิชา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2552-2555)

ระดับปริญญาโท : เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม) หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2556

ผลงานทางวิชาการ การประชุมวิชาการ

1) เรื่อง : ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน PNPLA3 กับความรุนแรงของพังผืดในตับ ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

ชื่อผู้นิพนธ์ : Rattanaporn Kiatbumrung, Jarika Makkoch, Sunchai Payungporn and Pisit Tangkijvanich

- ตีพิมพ์ในหนังสือ Proceeding ของงานประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 34 (The 34th National Graduate Research Conference) ณ อาคารเรียนรวม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในวันที่ 27 มีนาคม 2558

2) เรื่อง : THE ASSOCIATION BETWEEN GENETIC VARIATIONS IN PNPLA3 GENE (rs738409) AND SEVERITY OF LIVER FIBROSIS IN THAI PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

ชื่อผู้นิพนธ์ : Rattanaporn Kiatbumrung, Sunchai Payungporn and Pisit Tangkijvanich

- นำเสนอในรูปแบบ Poster ในงานประชุม “10 ปี ชีวเคมีทางการแพทย์ จุฬาฯ” ณ ห้อง 230 ชั้น 2 อาคารแพทย์พัฒน์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในวันพฤหัสบดีที่ 10 กรกฎาคม 2557

- นำเสนอในรูปแบบ Poster ในงานประชุม The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) in Istanbul, Turkey วันที่ 12-15 มีนาคม 2558

- นำเสนอในรูปแบบ Poster ในงานประชุมวิชาการร่วมคณะแพทยศาสตร์สามสถาบัน พ.ศ. 2558: จุฬาฯ-รามฯ-ศิริราช (Joint Conference in Medical Sciences 2015 หรือ JCMS 2015) ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ แอท เซ็นทรัลเวิลด์ ระหว่างวันที่ 4 - 6 มิถุนายน 2558