

การศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมเพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีในกลุ่มผู้ป่วย  
ตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสตับอักเสบบี ระยะพาหะชนิดเข็มน้อย และระยะที่มีตับอักเสบเรื้อรัง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2563  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Vitamin D receptor polymorphism in HBV carrier with low viral load and chronic hepatitis phases; a case-control study



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medicine

Department of Medicine

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมเพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีในกลุ่มผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสตับอักเสบบี ระยะพาหะชนิดเข็มน้อย และระยะที่มีตับอักเสบเรื้อรัง
โดย	น.ส.พุกษา อนันต์ชื่นสุข
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ชูชนา สอนกระต่าย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ไพโรจน์ ฉัตรานุกูลชัย)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ศักรินทร์ จิรพงศธร)

พฤษภา อนนันต์ชื่นสุข : การศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมเพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีในกลุ่มผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสตับอักเสบบี ระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อย และระยะที่มีตับอักเสบเรื้อรัง. ( Vitamin D receptor polymorphism in HBV carrier with low viral load and chronic hepatitis phases; a case-control study) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. นพ.ยง ภูววรรณ

วัตถุประสงค์: การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับระยะของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังโดยแบ่งเป็นระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อย และระยะตับอักเสบเรื้อรัง

วิธีการศึกษา: การศึกษารวบรวมผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง โดยแบ่งเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ 2 กลุ่มคือ กลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยที่มี HBV DNA ในเลือด < 2,000 IU/ml และกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรังที่มี HBV DNA ในเลือด  $\geq$  2,000 IU/ml และระดับ ALT ในเลือด > 40 IU/ml หรือพบหลักฐานการอักเสบหรือพังผืดในตับ ผู้ทำการวิจัยทำการศึกษา SNP ของยีนตัวรับวิตามินดีจำนวน 6 ตำแหน่ง คือ Cdx-2, GATA, FokI, BsmI, ApaI และ TaqI ตรวจโดยใช้ TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) assay เพื่อศึกษาความแตกต่างของอัลลีล จีโนไทป์ และ haplotype ของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยและระยะตับอักเสบเรื้อรัง รวมถึง linkage disequilibrium (LD) mapping ได้รับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย haplotype inference application

ผลการศึกษา: การศึกษารวบรวมผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง 324 คนช่วงเดือน กุมภาพันธ์ถึงสิงหาคม พ.ศ.2563 แบ่งเป็นกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อย 163 คน และกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรัง 161 คน สัดส่วนของผู้ป่วยเพศชายในผู้ป่วยกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยน้อยกว่ากลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรังอย่างมีนัยยะสำคัญที่ร้อยละ 46.0 ต่อร้อยละ 68.3 ( $p < 0.001$ ) ค่าเฉลี่ยระดับวิตามินดีในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ สัดส่วนความถี่อัลลีล Cdx-2 ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรังของอัลลีล G (G allele) คิดเป็นร้อยละ 53.7 และ 62.7 ตามลำดับ สัดส่วนของอัลลีล A (A allele) คิดเป็นร้อยละ 46.3 และ 37.3 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ( $p < 0.019$ ) สัดส่วนความถี่จีโนไทป์ Cdx-2 พบ G/G จีโนไทป์ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยน้อยกว่ากลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรัง โดยพบร้อยละ 27.0 และ 41.0 ตามลำดับ ( $p < 0.028$ ) AA haplotype ของ Cdx-2/GATA และ AAC haplotype ของ Cdx-2/GATA/FokI สัมพันธ์กับกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยอย่างมีนัยยะสำคัญโดยมีอัตราส่วน odds 1.43 (1.04-1.96),  $p < 0.025$  และ 1.98 (1.34-2.91),  $p < 0.0019$  ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบหลายตัวแปรพบว่า G/A จีโนไทป์ของ Cdx-2 เป็นปัจจัยที่สัมพันธ์ระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยอย่างมีนัยยะสำคัญโดยมีอัตราส่วน odds ที่ปรับแล้ว 1.83 (95%CI 1.10 – 3.04) จาก Linkage disequilibrium (LD) triangular mapping พบว่า BsmI, ApaI และ TaqI มีค่าคะแนน LD (LD' score) สูง ( $D' > 0.8$ ) ทั้งในทั้งสองระยะ ในขณะที่ Cdx-2/GATA และ GATA/FokI พบคะแนน LD สูงเฉพาะในกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรัง

สรุปผล: G/A จีโนไทป์ของ Cdx-2 สัมพันธ์กับระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังชาวไทยอย่างมีนัยยะสำคัญ นอกจากนี้การศึกษาพบความแตกต่างของ LD ของ Cdx-2/GATA และ GATA/FokI ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรัง ซึ่งเป็นไปได้ว่าความแตกต่างของความหลากหลายของยีนตัวรับวิตามินดีนี้นำไปสู่ความแตกต่างของการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน

สาขาวิชา           อายุรศาสตร์  
ปีการศึกษา        2563

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6270049030 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: HBV inactive carrier (IC), vitamin D receptor (VDR) polymorphisms

Prooksa Ananchuensook : Vitamin D receptor polymorphism in HBV carrier with low viral load and chronic hepatitis phases; a case-control study. Advisor: Assoc. Prof. PIYAWAT KOMOLMIT, Ph.D. Co-advisor: Prof. Yong Poovorawan

Objectives: To demonstrate the association between vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and two clinical phases of chronic hepatitis B (CHB) infection; HBV inactive carrier (IC) and chronic hepatitis(CH).

Method: Patients with chronic HBV infection were enrolled. The IC phase was defined by HBV viral load (VL) < 2,000 IU/ml. The CH phase was defined as persistent HBV VL > 2,000 IU/ml with evidence of hepatic inflammation or fibrosis. Six common VDR genes' single nucleotide polymorphisms (SNP), including *CdX-2*, *GATA*, *FokI*, *BsmI*, *Apal*, and *TaqI*, were studied using TaqMan real-time PCR assay. The different outcomes in allele, genotype, and haplotype frequencies in between groups and linkage disequilibrium (LD) mapping were analyzed using a haplotype inference application.

Results: Among 324 enrolled patients, there were 163 patients in IC and 161 patients in CH phases. The proportion of male patients is lower in the IC group (46.0% vs. 68.3%,  $p < 0.001$ ). The mean vitamin D levels were not statistically different between groups. The proportion of alleles frequency of *CdX-2* in IC and CH was 53.7% and 62.7% for G allele, and 46.3% and 37.3% for A allele, which was statistically significant ( $p 0.019$ ). The proportion of GG genotype of *CdX-2* was less frequently found in patients with IC compared to patients with CH (27% vs 41%,  $p 0.028$ ). AA haplotype (*CdX-2/GATA*) and AAC haplotype (*CdX-2/GATA/FokI*) were significantly associated with IC with odd ratio (OR) 1.43 (1.04 – 1.96),  $p 0.025$  and OR 1.98 (1.34 – 2.91),  $p < 0.001$ , respectively. By multivariate analysis, *CdX-2* G/A genotypes was independently associated with IC, with adjusted OR 1.83 (1.10 – 3.04),  $p 0.019$ . The SNPs' LD mapping revealed high LD scores in *BsmI/Apal/TaqI* (BAT) haplotype in both groups while, *CdX-2/GATA* and *GATA/FokI* demonstrated high LD' score only in CH group.

Conclusion: The results suggest that *CdX-2* G/A genotypes was independently associated with IC status in Thai patients with chronic HBV infection. The difference in LD of the *CdX-2/GATA* and *GATA/FokI* haplotypes in between groups might result in the variation of immune control.

Field of Study: Medicine

Academic Year: 2020

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยเฉพาะรองศาสตราจารย์ดอกเตอร์นายแพทย์ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์ และศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรรณ ที่คอยให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ขอขอบพระคุณคณาจารย์หน่วยโรคระบบทางเดินอาหารทุกท่านที่ได้ให้โอกาสและสนับสนุนในการทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอบพระคุณพยาบาลและเจ้าหน้าที่ศูนย์โรคตับ หน่วยโรคระบบทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บข้อมูล เก็บตัวอย่างเลือดและขอบพระคุณผู้ป่วย ทุกท่านที่เสียสละเข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และคนใกล้ชิดที่คอยเป็นกำลังใจ ให้คำแนะนำ และสนับสนุนการทำงานวิจัยและการเรียนมาโดยตลอด

พฤษภา อนันต์ชื่นสุข



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย.....	1
1.2 คำถามงานวิจัย.....	3
1.3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	3
1.4 สมมุติฐาน (Hypothesis).....	3
1.5 กรอบความคิดการวิจัย (Conceptual framework).....	4
1.6 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definitions) .....	4
1.7 รูปแบบงานวิจัย .....	6
1.8 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ.....	6
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
1.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการการแก้ไข .....	7
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature review) .....	8
2.1 ไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และการแบ่งระยะของโรค.....	8
2.2 วิตามินดี และความสัมพันธ์กับโรคไวรัสตับอักเสบบี.....	11

2.3 ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน (single nucleotide polymorphism และ haplotypes).....	12
2.4 ตัวรับวิตามินดี (vitamin D receptor, VDR) และความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี (VDR polymorphism).....	13
2.5 ความเกี่ยวข้องของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับโรคต่าง ๆ และไวรัสตับอักเสบบี.....	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย .....	18
3.1 รูปแบบงานวิจัย .....	18
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย.....	18
3.3 การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่าง.....	19
3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	21
3.5 การรวบรวมข้อมูล.....	27
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติที่ใช้วิเคราะห์.....	28
3.7 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ.....	28
3.8 สถานที่ทำวิจัย .....	28
3.9 งบประมาณ .....	29
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	30
4.1 ลักษณะทางประชากรของผู้ป่วยกลุ่มศึกษา (Patients' characteristics).....	30
4.2 ความถี่อัลลีล (allele) ของ SNPs ตัวรับวิตามินดี .....	31
4.3 ความถี่จีโนไทป์ (genotype) ของ SNPs ตัวรับวิตามินดี.....	33
4.4 ความถี่ haplotype ของ SNPs ตัวรับวิตามินดี.....	36
4.5 ปัจจัยทำนายระยะพาหะชนิดเข็มน้อย .....	40
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	41
5.1 อภิปรายผลการวิจัย .....	41
5.2 สรุปผลการวิจัย.....	44



5.3 ข้อเด่นของการศึกษา.....	44
5.3 ข้อด้อยของการศึกษา.....	44
5.4 ข้อเสนอแนะ .....	45
บรรณานุกรม.....	46
ภาคผนวก.....	49
ภาคผนวก ก ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย .....	49
ภาคผนวก ข แบบบันทึกข้อมูล (Case Record Form).....	52
ภาคผนวก ค ความถี่อัลลีล จีโนไทป์ และ Haplotype ของทก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย <i>CdX-2, GATA, FokI, BsmI, ApaI</i> และ <i>TaqI</i> ในประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม.....	55
ภาคผนวก ง บทคัดย่อ รางวัล Poster of distinction งานประชุม Digestive Disease Week (DDW) 2021 (Virtual meeting, May 21-23, 2021).....	57
ภาคผนวก จ บทคัดย่อ รางวัล Poster presentation with bursary award งานประชุม The international liver congress 2021 (European Association for the Study of the Liver (EASL) 2021) (Virtual meeting, June 21-23, 2021).....	60
ประวัติผู้เขียน.....	63

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตารางแสดงความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายเมื่อผลเป็นบวก (positive predictive value, PPV) และ ค่าทำนายเมื่อผลเป็นลบ (negative predictive value, NPV) ของปริมาณ HBV DNA ในเลือดต่อการวินิจฉัยภาวะไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเขื่อน้อย .....	10
ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังและภาวะแทรกซ้อนในการศึกษาก่อนหน้านี้.....	16
ตารางที่ 3 ตารางแสดงลักษณะทางประชากรของผู้ป่วยกลุ่มศึกษาแบ่งเป็นกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง .....	30
ตารางที่ 4 ความถี่อัลลีลของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย CdX-2, GATA, FokI, BsmI, ApaI และ TaqI ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง.....	32
ตารางที่ 5 ความถี่จีโนไทป์ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย CdX-2, GATA, FokI, BsmI, ApaI และ TaqI ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง.....	34
ตารางที่ 6 ระดับวิตามินดีในเลือดแยกตามจีโนไทป์ของ CdX-2 ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง .....	35
ตารางที่ 7 ความถี่ Haplotype ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย CdX-2, GATA, FokI, BsmI, ApaI และ TaqI ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง.....	39
ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบตัวแปรเดียวและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบหลายตัวแปรของปัจจัยที่สัมพันธ์กับผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเขื่อน้อย.....	40
ตารางที่ 9 ความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย CdX-2, GATA, FokI, BsmI, ApaI และ TaqI ในประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม.....	55
ตารางที่ 10 ความถี่ Haplotype ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย CdX-2, GATA, FokI, BsmI, ApaI และ TaqI ในประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม .....	55



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปภาพที่ 1 แสดงกรอบความคิดการวิจัย .....	4
รูปภาพที่ 2 (A) ระยะเวลาติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ (6)) และ (B) การแบ่งกลุ่มโรคในวัยผู้ใหญ่ โดยยึดหลักของจำนวนไวรัส ภาวะการอักเสบของตับ HBeAg ผลระยะยาวของโรคตับ และการให้การรักษาด้วยยาต้านไวรัส.....	10
รูปภาพที่ 3 เมตาบอลิซึม (metabolism) ของวิตามินดี และผลการกระตุ้นผ่านตัวรับวิตามินดี โดยความแตกต่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีส่งผลให้เกิดความแตกต่างในปฏิกิริยาการตอบสนอง .....	12
รูปภาพที่ 4 ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมการทำงานของตัวรับวิตามิน ..	13
รูปภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล F ของ FokI กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	14
รูปภาพที่ 6 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน .....	22
รูปภาพที่ 7 ตัวอย่างเลือดหลังปั่นเหวี่ยงตกตะกอน .....	23
รูปภาพที่ 8 ตู้อบปรับอุณหภูมิ (incubator).....	23
รูปภาพที่ 9 เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ .....	24
รูปภาพที่ 10 เครื่อง real-time PCR (Applied Biosystems, NY, USA).....	25
รูปภาพที่ 11 ซอฟต์แวร์ QuantStudio™ (ViiA™7) สำหรับวิเคราะห์จีโนมไทป์.....	25

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย

ปัจจุบันทั่วโลกมีจำนวนของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีประมาณ 240 ล้านราย โดยมีรายงานการเสียชีวิต จากภาวะแทรกซ้อน จากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเช่น ตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ [Hepatocellular carcinoma (HCC)] มากกว่า 600,000 รายต่อปี สำหรับประเทศไทย ความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอยู่ที่ประมาณร้อยละ 6.4 หรือ มากกว่า 4 ล้านราย การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจึงเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญของประเทศไทยและทั่วโลก

ปัจจุบันแนวทางเวชปฏิบัติต่าง ๆ แบ่งระยะของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังออกเป็น 4 ระยะ คือ ระยะ immune tolerance ระยะ immune clearance ระยะ immune control หรือ inactive carrier และระยะ immune escape โดยประเมินจาก Hepatitis B e-antigen (HbeAg) ปริมาณไวรัสตับอักเสบบีในเลือด hepatitis B virus (HBV) DNA และ ระดับ alanine aminotransferase (ALT) ในเลือด

หากพิจารณาเฉพาะผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่ผ่านพ้นระยะ immune tolerance มาแล้ว พอจะสรุปได้เป็น 2 ระยะ โดยยึดหลักของจำนวนไวรัส ภาวะการอักเสบและความเสี่ยงในการเกิดภาวะแทรกซ้อนระยะยาว คือ เมื่อภาวะภูมิคุ้มกันสูง ร่างกายสามารถควบคุมไวรัสได้ จึงอยู่ในระยะพาหะชนิดเขื่อน้อย (HBV carrier with low viral load) ลักษณะทางคลินิก คือ มีเชื้อไวรัสน้อย ไม่มีการอักเสบของตับเกิดขึ้น ซึ่งผู้ป่วยในระยะนี้มีพยากรณ์โรคที่ดีกว่ากล่าวคือมีอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งตับและไวรัสตับอักเสบบีกำเริบ (HBV reactivation) น้อยกว่าผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีกลุ่มอื่นและมีโอกาสเกิดการตรวจไม่พบ (hepatitis B surface antigen (HBsAg) loss) โดยธรรมชาติร้อยละ 1-3 ต่อปี ส่วนกลุ่มที่ภูมิคุ้มกันไม่สูงพอ หรือ เมื่อไวรัส มีการต้านทานต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายผู้ป่วย (evading immune control) คือ ระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis) ซึ่งมีการต่อสู้ระหว่างไวรัส กับภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่เบ็ดเสร็จ ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับ ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบอย่างเรื้อรัง หากไม่ได้รับการรักษาด้วยยาที่เหมาะสม หลายปีผ่านไป โรคจึงเข้าสู่ระยะตับแข็ง หรือเกิดมะเร็งตับแทรกซ้อน ระยะตับอักเสบบีเรื้อรังจึงเป็นระยะที่กลุ่มที่แนวทางเวชปฏิบัติต่าง ๆ แนะนำให้ยาเพื่อการรักษา

จากหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และทางคลินิกถึงความเกี่ยวเนื่องของวิตามินดี (vitamin D, VD) กับความแตกต่างของภูมิคุ้มกันของร่างกาย ความสัมพันธ์ของจำนวนไวรัสในเลือดกับภาวะการขาดวิตามินดี ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของวิตามินดีผ่านตัวรับวิตามินดี (vitamin D receptor, VDR) กระตุ้นการถอดรหัส (transcription) ของ DNA นำไปสู่ความแตกต่างของภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยการควบคุมการทำงานของ ตัวรับวิตามินดีส่วนหนึ่งแปรผันไปตามความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีนตัวรับวิตามินดี

ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (gene polymorphism) คือ ความหลากหลายของลำดับเบสที่พบในประชากรมากกว่าร้อยละ 1 ของประชากร โดยไม่ทำให้เกิดความผิดปกติในสิ่งมีชีวิต แต่อาจจะสัมพันธ์กับการเกิดโรคหรือต่อผลของการรักษา โดยตำแหน่งของเบส 1 เบสที่ถูกแทนที่บริเวณเดียวกันบนลำดับเบสเรียกว่า single nucleotide polymorphism (SNP) และรูปแบบความแตกต่างของ SNP หลายตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า haplotype

การศึกษาก่อนหน้านี้มุ่งเน้นดูความสัมพันธ์และพบความสัมพันธ์ของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี (VDR polymorphism) กับปลายเหตุ เช่น การเกิดตับอักเสบรุนแรง (severe flare up hepatitis) ผู้ป่วยตับแข็งที่เป็นมากแล้ว (decompensated cirrhosis) หรือการเกิดมะเร็งตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ ความเกี่ยวเนื่องต่อการเกิดตับอักเสบรุนแรงในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งเป็นลักษณะปกติในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีและมักจะเกิดขึ้นก่อนการเปลี่ยนเข้าสู่ระยะพาหะชนิดเรื้อรัง ขึ้นกับว่าผู้ป่วยจะมีการแสดงหรือมีการตรวจพบโดยบังเอิญในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการหรือไม่ ฉะนั้นเป็นไปได้ว่า ความแตกต่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี อาจจะเป็นส่วนหนึ่งในหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อไวรัสตับอักเสบบี ที่มากขึ้นแตกต่างกัน และเป็นส่วนหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดลักษณะทางคลินิก (phenotype) ที่แตกต่างกันแต่แรก

ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาแสดงความสัมพันธ์ของความแตกต่างของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี กับสองลักษณะทางคลินิกคือกลุ่มผู้ป่วยระยะพาหะชนิดเรื้อรังและระยะตับอักเสบรวม การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาแรกที่พิสูจน์สมมุติฐานที่ว่าความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี ที่แตกต่างกันมีความสัมพันธ์ต่อภาวะภูมิคุ้มกันทำให้เกิดสองลักษณะทางคลินิก คือ (1) ระยะพาหะชนิดเรื้อรัง (2) ระยะตับอักเสบรวม

## 1.2 คำถามงานวิจัย

### คำถามงานวิจัยหลัก

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) ของยีนตัวรับวิตามินดีในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ระยะพาหะชนิดเชื่อน้อย (inactive carrier with low viral load) แตกต่างจากระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis) หรือไม่

Are single nucleotide polymorphisms (SNPs) of vitamin D receptor in patients with chronic HBV infection in inactive carrier with low viral load phase different from patients in chronic hepatitis phase?

### คำถามงานวิจัยรอง

Haplotypes ของยีนตัวรับวิตามินดีในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ระยะพาหะชนิดเชื่อน้อย (inactive carrier with low viral load) แตกต่างจากระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis) หรือไม่

Are haplotypes of vitamin D receptor in patients with chronic HBV infection in inactive carrier with low viral load phase different from patients in chronic hepatitis phase?

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

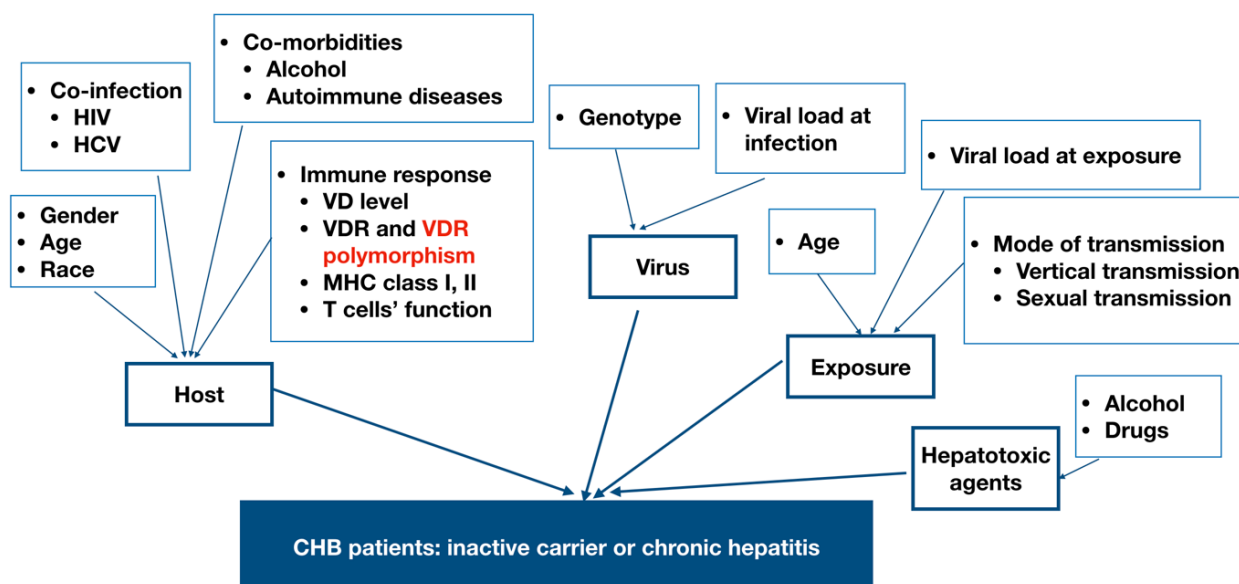
## 1.3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

การศึกษานี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับระยะของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังโดยแบ่งเป็นระยะพาหะชนิดเชื่อน้อย และระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง

## 1.4 สมมุติฐาน (Hypothesis)

ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีมีความเกี่ยวข้องกับกับระยะของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังโดยแบ่งเป็น ระยะพาหะชนิดเชื่อน้อยและระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง

### 1.5 กรอบความคิดการวิจัย (Conceptual framework)



รูปภาพที่ 1 แสดงกรอบความคิดการวิจัย

VDR; vitamin D receptor, VD levels; vitamin D level, CHB; chronic hepatitis B

### 1.6 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definitions)

- ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (patients with chronic HBV infection) คือ ผู้ป่วยที่ตรวจพบ hepatitis B surface antigen (HBsAg) ในเลือดไม่ต่ำกว่า 6 เดือน
- Hepatitis e antigen (HBeAg) คือ แอนติเจนในซีรัมของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง บ่งชี้ถึงความสามารถในการแพร่เชื้อ
  - ผลบวก (positive) คือ ตรวจพบ HBeAg ในซีรัมของผู้ป่วย
  - ผลลบ (negative) คือ ตรวจไม่พบ HBeAg ในซีรัมของผู้ป่วย
- Hepatitis B virus DNA/viral load คือ ปริมาณไวรัสตับอักเสบบีในเลือด หน่วยเป็น international unit/millilitre (IU/มล.) หรือ copies/millilitre (copies/มล.)

เนื่องจากค่าการทำงานของตับแสดงโดยระดับเอนไซม์ ALT สามารถแปรผันตามปัจจัยอื่น เช่น ค่าของ ALT สูงขึ้นจากการมีภาวะไขมันพอกตับชนิด non-alcoholic steatohepatitis ร่วมด้วย ใน



การศึกษานี้ที่ผู้วิจัยจึงกำหนดใช้ปริมาณของ HBV viral load เป็นหลักในการแบ่งกลุ่มผู้ป่วย ว่าเป็นระยะพาหะชนิดเชื้่น้อย (inactive carrier) หรือ ระยะด้บอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis) ดังนี้

- ผู้ป่วยไวรัสด้บอักเสบปีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเชื้่น้อย (HBV carrier with low viral load, inactive carrier) หมายถึง ผู้ป่วยไวรัสด้บอักเสบปีเรื้อรังที่ HBeAg เป็นลบและมีปริมาณ HBV DNA ในเลือดน้อยกว่า 2,000 IU/มล.
- ผู้ป่วยไวรัสด้บอักเสบปีเรื้อรังระยะด้บอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis) หมายถึง ผู้ป่วยไวรัสด้บอักเสบปีเรื้อรังที่มีปริมาณ HBV DNA ในเลือดมากกว่า หรือเท่ากับ 2,000 IU/มล. และระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ในเลือด มากกว่าค่าปกติ (>40 IU/, มล.) หรือ ระดับ ALT อยู่ในเกณฑ์ปกติแต่พบหลักฐานการอักเสบหรือพังผืดในด้บด้วยวิธีการต่าง ๆ ตามแนวทางเวชปฏิบัติ
- ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (gene polymorphism) หมายถึง ความหลากหลายของลำดับเบสที่พบในประชากรมากกว่าร้อยละ 1 ของประชากร โดยไม่ทำให้เกิดความผิดปกติในสิ่งมีชีวิต แต่อาจจะสัมพันธ์กับการเกิดโรคหรือต่อผลของการรักษา
  - Single nucleotide polymorphism (SNP) หมายถึง ตำแหน่งของเบส 1 เบสที่ถูกแทนที่บริเวณเดียวกันบนลำดับเบส
  - อัลลีล (allele) หมายถึง ลักษณะของหน่วยพันธุกรรมที่อยู่บนข้างหนึ่งของโครโมโซม ได้แก่
  - จีโนไทป์ (genotype) คือ ชนิดของยีนที่มาจับคู่กันและมีผลควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิต
  - Haplotype คือ รูปแบบความแตกต่างของ SNP หลายตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน
- เอ็กซอน (exon) คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนที่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน
- อินตรอน (intron) คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนที่ไม่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน
- ลักษณะทางคลินิก (phenotype) คือ ลักษณะที่ปรากฏออกมาให้เห็นได้
- ภาวะสมดุลของประชากร (the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)) คือ ประชากรขนาดใหญ่ มีการจัดคู่ผสมพันธุ์แบบสุ่ม (random mating) ยีนควบคุมลักษณะที่ศึกษาอยู่บนตำแหน่งออโตโซม (autosome) ไม่มีการกลายพันธุ์ (no mutation) ไม่มีการอพยพ (no migration) ไม่มีการคัดเลือก (no selection) และการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ดำเนินไปอย่างปกติ ซึ่งประชากรที่อยู่ในภาวะนี้จะมีความถี่อัลลีลและจีโนไทป์คงที่ในทุกรุ่น

- Linkage disequilibrium (LD) คือ ภาวะที่อัลลีลบางตัวของตำแหน่งหนึ่งมีแนวโน้มที่จะพบร่วมกับอัลลีลบางตัวของอีกตำแหน่งหนึ่ง

## 1.7 รูปแบบงานวิจัย

การศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุม (Case-control study)

## 1.8 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยย่อ

การศึกษารวบรวมผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังจากคลินิกโรคตับ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ อายุ 30-60 ปี โดยแบ่งเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยที่มี HBV DNA ในเลือด < 2,000 IU/มล. และกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรังที่มี HBV DNA ในเลือด  $\geq 2,000$  IU/ml และระดับ ALT ในเลือด > 40 IU/มล. หรือพบหลักฐานการอักเสบหรือพังผืดในตับ ผู้ทำการวิจัยทำการศึกษ SNP ของยีนตัวรับวิตามินดีจำนวน 6 ตำแหน่ง คือ *CdX-2*, *GATA*, *FokI*, *BsmI*, *Apal* และ *TaqI* ตรวจโดยใช้ TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) assay เพื่อศึกษาความแตกต่างของอัลลีล จีโนไทป์ และ haplotype ของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและระยะตับอักเสบเรื้อรัง รวมถึง linkage disequilibrium (LD) mapping ได้รับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย haplotype inference application (SHEsis software)

## 1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำความแตกต่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยแตกต่างจากระยะตับอักเสบเรื้อรังเพื่อ

1. เพื่อพิสูจน์สมมุติฐานทางวิทยาศาสตร์ที่น่าสนใจเกี่ยวกับวิตามินดีและการเกิดลักษณะของโรคที่แตกต่างกัน
2. อาจมีผลต่อการพยากรณ์โรค ถึงความเสี่ยงในการดำเนินโรคสู่ระยะที่มีภาวะแทรกซ้อนในระยะยาว
3. มีการศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วยที่มีการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง เช่น มะเร็งตับ และผู้ป่วยตับแข็งที่เป็นมากแล้ว

4. เริ่มมีการศึกษาวิจัยยากกลุ่มวิตามินดีที่ไม่ทำให้แคลเซียมในเลือดสูง (non-hypercalcemic vitamin D) ในการรักษาการโรคชนิดต่าง ๆ จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับลักษณะของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี กับลักษณะของโรคไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทย

#### 1.10 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการการแก้ไข

เนื่องจากความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีตรวจด้วยวิธี real-time PCR จากตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง จึงจำเป็นต้องขอเจาะเลือดจากผู้เข้าร่วมการวิจัย ทำให้ต้องมีการประชาสัมพันธ์ และเชิญชวนให้ผู้เข้าร่วมการวิจัยทราบถึงประโยชน์ของการศึกษานี้



## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

#### 2.1 ไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และการแบ่งระยะของโรค

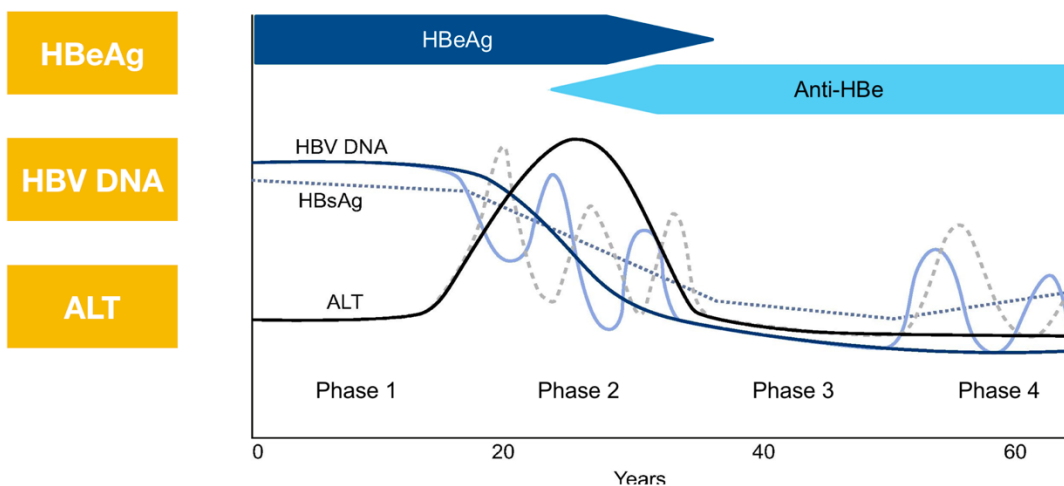
ปัจจุบันทั่วโลกมีจำนวนของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีประมาณ 240 ล้านราย โดยมีรายงานการเสียชีวิต จากภาวะแทรกซ้อน จากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเช่น ตับแข็ง และมะเร็งตับ มากกว่า 600,000 รายต่อปี สำหรับประเทศไทย ความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอยู่ที่ประมาณร้อยละ 6.4 หรือ มากกว่า 4 ล้านราย (1) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจึงเป็นหนึ่งในปัญหาที่สำคัญของประเทศไทยและทั่วโลก

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปริมาณไวรัสตับอักเสบบีในกระแสเลือดที่มากกว่า 2,000 IU/มล. หรือ 10,000 copies/มล. สัมพันธ์กับการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับ (2)(3) ซึ่งเป็นผลจากภาวะตับอักเสบจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีผ่าน Major histocompatibility complex (MHC) class I, MHC class II, เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอม (cytotoxic T cells) และ เม็ดเลือดขาวชนิดทีเฮลเปอร์ (helper T cells) โดยหลังการเกิดตับอักเสบเรื้อรังจะก่อให้เกิดพังผืดในตับ ตับแข็ง และมะเร็งตับ (4) จากข้อมูลดังกล่าว ปัจจุบันแนวทางเวชปฏิบัติต่าง ๆ แบ่งระยะของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังออกเป็น 4 ระยะ ดังแสดงในรูปภาพที่ 2 โดยประเมินจาก HBeAg ปริมาณ HBV DNA และ ระดับ ALT ในเลือด ระยะที่ 1 คือ immune tolerance เริ่มจากในวัยเด็ก ที่ได้รับเชื้อจากมารดาขณะคลอด มีโอกาสการติดเชื้อแบบเรื้อรังสูงหากไม่ได้รับวัคซีนป้องกัน ในระยะนี้จำนวนไวรัสบีในเลือดจะสูงมาก แต่ภูมิคุ้มกันของร่างกายอยู่ในลักษณะอดทนกับเชื้อไวรัส จึงไม่มีปฏิกิริยาซึ่งกันและกัน ตับจึงไม่มีการอักเสบแม้จะมีไวรัสจำนวนมากในเซลล์ตับ ระยะที่ 2 และ 4 เป็นระยะที่มีการอักเสบของตับ หรือใช้คำว่าระยะตับอักเสบเรื้อรังที่มี HBeAg เป็นบวก (chronic hepatitis B: HBeAg positive) (ระยะ 2) และระยะตับอักเสบเรื้อรังที่มี HBeAg เป็นลบ (chronic hepatitis B: HBeAg negative) (ระยะ 4) ซึ่งเป็นระยะที่มีจำนวนไวรัสสูงมากกว่า 2,000 IU/มล. (10,000 copies/มล.) ร่วมกับมีการอักเสบภายในตับ โดยอาจตรวจพบได้จาก ค่า ALT ที่สูงขึ้น หรือ ตรวจพบจากการเจาะตับ (liver biopsy) พบการอักเสบ หรือมีพังผืด (fibrosis) ในเนื้อตับ ส่วนระยะที่ 3 คือระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยนั้น ผู้ป่วยจะมีจำนวนไวรัสตับอักเสบบี น้อยกว่า 2,000 IU/mL (10,000 C/mL) ค่า ALT ในเลือดจะอยู่ในเกณฑ์ปกติ หากตรวจในเนื้อตับจะไม่พบการอักเสบหรือพังผืด อย่างไรก็ตามถือเป็นข้อปฏิบัติที่ยอมรับกันและเป็นข้อแนะนำในแนวทางเวชปฏิบัติต่าง ๆ คือ ระยะนี้ไม่จำเป็นต้องมีการเจาะตับ จะ

ทำก็ต่อเมื่อมีข้อสงสัยว่าผู้ป่วยอาจมีพังผืดมาก หรือเพื่อแยกจากโรคอื่น ๆ ผู้ป่วยในระยะพาหะชนิด  
 เชื้อน้อยในปัจจุบัน ไม่เป็นข้อบ่งชี้ในการให้ยารักษา เนื่องจากภาวะแทรกซ้อนในระยะยาวต่ำกว่าระยะ  
 ตับอักเสบเรื้อรังมาก (5)(6)

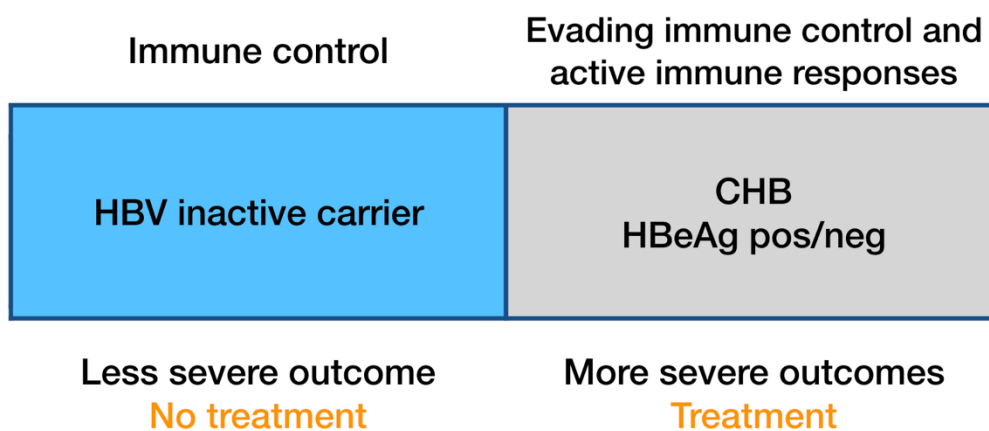
เนื่องจากค่าการทำงานของตับแสดงโดยระดับเอนไซม์ ALT สามารถแปรผันตามปัจจัยอื่น  
 เช่นภาวะเมแทบอลิกซินโดรม จึงนิยามผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเชื้อน้อยตาม  
 ปริมาณ HBV DNA ในเลือดเป็นหลัก ทั้งนี้ความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่า  
 ทำนายเมื่อผลเป็นบวก (positive predictive value, PPV) และ ค่าทำนายเมื่อผลเป็นลบ(negative  
 predictive value, NPV) ของHBV VL ต่อการวินิจฉัยภาวะไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิด  
 เชื้อน้อยดังแสดงในตารางที่ 1 (7) อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยฉบับนี้ มุ่งสืบค้นเฉพาะผู้ป่วยไวรัสตับ  
 อักเสบบีติดเชื้อแบบเรื้อรังที่มีภูมิคุ้มกันที่สามารถควบคุมไวรัสตับอักเสบบีโดยดูจากจำนวนไวรัสเป็น  
 หลัก เนื่องจากเหตุผลของความแปรผันของระดับ ALT ด้วยสาเหตุแทรกซ้อนอื่น ๆ เช่น ภาวะไขมัน  
 พอกตับ ดังกล่าวข้างต้น

(A)



Immune tolerance	Immune clearance	Inactive Carrier	Immune reactivation
HBeAg-positive chronic HBV infection	HBeAg-positive chronic hepatitis	HBeAg-negative chronic HBV infection	HBeAg-positive chronic hepatitis

(B)



รูปภาพที่ 2 (A) ระยะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ (6)) และ (B) การแบ่งกลุ่มโรคในวัยผู้ใหญ่ โดยยึดหลักของจำนวนไวรัส ภาวะการอักเสบของตับ HBeAg ผลระยะยาวของโรคตับ และการให้การรักษาด้วยยาต้านไวรัส

ตารางที่ 1 ตารางแสดงความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายเมื่อผลเป็นบวก (positive predictive value, PPV) และ ค่าทำนายเมื่อผลเป็นลบ (negative predictive value, NPV) ของปริมาณ HBV DNA ในเลือดต่อการวินิจฉัยภาวะไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเชื่อน้อย

	Copies/ มล.	ความไว (ร้อยละ)	ความจำเพาะ (ร้อยละ)	ค่าทำนายเมื่อผล เป็นบวก (ร้อยละ)	ค่าทำนายเมื่อผล เป็นลบ (ร้อยละ)
ปริมาณ HBV	≤5,000	100	75.4	100	84
DNA ในเลือด	≤20,000	100	95.1	100	99

หากพิจารณาเฉพาะผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่ผ่านพ้นระยะ immune tolerance มาแล้ว พอจะสรุประยะของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังได้เป็น 2 ระยะ (ภาพที่ 1B) โดยยึดหลักของภาวะภูมิคุ้มกันต้านทานของร่างกายต่อไวรัส จำนวนไวรัส ภาวะการอักเสบของตับ และความเสี่ยงในการเกิดภาวะแทรกซ้อนระยะยาว และการรักษา คือ กลุ่มแรกเมื่อภาวะภูมิคุ้มกันต้านทานสูง ร่างกายสามารถควบคุมไวรัสได้จึงอยู่ในระยะ “พาหะชนิดเชื่อน้อย (HBV carrier with low viral load)” ลักษณะทางคลินิกคือ มีเชื้อไวรัสน้อยกว่า 2,000 IU/mL (10,000 C/mL) ไม่มีการอักเสบของตับเกิดขึ้น ส่วนกลุ่มที่สองคือ กลุ่มที่ภูมิคุ้มกันต้านทานไม่สูงพอ หรือ เมื่อไวรัสมีการต้านทานต่อภูมิคุ้มกันต้านทานของร่างกายผู้ป่วย (evading

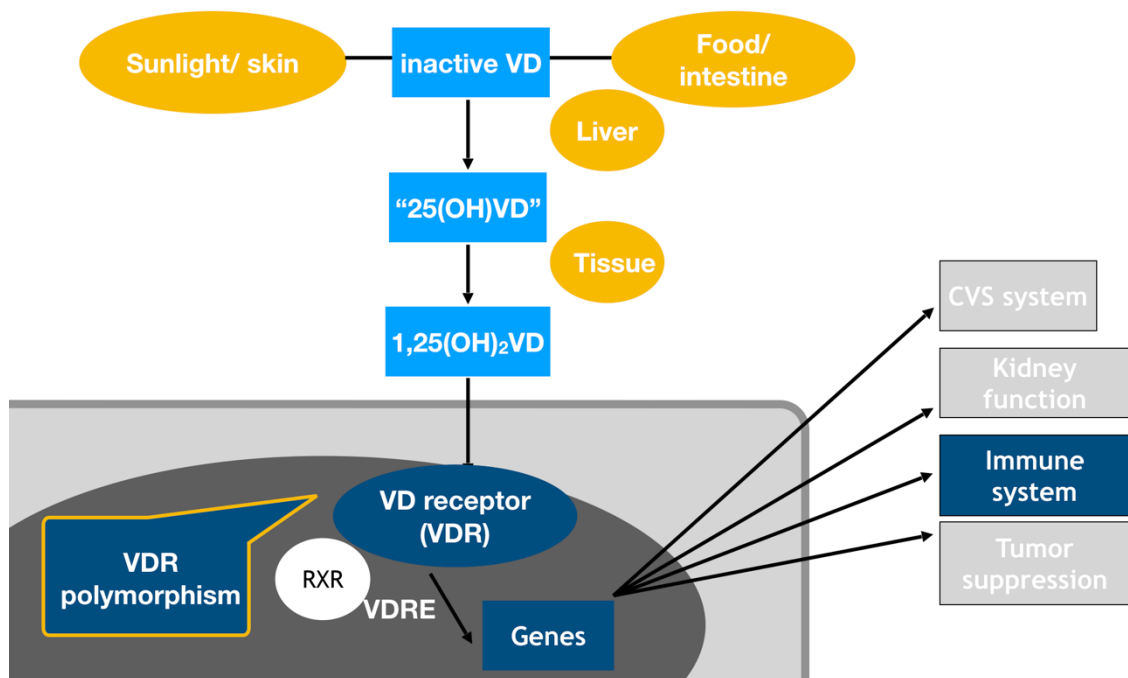
immune control) อยู่นี้ คือ “**ระยะตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis)**” อาจจะมีหรือไม่มี HBeAg ก็ตาม เนื่องจากการต่อสู้ระหว่างไวรัส กับภูมิคุ้มกันต้านทานอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่เบ็ดเสร็จ ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับ ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบอย่างเรื้อรัง เกิดพังผืดตามมา หากไม่ได้รับการรักษาด้วยยาที่เหมาะสม หลายปีผ่านไป โรคจึงเข้าสู่ระยะตับแข็ง หรือเกิดมะเร็งตับแทรกซ้อน ระยะตับอักเสบเรื้อรังจึงเป็นระยะที่แนะนำให้ยาเพื่อการรักษาตามแนวทางเวชปฏิบัติต่าง ๆ (5)(6)

## 2.2 วิตามินดี และความสัมพันธ์กับโรคไวรัสตับอักเสบบี

มีการศึกษาที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับวิตามินดีในเลือดและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง โดยจากการศึกษาวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta-analysis) รวบรวม 7 การศึกษาพบว่าระดับวิตามินดีในเลือดในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (pooled mean difference -2.03 มก./มล. (95%CI -2.60, -1.46)) และแปรผกผันกับปริมาณ HBV DNA ในเลือด (8) นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องวิตามินดี (vitamin D insufficiency) โดยมีระดับ 25(OH) vitamin D ในเลือดน้อยกว่า 30 มก./มล. มีการตอบสนองต่อการรักษา (virological response) ด้วย telbivudine ที่สัปดาห์ที่ 104 คิดเป็นร้อยละ 67.2 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ขาดวิตามินดีคิดเป็นร้อยละ 81.7 ซึ่งต่ำกว่าอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) (9) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากความเกี่ยวเนื่องของวิตามินดี กับภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อไวรัสตับอักเสบบี

ร่างกายได้รับวิตามินดีจากสองแหล่ง คือ 7-dehydrocholesterol ผ่านการสร้างจากผิวหนัง และการควบคุมจากรังสียูวีบี (UVB) และวิตามินดี 2/3 จากอาหารดูดซึมผ่านลำไส้เล็ก จากนั้นเปลี่ยนเป็น 25-hydroxyvitamin D [25(OH) VD] ที่ตั้งซึ่งเป็นรูปแบบที่สามารถตรวจวัดได้ในเลือด และเปลี่ยนเป็นรูปลูกฤทธิ์ (active form) คือ 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH) VD] ที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมถึงที่ทราบกันจากการศึกษาในอดีต คือ ที่ไต 1,25(OH)VD จับกับตัวรับวิตามินดี และจากนั้นตัวรับวิตามินดี จะจับกับตัวรับ retinoid X (retinoid X receptor, RXR) ในนิวเคลียสของเซลล์กลายเป็น heterodimer แล้วจับกับส่วนบริเวณควบคุมการแสดงออกของยีน (promotor) บริเวณตำแหน่งที่เรียกว่า vitamin-D-responsive element (VDRE) มีผลต่อการกระตุ้นการถอดรหัส (transcription) ของ DNA สร้างเป็นสาย messenger RNA (mRNA) และ โปริตีนที่ควบคุมการทำงานในหลายส่วนของร่างกาย ทั้งการทำงานของไต ระบบหัวใจและหลอดเลือด การ

เจริญเติบโตของเซลล์ และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งยืนกลุ่มหลังนี้ มีหลักฐานสนับสนุนว่ามีผลต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (10)(11) กระบวนการทั้งหมดแสดงดังรูปภาพที่ 3 การควบคุมการทำงานตัวรับวิตามินดีของส่วนหนึ่งแปรผันไปตามความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี



รูปภาพที่ 3 เมตาบอลิซึม (metabolism) ของวิตามินดี และผลการกระตุ้นผ่านตัวรับวิตามินดี โดยความแตกต่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีส่งผลให้เกิดความแตกต่างในปฏิกริยาการตอบสนอง

VD; Vitamin D, VDR; vitamin D receptor, RXR; retinoid X receptor, VDRE; vitamin-D-responsive element

### 2.3 ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน (single nucleotide polymorphism และ haplotypes)

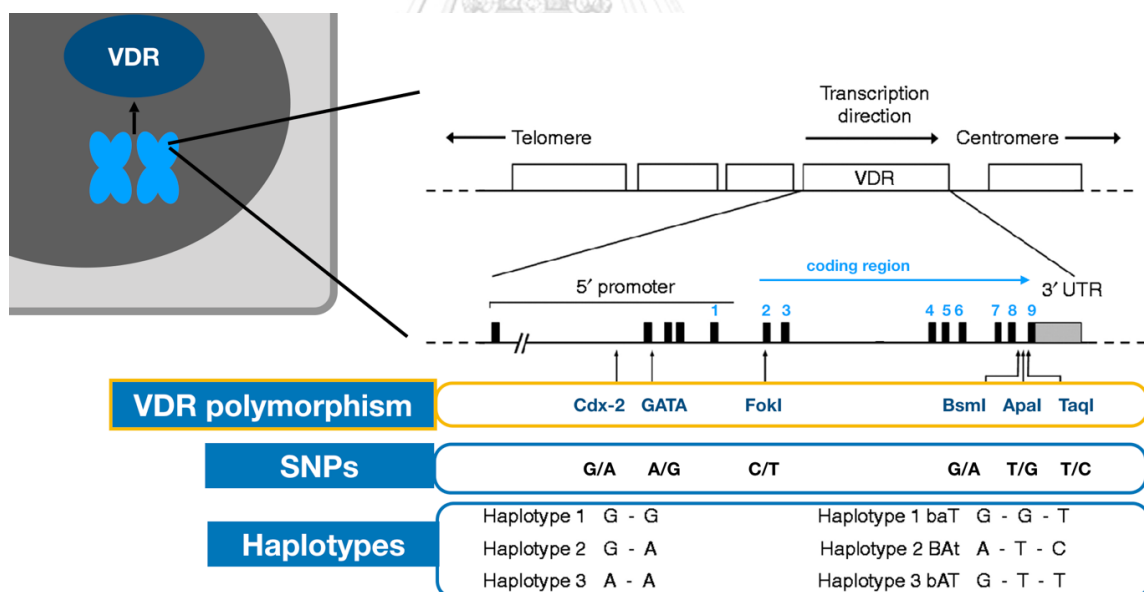
ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมคือความหลากหลายของลำดับเบสที่พบในประชากรมากกว่าร้อยละ 1 ของประชากร โดยไม่ทำให้เกิดความผิดปกติในสิ่งมีชีวิต แต่อาจจะสัมพันธ์กับการเกิดโรคหรือต่อผลของการรักษา โดยตำแหน่งของเบส 1 เบสที่ถูกแทนที่บริเวณเดียวกันบนลำดับเบสเรียกว่า



single nucleotide polymorphism (SNP) และรูปแบบความแตกต่างของ SNP หลายตำแหน่งที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า haplotype

## 2.4 ตัวรับวิตามินดี (vitamin D receptor, VDR) และความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี (VDR polymorphism)

ยีนตัวรับวิตามินดีอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 ในบริเวณแขนข้างยาว (long arm) ตำแหน่งที่ 13 (12q13) ประกอบด้วย 14 เอ็กซอน เรียงตามลำดับ 1 – 9 เอ็กซอน ในส่วนของเอ็กซอน exon 1 แบ่งเป็น 1a–1f และ SNP ของตัวรับวิตามินดีซึ่งได้รับการศึกษาเป็นส่วนใหญ่มีทั้งหมด 6 ตำแหน่ง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการทำงานของยีน และผลต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ประกอบด้วย Cdx-2 และ GATA อยู่บริเวณควบคุมการแสดงออกของยีนตัวรับวิตามินดี *FokI* อยู่บริเวณเอ็กซอน *BsmI* และ *Apal* อยู่ในส่วนของอินตรอนระหว่าง เอ็กซอน 8-9 ส่วน *TaqI* อยู่บริเวณเอ็กซอน 9 (12) ดังแสดงในรูปภาพที่ 4



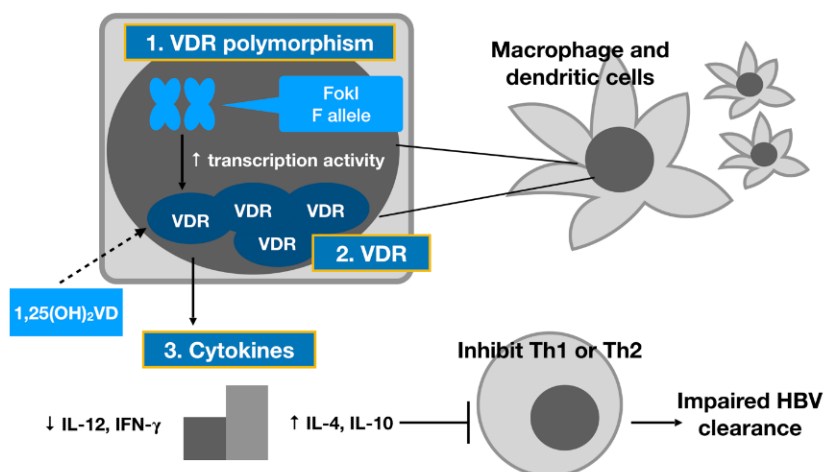
รูปภาพที่ 4 ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมการทำงานของตัวรับวิตามิน VDR; Vitamin D receptor, SNP; single nucleotide polymorphism, A; Adenosine, T; Thymine, C; Cytosine, G; Guanine

## 2.5 ความเกี่ยวข้องของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับโรคต่างๆ และไวรัสตับอักเสบบี

ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาที่แสดงความเกี่ยวข้องระหว่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับโรคต่างๆ เช่น ภาวะไตวาย การเกิดนิ่วในไต ภาวะพาราไทรอยด์ฮอร์โมนสูงแบบทุติยภูมิ (secondary hyperparathyroidism) มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเต้านม มะเร็งผิวหนังเมลาโนมา เบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 ความดันโลหิตสูง โรคภูมิแพ้ตนเอง (autoimmune disease) และการติดเชื้อวัณโรค (13)

การศึกษาที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง พบการศึกษาวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta-analysis) รวบรวม 15 การศึกษาตีพิมพ์ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 พบ SNP ชนิด *FokI* รูปแบบ FF เป็นปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง โดยมีอัตราส่วนออก (odds ratio (OR) 1.54 (p-value < 0.01) เมื่อเทียบกับ SNP ชนิด *FokI* รูปแบบ ff (14)

การศึกษานี้ได้พยายามอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล F กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดย F อัลลีล ของ *FokI* มีผลเกิดการถอดรหัสโปรตีน นำไปสู่การสร้างตัวรับวิตามินดีเพื่อจับกับวิตามินดีมากขึ้น ทำให้มีการผลิตไซโตไคน์ (cytokine) interleukin-4 (IL-4) และ IL-10 มากขึ้น ในขณะที่ IL-12 และ interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) น้อยลง ส่งผลยับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดทีเฮลเปอร์ 1 (T-helper 1) และทีเฮลเปอร์ 2 ทำให้ไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้ (14) แสดงดังรูปภาพที่ 5



รูปภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล F ของ *FokI* กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

VDR; Vitamin D receptor, VD; Vitamin D, IL; interleukin, Th1; T helper1, Th2; T helper2

ความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีและการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังแล้ว ยังมีการศึกษาอื่นๆเพื่อแสดงความสัมพันธ์ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีและลักษณะทางคลินิกและภาวะแทรกซ้อนของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ดังนี้

จากการศึกษาของ Chatzidaki และคณะ เป็นการศึกษาย้อนหลังในประเทศกรีซหาความสัมพันธ์ระหว่าง VDR polymorphism และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากแม่สู่ลูก (mother to child transmission) โดยแบ่งเด็กแรกเกิดจากแม่ที่มี HBsAg เป็นบวกออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเด็กที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังจำนวน 33 คน กลุ่มเด็กที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 36 คนและกลุ่มเด็กที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 33 คน พบอัลลีลเอของ *Apal* ในกลุ่มเด็กที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังมากกว่ากลุ่มเด็กที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี คิดเป็นความเสี่ยงสัมพัทธ์ (relative risk, RR) 1.27 [95% confident interval (CI) 0.95-1.67, p 0.071] และพบ a/T haplotype ของ *Apal* และ *TaqI* ในกลุ่มเด็กที่หายจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมากกว่ากลุ่มเด็กที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังคิดเป็นความเสี่ยงสัมพัทธ์ 1.74 (95% CI 0.97-3.13, p 0.049) (15)

จากการศึกษาของ Mostafa-Hedeab และคณะ ศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประเทศอียิปต์จำนวน 200 คนที่ได้รับการรักษาด้วย pegylated interferon- $\gamma$ 2a 180 ไมโครกรัม ต่อกิโลกรัมเป็นเวลา 48 สัปดาห์ พบว่า SNP *FokI* และ bAt haplotype มีความสัมพันธ์กับปริมาณ HBV DNA ในเลือดที่สัปดาห์ที่ 48 ของการรักษาโดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.919, p 0.037 และ 0.926, p 0.043 ตามลำดับ (16) นอกจากนี้การศึกษาจากประเทศจีนในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่มี HBeAg เป็นลบ 119 คนได้รับการรักษาด้วย pegylated interferon เป็นเวลานาน 48 สัปดาห์พบว่าอัลลีลเอของ *Apal* สัมพันธ์กับการเกิด HBsAg loss ภายหลังการรักษา คิดเป็นอัตราส่วนออก 1.821, p-value 0.042 (17)

ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกับความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี พบสองการศึกษาคือการศึกษาโดย Peng และคณะ ในประเทศจีนเปรียบเทียบผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มีมะเร็งตับ 184 คนและผู้ป่วยสุขภาพดีในกลุ่มควบคุม 180 คนพบว่า อัลลีลทีและจีโนไทป์ CT และ TT ของ *FokI* พบมากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งตับคิดเป็นอัตราส่วนออก 1.49, p 0.022, อัตราส่วนออก 1.73, p 0.057 และ อัตราส่วนออก 2.15, p 0.032 ตามลำดับ (18) การศึกษาโดย Yao และคณะในประเทศจีนเปรียบเทียบผู้ป่วยไวรัสตับ

อีกเสบปีเรื้อรังที่มีมะเร็งระดับ 436 คนและผู้ป่วยที่ไม่มีมะเร็งระดับ 532 คนพบว่า อัลลีลทีและจีโนไทป์ CT และ TT ของ *FokI* พบมากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งระดับคิดเป็นอัตราส่วนออก 1.451,  $p < 0.001$ , อัตราส่วนออก 1.451,  $p 0.016$  และอัตราส่วนออก 2.269,  $p 0.006$  ตามลำดับ (19)

นอกจากนี้การศึกษาแบบ cohort โดย Huang และคณะในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบ บีเรื้อรังในประเทศไต้หวันจำนวน 250 คน ศึกษาความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีบริเวณ SNP *BsmI*, *Apal*, *TaqI* พบรูปแบบ SNP B/b และ haplotype B/a, B/T, B/a/T น้อยกว่าในกลุ่มที่มีตับอักเสบและ พบรูปแบบ SNP B/b, B/B, T/t และ haplotype b/A, B/a, B/A, B/T, B/t, A/t, b/A/T, B/a/T, B/A/T, B/A/t, b/A/t มากกว่าในกลุ่มที่ตรวจพบ HBeAg อย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดมะเร็งระดับและความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี (20)

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บีเรื้อรังและภาวะแทรกซ้อนในการศึกษาก่อนหน้านี้

ภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บีเรื้อรังและภาวะแทรกซ้อน	ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีในการศึกษาก่อนหน้านี้
ความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี	SNP <i>FokI</i>
การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บีจากแม่สู่ลูก	SNP <i>Apal</i> และ haplotype aT
การตอบสนองต่อการรักษาด้วย pegylated interferon	SNP <i>FokI</i> และ haplotype bAt SNP <i>Apal</i>
มะเร็งตับ	SNP <i>FokI</i>
การเกิดตับอักเสบจากตับอักเสบ บีกำเริบและ HBeAg เป็นบวก	SNP <i>BsmI</i> , <i>Apal</i> , <i>TaqI</i> และ haplotype BaT

HBeAg; hepatitis B antigen, SNP; single nucleotide polymorphism

การศึกษาก่อนหน้านี้มุ่งเน้นดูความสัมพันธ์และพบความสัมพันธ์ของความแปรผัน  
หลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับปลายเหตุ เช่น การเกิดตับอักเสบจากตับอักเสบบี  
กำเริบ ผู้ป่วยตับแข็งที่เป็นมากแล้ว (decompensated cirrhosis) หรือ การเกิดมะเร็งตับ โดยเฉพาะ  
อย่างยิ่งคือความเกี่ยวเนื่องต่อการเกิดตับอักเสบจากตับอักเสบบีกำเริบในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี  
เรื้อรัง ซึ่งเป็นลักษณะปกติในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี และมักจะเกิดขึ้นก่อนการเปลี่ยนเข้าสู่ระยะ  
พาหะชนิดเขื่อน้อยขึ้นกับว่าผู้ป่วยจะมีอาการแสดงหรือมีการตรวจพบโดยบังเอิญในผู้ป่วยที่ไม่มี  
อาการหรือไม่ ฉะนั้นเป็นไปได้ว่า ความแตกต่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับ  
วิตามินดีอาจจะเป็นส่วนหนึ่งในหลายปัจจัย ที่ส่งผลต่อภาวะภูมิคุ้มกันต้านทานของร่างกายต่อไวรัสตับ  
อักเสบบี ที่มากขึ้นแตกต่างกัน และเป็นส่วนหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดลักษณะทางคลินิกที่แตกต่างกันแต่  
แรก

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาแสดงความสัมพันธ์ของความแตกต่างของความแปรผันหลากหลาย  
ทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับสองลักษณะทางคลินิกคือผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่ม  
ผู้ป่วยระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาหา  
ความสัมพันธ์ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับระยะของการติดเชื้อ  
ไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังโดยแบ่งเป็น (1) ระยะพาหะชนิดเขื่อน้อย และ (2) ระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบงานวิจัย

Case-control study

#### 3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยไวรัสตับอักขี้เรื้อรัง นิยามโดยตรวจพบ HBsAg ในเลือดไม่ต่ำกว่า 6 เดือน

วิธีการเข้าถึงอาสาสมัคร

ผู้ป่วยคลินิกโรคตับ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามศึกษา (Inclusion criteria)

1. อายุ 30-60 ปี
2. เป็นผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง นิยามโดย HBsAg positive 2 ครั้งห่างกัน 6 เดือน

โดยแบ่งเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ 2 กลุ่มคือ

- 1) ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อย (HBV carrier with low viral load, inactive carrier) คือ ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มีปริมาณ HBV DNA ในเลือดน้อยกว่า 2,000 IU/มล.
- 2) ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis) คือ ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มีปริมาณ HBV DNA ในเลือดมากกว่า หรือเท่ากับ 2,000 IU/มล. และระดับเอนไซม์ ALT ในเลือด มากกว่าค่าปกติ (มากกว่า 40 IU/มล.) หรือ พบหลักฐานการอักเสบหรือพังผืดในตับด้วยวิธีการต่าง ๆ ตามแนวทางเวชปฏิบัติ

ในกรณีผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา แบ่งกลุ่มปริมาณ HBV DNA ในเลือดก่อนได้รับการรักษา

ทั้งนี้การคัดกรอง (Screening) ผู้เข้าร่วมการวิจัยไม่เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัย

เกณฑ์ในการคัดเลือกรอกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยตั้งครรภ์

2. ผู้ป่วยมะเร็ง (cancers) ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ได้รับความยากดภูมิ ผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันตนเองชนิดต่าง ๆ เป็นต้น และผู้ป่วยติดเชื้อระยะแพร่กระจาย (active infection)
3. ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีหรือเอชไอวีร่วมด้วย (HCV or HIV co-infection)
4. ผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อตับอักเสบบีเรื้อรัง ได้แก่ ผู้ป่วยตับแข็งที่เป็นมาอยู่แล้วและมะเร็งตับ
5. ไม่ยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย

ทั้งนี้ใช้ตัวอย่างสารพันธุกรรมจีโนม (whole genome) จากผู้บริจาคโลหิตสุ่มจากภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยซึ่งคาดว่าเป็นอาสาสมัครสุขภาพดีและไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังเพื่อทดสอบสมการฮาร์ดี-ไวน์เบอร์ก

### 3.3 การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่าง

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาแสดงความเกี่ยวข้องของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีและระยะของการติดเชื้อตับอักเสบบีเรื้อรังโดยแบ่งเป็น ระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและระยะตับอักเสบบี จึงคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างจากการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประเทศได้หวั่น โดยอ้างอิงกลุ่มที่มีตับอักเสบบีจากตับอักเสบบีกำเริบ ซึ่งมีลักษณะทางคลินิกและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันใกล้เคียงกับระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและระยะตับอักเสบบีเรื้อรังมากที่สุด ผลการศึกษาพบว่า SNPs *Apai A/A* ในกลุ่มที่มีตับอักเสบบีจากตับอักเสบบีกำเริบร้อยละ 40.9 และกลุ่มที่ไม่มีตับอักเสบบีร้อยละ 26.7 (p-value 0.009) โดยมีขนาดกลุ่มตัวอย่างในกลุ่มที่มีตับอักเสบบี 93 รายและในกลุ่มที่ไม่มีตับอักเสบบี 120 ราย (21) จากสมการดังแสดงคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างกลุ่มละ 155 ราย โดยกำหนด อำนาจการทดสอบ (power) ที่ 80% และความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ (2-sided significant level) ที่ 5%

$$n_{case} = \left[ \frac{z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\bar{p}\bar{q}(1+\frac{1}{r})} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1 q_1 + \frac{p_2 q_2}{r}}}{\Delta} \right]^2$$

$$p_1 = P(\text{exposure}|\text{case}), q_1 = 1 - p_1$$

$$p_2 = P(\text{exposure}|\text{control}), q_2 = 1 - p_2$$

$$\bar{p} = \frac{p_1 + p_2 r}{1+r}, \bar{q} = 1 - \bar{p}, r = \frac{n_{control}}{n_{case}}$$

$$p_1 = \frac{p_2 OR}{1 + p_2 (OR - 1)}$$

- P (exposure | case) = a probability of subjects in a case group were exposed
- P (exposure | control) = a probability of subjects in a control group were exposed
- Ratio (case | control) = a ratio between number of cases and number of controls
- Alpha = a significant level
- Beta = a type II error probability

โดยมีกลุ่มประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม 300 คน เพื่อทดสอบมาตรฐานของกลุ่มประชากรตามสมการฮาร์ดี-ไวน์เบอร์ก (Hardy-Weinberg equation) ประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุมนั้น ประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุมนั้นได้จากกลุ่มผู้บริจาคเลือดซึ่งไม่มีการติดเชื้อมีอักเสบบีและซี และอนุมานได้ว่าแข็งแรงดี

ทั้งนี้สมการฮาร์ดี-ไวน์เบอร์ก คือสมการเพื่อคำนวณการแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรในภาวะสมดุลของประชากร เมื่อศึกษาตำแหน่งหนึ่งบนยีน (genetic locus) ซึ่งมี 2 อัลลีลยกตัวอย่างเช่น อัลลีล A และ a สมการฮาร์ดี-ไวน์เบอร์ก คือ

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

โดย p แทนความถี่ของอัลลีล A, q แทนความถี่ของอัลลีล a,  $p^2$  แทนความถี่ของจีโนไทป์ AA,  $q^2$  แทนความถี่ของจีโนไทป์ aa และ  $2pq$  แทนความถี่ของจีโนไทป์ Aa



นอกจากนี้ผลรวมของ allele ทุกตัว ณ ตำแหน่งหนึ่งบนยีนต้องมีค่าเท่ากับ 1 ( $p + q = 1$ ) ดังนั้นเมื่อทราบความถี่ของอัลลีล (ค่า  $p$  และ  $q$ ) จะสามารถคำนวณความถี่ของจีโนไทป์ได้จากสมการฮาร์ดี-ไวน์เบอร์ก

ในการศึกษานี้ใช้สมการฮาร์ดี-ไวน์เบอร์กเพื่อทดสอบความถี่ของจีโนไทป์ในการศึกษา แตกต่างจากค่าที่คำนวณได้จากสมการหรือไม่ เพื่อทดสอบว่ากลุ่มประชากรที่เลือกมาศึกษาอยู่ในภาวะสมดุลหรือไม่

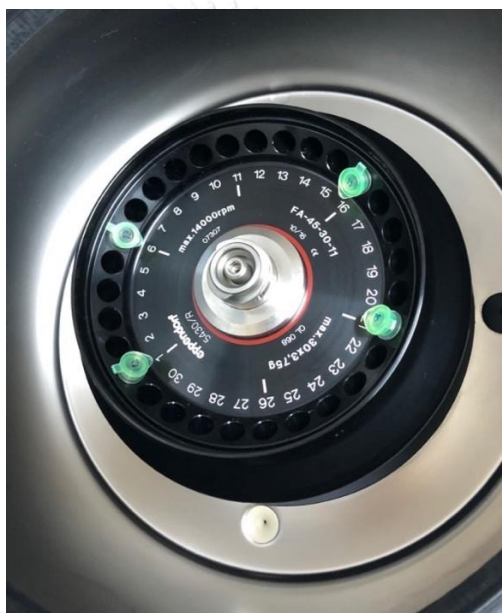
### 3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. แพทย์ผู้ทำวิจัยรวบรวมกลุ่มประชากรตัวอย่างโดยคัดกรองฐานข้อมูลผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี เรื้อรังที่ตรงตามเกณฑ์คัดเลือกเข้าและคัดเลือกออกในคลินิกโรคตับ ภาปร 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (ออกตรวจทุกวันพฤหัสบดี เวลา 8.00-16.00 น.) และคลินิกอายุรกรรม ภาปร 1 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. แพทย์ผู้ทำวิจัยอธิบายข้อมูลให้กับอาสาสมัครและแจกเอกสารข้อมูลและแบบขอความยินยอมให้ อาสาสมัครนำกลับไปพิจารณาก่อนตัดสินใจ โดยใช้สถานที่คลินิกโรคตับ ภาปร 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (ออกตรวจทุกวันพฤหัสบดี เวลา 8.00-16.00 น.) และคลินิกอายุรกรรม ภาปร 1 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
3. ผู้ป่วยให้ความยินยอมเข้าร่วมการวิจัย
4. การเก็บตัวอย่างเลือด โดยเก็บเลือด EDTA 6 มิลลิลิตร clotted blood 6 มิลลิลิตร
5. ปั่นแยกตัวอย่างเลือดด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน เพื่อแยกพลาสมาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ความเร็วรอบมากกว่า 1,500 xg เป็นเวลา 10 นาที
6. เก็บตัวอย่างชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) 200 ไมโครลิตรหลังจากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

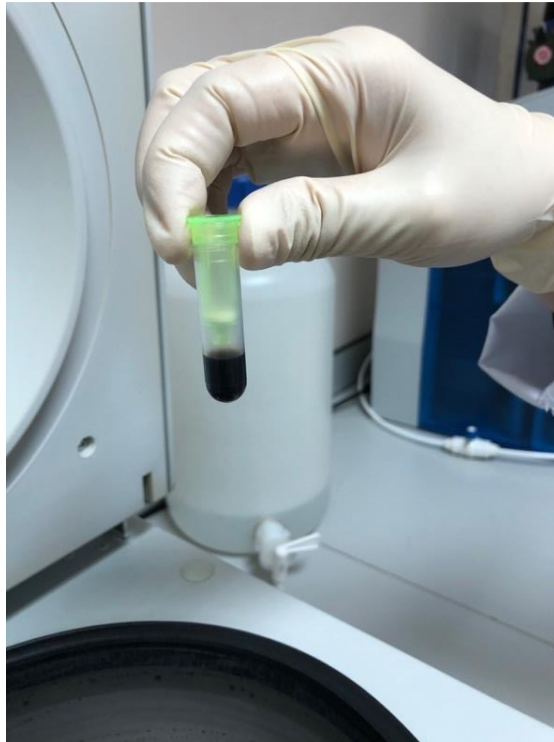
การสกัดดีเอ็นเอ (DNA) โดยชุดอุปกรณ์ Exgene (Exgene kit, Cat No.106-101)

1. ผสมชั้นเม็ดเลือดขาว 200 ไมโครลิตรกับสารละลาย protein kinase K 20 ไมโครลิตร
2. ผสมตัวอย่างจากข้อหนึ่ง 200 ไมโครลิตรกับ buffer BL 200 ไมโครลิตร ไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
3. เติมนีเอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบมากกว่า 6,000 xg เป็นเวลา 1 นาที

4. เติมbuffer BW 600 ไมโครลิตร หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบมากกว่า 6,000 xg เป็นเวลา 1 นาที
5. เติมbuffer TW 700 ไมโครลิตร หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบมากกว่า 6,000 xg เป็นเวลา 1 นาทีและมากกว่า 13,000 xg เป็นเวลา 1 นาที
6. เติมbuffer AE 200 ไมโครลิตร ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบมากกว่า 13,000 xg เป็นเวลา 1 นาที
7. ได้สารสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (pure genomics DNA) สำหรับขั้นตอนต่อไป



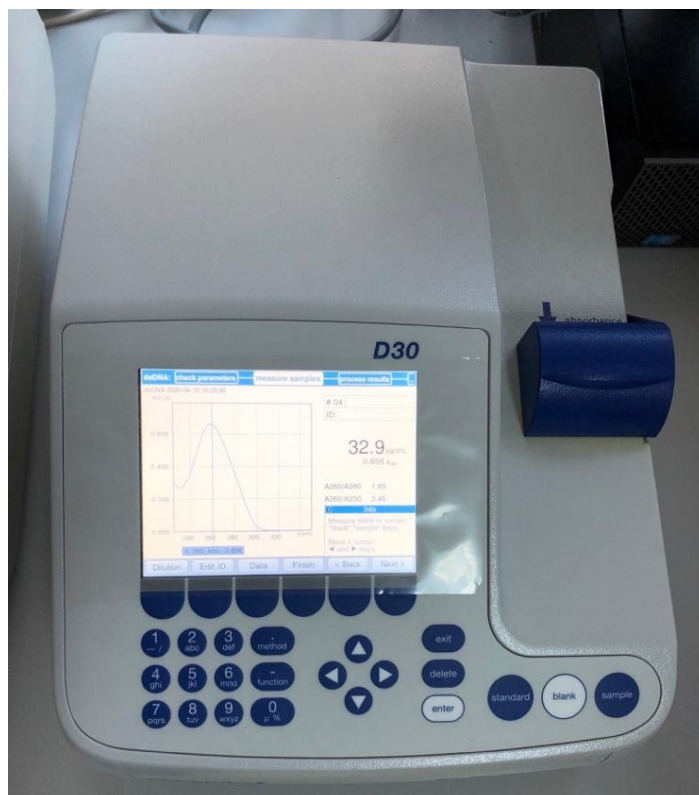
รูปภาพที่ 6 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน



รูปภาพที่ 7 ตัวอย่างเลือดหลังปั่นเหวี่ยงตกตะกอน



รูปภาพที่ 8 ตู้อบปรับอุณหภูมิ (incubator)



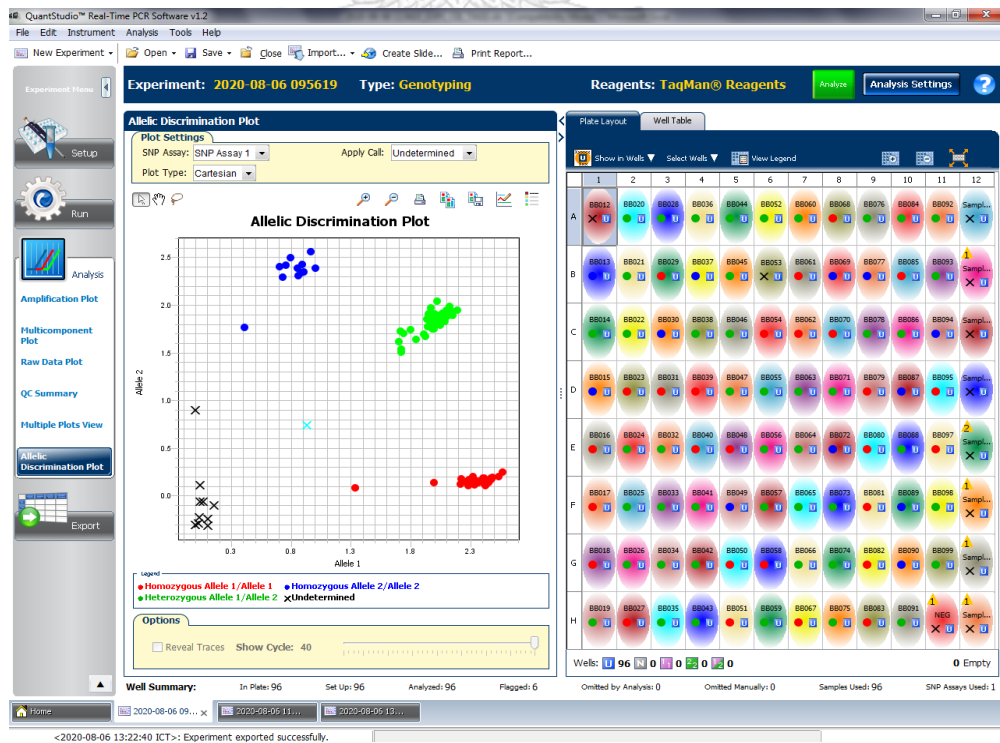
รูปภาพที่ 9 เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การค้นหาคความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี ได้แก่ *Cdx-2*, *GATA*, *FokI*, *Apal* และ *TaqI* ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) โดยชุดทดสอบ Taqman genotyping และ minor groove binding probe (Cat No.4351379)

1. ผสมสารสกัดดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรกับ 20x TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystems, NY, USA) 0.5 ไมโครลิตร of 2x TaqMan genotyping mastermix (Applied Biosystems, NY, USA) 5 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น จนได้ปริมาตรสุทธิที่ 10 ไมโครลิตร
2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที, ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 40 รอบ รอบละ 15 วินาทีและที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที
3. ใช้สารฟลูออเรสเซนต์ตรวจจับสัญญาณเมื่อครบรอบของการเพิ่มดีเอ็นเอ
4. วิเคราะห์จีโนไทป์ของ rs11568820 (*Cdx-2*), rs4516035 (*GATA*), rs2228570 (*FokI*), rs7975232 (*Apal*) และ rs731236 (*TaqI*) โดยซอฟต์แวร์ QuantStudio™ (ViiA™7)



รูปภาพที่ 10 เครื่อง real-time PCR (Applied Biosystems, NY, USA)

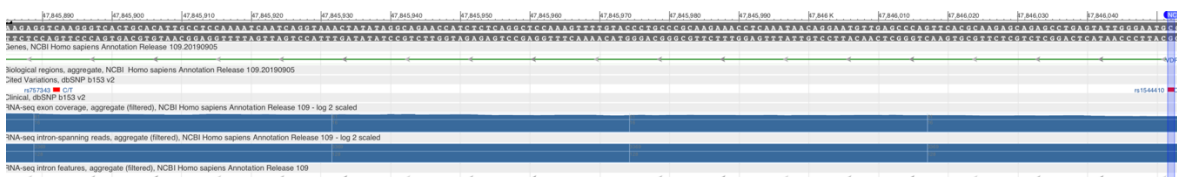


รูปภาพที่ 11 ซอฟต์แวร์ QuantStudio™ (ViiA™7) สำหรับวิเคราะห์จีโนไทป์

การค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

1. เตรียม 2 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอเพื่อเตรียมชุด 25 ไมโครลิตรการเพิ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR reaction) โดย AccuStart™ II GelTrack PCR SuperMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA) และชุดไพรเมอร์ F: 5'-CTC ACT GCC CTT AGC TCT GC-3' and R: 5'-TTG GAC CTC ATC ACC GAC AT-3'
2. ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอประกอบด้วย
  - a. Pre-incubation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที
  - b. การแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว (denaturation) 35 รอบที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที
  - c. การจับกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวและไพรเมอร์ (primer annealing) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที
  - d. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 นาที
3. ผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอวิเคราะห์โดยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 2% Agarose gel ย้อมด้วย MaestroSafe™ (LABGENE Scientific, Switzerland) และตรวจผลด้วยแสงยูวี (UV light)
4. การตรวจหาลำดับดีเอ็นเอ (direct DNA sequencing)
  - a. ผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดตรวจ Expin™ Combo GP (Gene All, Korea)
  - b. การตรวจหาลำดับดีเอ็นเอด้วย First BASE Laboratories Sdn Bhd (Selangor Darul Ehsan, Malaysia)
5. วิเคราะห์ SNP rs1544410 (*Bsm-I*) โดยเทียบจากลำดับอ้างอิงจาก NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)





รูปภาพที่ 12 SNP rs1544410 (*Bsm-I*) ลำดับอ้างอิงจาก NCBI (National Center for Biotechnology Information)

ทั้งนี้การสกัดดีเอ็นเอ, การทำ real-time PCR และการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อหา SNPs ทำที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยฟังผืดและดับแข็ง และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยา การตรวจระดับวิตามินดีในเลือด

ระดับวิตามินดีในเลือดตรวจโดยการทดสอบ Liaison 25 OH vitamin D total assay โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ LIAISON® chemiluminescence ตามคำแนะนำของผู้ผลิต รายงานค่าวิตามินดีในเลือดเป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างเลือดจากประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม (Healthy control)

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือดจากประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุมเพื่อประเมินภาวะสมดุลของประชากร โดยตัวอย่างเลือดจากประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุมทั้งหมดเป็นชาวไทย ผล HBeAg เป็นลบ เป็นผู้มาตรวจสุขภาพที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 84 คนและสภากาชาดไทยจำนวน 99 คน ทั้งนี้การศึกษาได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 431/58) โดยผู้ป่วยทุกคนได้รับรองในหนังสือรับทราบและยินยอม (informed consent)

### 3.5. การรวบรวมข้อมูล

เก็บข้อมูลจากหน่วยโรคทางเดินอาหารและตับ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผู้เก็บข้อมูลและผู้บันทึกข้อมูลคือ ผู้ดำเนินการวิจัย

1. บันทึกข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยดังนี้
  - a. ข้อมูลพื้นฐาน: อายุ เพศ และปริมาณการดื่มแอลกอฮอล์
  - b. ปัจจัยด้านการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี: HBsAg, HBV DNA, antiHBs, HBeAg, antiHBe, HBV genotype, การรักษา
  - c. ผลเลือดได้แก่ ค่าการทำงานของตับ INR และระดับวิตามินดีในเลือด

- d. ค่าพังผืดในตับจากการตรวจ fibroscan
  - e. ภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง: Child Pugh score, MELD score และมะเร็งตับ
2. บันทึกข้อมูลความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี ได้แก่ *Cdx-2*, *GATA*, *FokI*, *Apal*, *TaqI* และ *Bsm-I*

### 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติที่ใช้วิเคราะห์

ข้อมูลทางระบาดวิทยาใช้การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS รุ่น 22.0 (IBM corp, Armonk, NY, USA) โดยแสดงข้อมูลตัวแปรจัดกลุ่ม (categorical variables) ในรูปแบบความถี่ (frequency) เป็นร้อยละ (percent) และตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) ในรูปแบบค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มระยะพาหะชนิดเข็มน้อย และระยะตับอักเสบบีเรื้อรังวิเคราะห์โดยการทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test) การทดสอบของฟิชเชอร์ (Fischer's exact test) และการทดสอบสมมติฐานของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มที่เป็นอิสระจากกัน (independent sample t-test)

ความถี่ของจีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่างในภาวะสมดุล [the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)], linkage disequilibrium (LD), การจัดกลุ่ม haplotype (haplotype construction) และความสัมพันธ์ของยีนต่างๆ (genetic association) วิเคราะห์ข้อมูลโดยซอฟต์แวร์ SHEsis

### 3.7 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ

ระยะเวลา 1 ปี

### 3.8 สถานที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาโรคทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ และ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 1873 ถนน พระรามที่ 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330



## 3.9 งบประมาณ

	Items	N	Cost /unit (Baht)	Cost (Baht)
1	Blood sample collections	600	200	120,000
2	DNA analysis	600	2,000	1,200,000
3	Vitamin D level	300	600	180,000
4	Administration	1	20000	20000
5	Publication processes	1	50000	50000
	Total cost			1,570,000

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 ลักษณะทางประชากรของผู้ป่วยกลุ่มศึกษา (Patients' characteristics)

การศึกษารวบรวมผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง 324 ราย ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงสิงหาคม พ.ศ.2563 แบ่งเป็นกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื้อ 163 ราย และกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรัง 161 ราย อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื้อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรังอยู่ที่  $48.5 \pm 7.9$  และ  $48.6 \pm 8.3$  ปีตามลำดับโดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.953$ ) สัดส่วนของผู้ป่วยเพศชายในผู้ป่วยกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื้อน้อยน้อยกว่ากลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรังอย่างมีนัยยะสำคัญที่ร้อยละ 46.0 และร้อยละ 68.3 ตามลำดับ ( $p < 0.001$ ) ในผู้ป่วยกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรังมี HBeAg ในเลือดเป็นบวกร้อยละ 40.5 และเป็นดับแข็งร้อยละ 13.0 ค่าเฉลี่ยระดับวิตามินดีในเลือดในผู้ป่วยกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื้อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรังอยู่ที่  $23.41 \pm 12.08$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรและ  $22.76 \pm 10.18$  นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ( $p = 0.609$ ) สัดส่วนของผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องและขาดวิตามินดี (vitamin D insufficiency and deficiency) คิดเป็นร้อยละ 75.3 และ 78.0 ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื้อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรังตามลำดับ ข้อมูลลักษณะทางประชากรของผู้ป่วยกลุ่มศึกษาแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตารางแสดงลักษณะทางประชากรของผู้ป่วยกลุ่มศึกษาแบ่งเป็นกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื้อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรัง

ลักษณะทางประชากร	กลุ่มระยะพาหะชนิดเชื้อ น้อยจำนวน (N = 163 ราย)	กลุ่มระยะตับอักเสบ เรื้อรัง จำนวน (N = 161 ราย)	p-value
อายุเฉลี่ย (ปี $\pm$ SD)	$48.57 \pm 7.99$	$48.62 \pm 8.33$	0.953
ค่ามัธยฐานอายุของผู้ป่วยกลุ่มศึกษา (ปี, IQR)	50, 41-54	50, 41-55	
เพศชาย จำนวน (ร้อยละ)	75 (46.0)	110 (68.3)	$< 0.001^*$

ระดับวิตามินดีในเลือด (นาโนกรัมต่อมล.)	23.41 ± 12.08	22.76 ± 10.18	0.609
ภาวะวิตามินดีในร่างกาย - ปกติ (≥ 30 นาโนกรัมต่อมล.) - ภาวะพร่องวิตามินดี (20-29.99 นาโนกรัมต่อมล.) - ภาวะขาดวิตามินดี (< 20 นาโนกรัมต่อมล.)	จำนวนผู้ป่วย 150 37 (24.7%) 35 (23.3%) 78 (52.0%)	จำนวนผู้ป่วย 156 28 (18.0%) 54 (34.6%) 74 (47.4%)	0.164 0.033 0.493
HBV DNA (IU/มิลลิลิตร)  log	จำนวนผู้ป่วย 145 530.3 ± 583.46 2.72 ± 2.76	จำนวนผู้ป่วย 99 45920162.4 ± 13995169.2 7.66 ± 7.15	< 0.001*
HBeAg - ผลบวก - ผลลบ	0 (0%) 163/163 (100%)	62/153 (40.5%) 91/153 (59.5%)	< 0.001*
ตับแข็ง	0	21/161 (13.0%)	

\*p-value ≤ 0.05 แสดงว่ามีนัยยะสำคัญ

#### 4.2 ความถี่อัลลีล (allele) ของ SNPs ตัวรับวิตามินดี

ความถี่อัลลีล (allele) ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย *CdX-2*, *GATA*, *FokI*, *BsmI*, *Apal* และ *TaqI* แสดงดังตารางที่ 4

- สัดส่วนความถี่อัลลีล *CdX-2* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรังของอัลลีล G (G allele) คิดเป็นร้อยละ 53.7 และ 62.7 ตามลำดับ สัดส่วนของอัลลีล A (A

allele) ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังคิดเป็นร้อยละ 46.3 และ 37.3 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ (p 0.019)

- สัดส่วนความถี่อัลลีล *GATA* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังของอัลลีล G คิดเป็นร้อยละ 4.3 และ 3.7 ตามลำดับ สัดส่วนของอัลลีล A ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังคิดเป็นร้อยละ 95.7 และ 96.3 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.712)
- สัดส่วนความถี่อัลลีล *FokI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังของอัลลีล T (T allele) คิดเป็นร้อยละ 44.8 และ 46.0 ตามลำดับ สัดส่วนของอัลลีล C (C allele) ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังคิดเป็นร้อยละ 55.2 และ 54.0 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.763)
- สัดส่วนความถี่อัลลีล *BsmI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังของอัลลีล G คิดเป็นร้อยละ 92.5 และ 92.9 ตามลำดับ สัดส่วนของอัลลีล A ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังคิดเป็นร้อยละ 7.5 และ 7.1 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.879)
- สัดส่วนความถี่อัลลีล *ApaI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังของอัลลีล T คิดเป็นร้อยละ 77.9 และ 74.5 ตามลำดับ สัดส่วนของอัลลีล G ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังคิดเป็นร้อยละ 22.1 และ 25.5 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.312)

สัดส่วนความถี่อัลลีล *TaqI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังของอัลลีล T คิดเป็นร้อยละ 92.9 และ 94.4 ตามลำดับ สัดส่วนของอัลลีล C ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรังคิดเป็นร้อยละ 7.1 และ 5.6 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.443)

ตารางที่ 4 ความถี่อัลลีลของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย *CdX-2*, *GATA*, *FokI*, *BsmI*, *ApaI* และ *TaqI* ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรือรัง

SNPs	อัลลีล	ความถี่ (ร้อยละ)	p-value	OR (95%CI)
------	--------	------------------	---------	------------

	(Allele)	กลุ่มระยะพาหะ ชนิดเขื่อน้อย	กลุ่มระยะดับ อีกเสบเรื้อรัง		
<i>CdX-2</i>	G	53.7	62.7	0.019*	0.68 (0.49-0.93)
	A	46.3	37.3		
<i>GATA</i>	G	4.3	3.7	0.712	1.12 (0.51-2.48)
	A	95.7	96.3		
<i>FokI</i>	T	44.8	46.0	0.763	0.95 (0.70-1.30)
	C	55.2	54.0		
<i>BsmI</i>	G	92.5	92.9	0.879	0.98 (0.54-1.77)
	A	7.5	7.1		
<i>ApaI</i>	T	77.9	74.5	0.312	1.20 (0.83-1.72)
	G	22.1	25.5		
<i>TaqI</i>	T	92.9	94.4	0.443	0.80 (0.42-1.51)
	C	7.1	5.6		

\*p-value  $\leq$  0.05 แสดงว่ามีนัยยะสำคัญ

SNPs; Single nucleotide polymorphisms, A; Adenosine, T; Thymine, C; Cytosine, G; Guanine, CI; confident interval

#### 4.3 ความถี่จีโนไทป์ (genotype) ของ SNPs ตัวรับวิตามินดี

ความถี่จีโนไทป์ (genotype) ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย *CdX-2*, *GATA*, *FokI*, *BsmI*, *ApaI* และ *TaqI* แสดงดังตารางที่ 5

- สัดส่วนความถี่จีโนไทป์ *CdX-2* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรังพบว่าความถี่ G/G จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 27.0 และ 41.0 ความถี่ G/A จีโนไทป์คิด

เป็นร้อยละ 53.4 และ 43.5 และความถี่ของ A/A จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 19.6 และ 15.5 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ (p 0.028)

- สัดส่วนความถี่จีโนไทป์ *GATA* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรังพบว่าความถี่ G/A จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 8.6 และ 7.5 และความถี่ A/A จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 19.6 และ 15.5 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.706)
- สัดส่วนความถี่จีโนไทป์ *FokI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรังพบว่าความถี่ T/T จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 19.0 และ 19.3 ความถี่ T/C จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 51.5 และ 53.4 และความถี่ของ C/C จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 29.4 และ 27.3 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.911)
- สัดส่วนความถี่จีโนไทป์ *BsmI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรังพบว่าความถี่ G/G จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 85.1 และ 86.3 ความถี่ G/A จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 14.9 และ 13.0 และความถี่ของ A/A จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 0 และ 0.6 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.544)
- สัดส่วนความถี่จีโนไทป์ *ApaI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรังพบว่าความถี่ T/T จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 57.1 และ 51.6 ความถี่ T/G จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 41.7 และ 46.0 และความถี่ของ G/G จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 1.2 และ 2.5 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.478)
- สัดส่วนความถี่จีโนไทป์ *TaqI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรังพบว่าความถี่ T/T จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 85.9 และ 89.4 ความถี่ T/G จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 14.1 และ 9.9 และความถี่ของ G/G จีโนไทป์คิดเป็นร้อยละ 0 และ 0.6 ตามลำดับโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ (p 0.316)

ตารางที่ 5 ความถี่จีโนไทป์ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย *CdX-2*, *GATA*, *FokI*, *BsmI*, *ApaI* และ *TaqI* ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อนน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรัง

SNPs	จีโนไทป์	ความถี่ (ร้อยละ)		p-value	p <sup>HWE</sup>
		กลุ่มระยะพาหะชนิด	กลุ่มระยะดับอีกเสบ		

		เชื่อน้อย	เรื้อรัง		
<i>CdX-2</i>	G/G	27.0	41.0	0.028*	0.349
	G/A	53.4	43.5		
	A/A	19.6	15.5		
<i>GATA</i>	G/A	8.6	7.5	0.706	0.566
	A/A	91.4	92.5		
<i>FokI</i>	T/T	19.0	19.3	0.911	0.591
	T/C	51.5	53.4		
	C/C	29.4	27.3		
<i>BsmI</i>	G/G	85.1	86.3	0.544	0.306
	G/A	14.9	13.0		
	A/A	0	0.6		
<i>ApaI</i>	T/T	57.1	51.6	0.478	0.006
	T/G	41.7	46.0		
	G/G	1.2	2.5		
<i>TaqI</i>	T/T	85.9	89.4	0.316	0.332
	T/C	14.1	9.9		
	C/C	0	0.6		

\*p-value  $\leq$  0.05 แสดงว่ามีนัยยะสำคัญ

SNPs; Single nucleotide polymorphisms, A; Adenosine, T; Thymine, C; Cytosine, G; Guanine, HWE; hardy-Weinberg equilibrium

จากสัดส่วนจีโนไทป์ G/G, G/A และ A/A ของ *CdX-2* ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยวิตามินดีในเลือดในกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื่อน้อยและกลุ่มระยะตั้งอักษเรื้อรังของแต่ละจีโนไทป์พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ระดับวิตามินดีในเลือดแยกตามจีโนไทป์ของ *CdX-2* ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื่อน้อยและกลุ่มระยะตั้งอักษเรื้อรัง

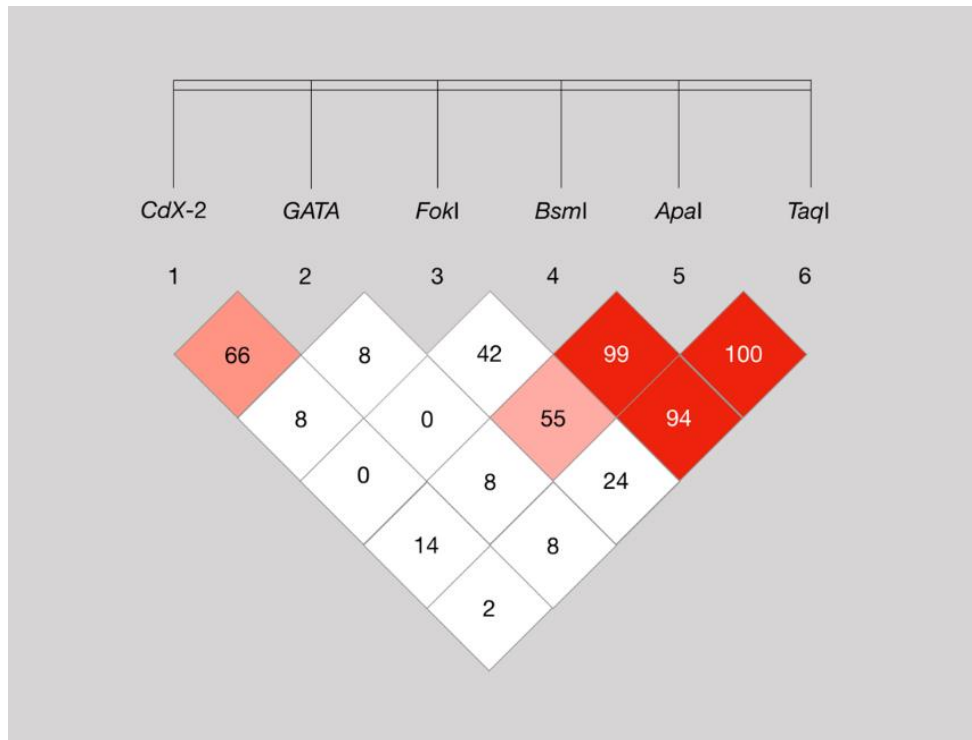
SNPs	จีโนไทป์ของ (จำนวนผู้ป่วยกลุ่มระยะ พาหะชนิดเขื่อน้อย, กลุ่ม ระยะดับอีกเสบเรื้อรัง)	ระดับวิตามินดีในเลือด (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)		p-value
		กลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อย	กลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรัง	
CdX-2	G/G (38, 64)	24.00 $\pm$ 12.75	21.79 $\pm$ 8.98	0.310
	G/A (83, 68)	23.04 $\pm$ 12.38	23.99 $\pm$ 11.97	0.638
	A/A (29, 24)	23.71 $\pm$ 10.58	21.87 $\pm$ 7.22	0.474

SNPs; Single nucleotide polymorphisms, A; Adenosine, T; Thymine, C; Cytosine, G; Guanine

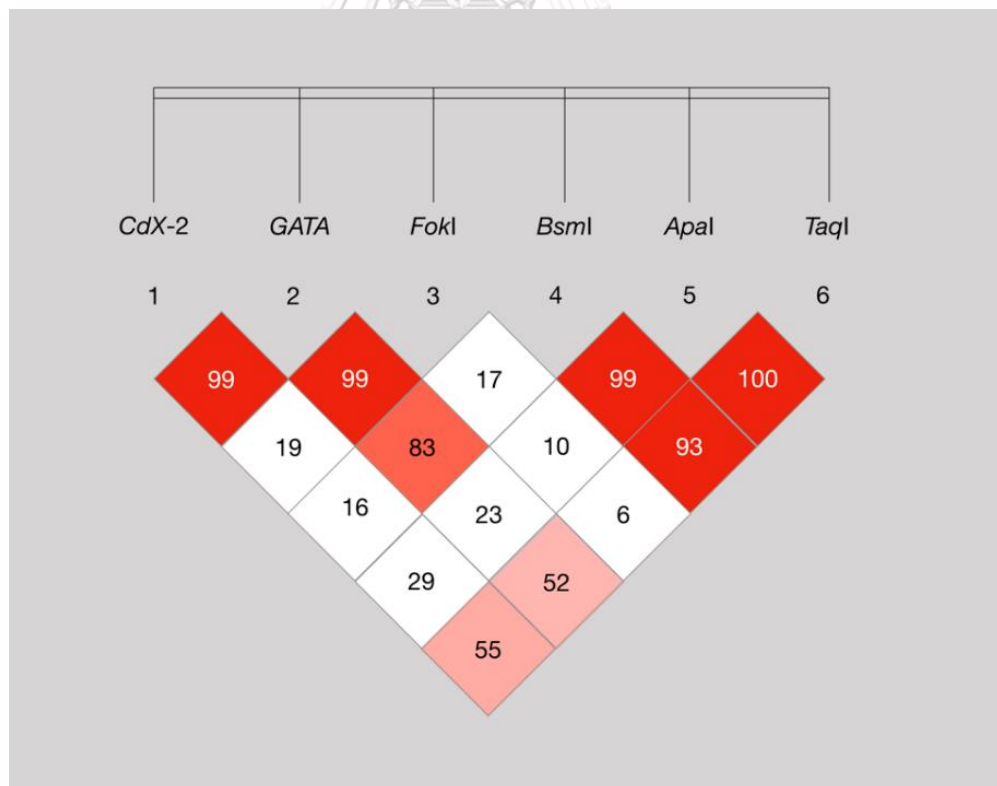
#### 4.4 ความถี่ haplotype ของ SNPs ตัวรับวิตามินดี

*BsmI*, *Apal* และ *TaqI* มีค่าคะแนน LD (LD'score) สูง ( $D' > 0.8$ ) ทั้งในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรัง ในขณะที่ *CdX-2/GATA* และ *GATA/FokI* พบคะแนน LD สูงเฉพาะในกลุ่มระยะดับอีกเสบเรื้อรังดังแสดงในรูปภาพที่ 13

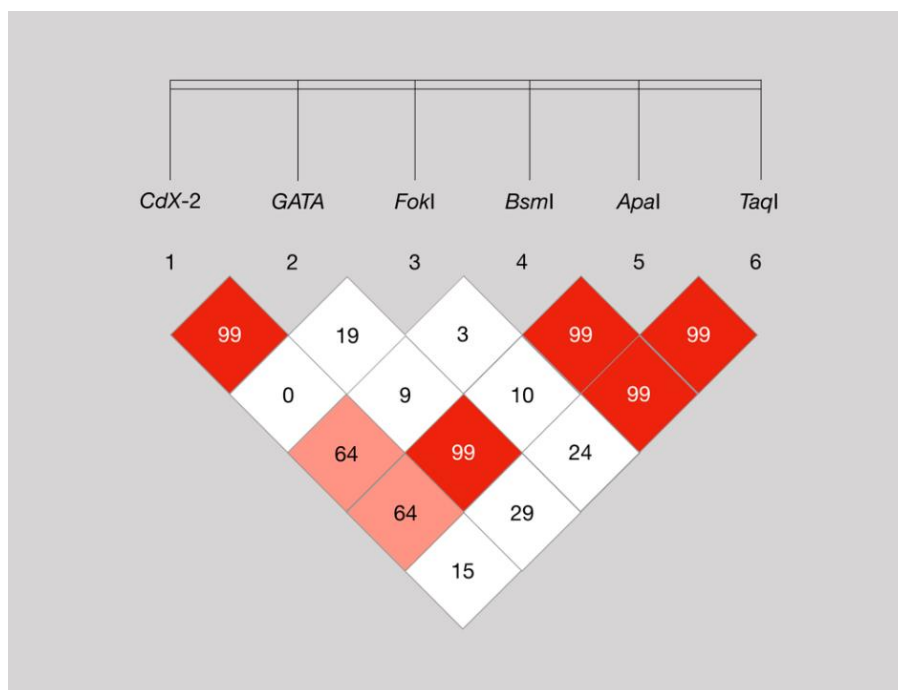




B - กลุ่มระยะตัดบั๊กเสปเรื้อรัง



C - ประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม



รูปภาพที่ 13 Linkage disequilibrium (LD) triangular mapping ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดี ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อย (A) กลุ่มระยะตับอักเสบริ้รังก (B) และ ประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม (C)

ความถี่ของ haplotype *CdX-2/GATA*, *CdX-2/GATA/FokI* และ *BsmI/ApaI/TaqI* แสดง ดังตารางที่ 7

- AA haplotype ของ *CdX-2/GATA* สัมพันธ์กับกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยอย่างมีนัยยะสำคัญโดยมีอัตราส่วนออดส์ (odds ratio) 1.43 (1.04-1.96),  $p$  0.025
- AAC haplotype ของ *CdX-2/GATA/FokI* สัมพันธ์กับกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยอย่างมีนัยยะสำคัญโดยมีอัตราส่วนออดส์ 1.98 (1.34-2.91),  $p < 0.001$
- พบความถี่ GGC haplotype ของ *CdX-2/GATA/FokI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยน้อยกว่ากลุ่มระยะตับอักเสบริ้รังกอย่างมีนัยยะสำคัญโดยมีอัตราส่วนออดส์ 0.12, (0.02 – 0.69),  $p$  0.004
- GGT haplotype ของ *BsmI/ApaI/TaqI* haplotype ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบริ้รังกพบมากที่สุดทั้ง แต่อย่างไรก็ตามไม่พบ haplotype ที่มีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญระหว่างกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะดับอีกเสบ  
เรือร้าง

ตารางที่ 7 ความถี่ Haplotype ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย *CdX-2*, *GATA*, *FokI*,  
*BsmI*, *Apal* และ *TaqI* ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรือร้างกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะ  
ดับอีกเสบเรือร้าง

Haplotypes	ความถี่ (ร้อยละ)		p-value	OR	95%CI
	กลุ่มระยะพาหะ ชนิดเขื่อน้อย	กลุ่มระยะดับ อีกเสบเรือร้าง			
<i>CdX-2/GATA</i>					
GG	3.6	3.7	0.958	0.97	0.43-2.21
GA	50.1	59.0	0.027	0.70	0.51-0.96
AG	0.7	0	-	-	-
AA	45.6	37.3	0.025*	1.43	1.04-1.96
*p-value $\leq$ 0.0250 แสดงว่ามีนัยยะสำคัญ					
<i>CdX-2/GATA/FokI</i>					
GGT	2.7	0	-	-	-
GGC	0.5	3.7	0.004**	0.12	0.02 – 0.69
GAT	23.3	24.8	0.878	0.97	0.67 – 1.39
GAC	27.2	34.3	0.103	0.75	0.54 – 1.05
AAT	18.8	21.2	0.597	0.90	0.61 – 1.32
AAC	26.4	16.1	<0.001**	1.98	1.34 – 2.91
AGC	1.1	0	-	-	-

\*\*p-value  $\leq$  0.0167 แสดงว่ามีนัยยะสำคัญ

<i>BsmI/ApaI/TaqI</i>					
GTT	69.9	67.1	0.510	1.12	0.79-1.57
GTC	0.3	0.3	-	-	-
GGT	22.4	25.5	0.331	0.83	0.58-1.20
ATT	1.2	1.9	-	-	-
ATC	6.2	5.3	0.624	1.18	0.60-2.30
AGT	0	0.1	-	-	-

p-value  $\leq$  0.0167 แสดงว่ามีนัยยะสำคัญ

A; Adenosine, T; Thymine, C; Cytosine, G; Guanine

#### 4.5 ปัจจัยทำนายระยะพาหะชนิดเข็มน้อย

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบตัวแปรเดียวและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบหลายตัวแปร (univariate and multivariate analysis) ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่า

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบตัวแปรเดียว ปัจจัยที่สัมพันธ์ระยะพาหะชนิดเข็มน้อยอย่างมีนัยยะสำคัญ ได้แก่ เพศชายมีอัตราส่วนออก 0.39 (95%CI 0.25 – 0.62) G/A และ A/A จีโนไทป์ของ *Cdx-2* โดยมีอัตราส่วนออก 1.84 (95%CI 1.12 - 3.02) และ 1.98 (95%CI 1.03 - 3.77) ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบหลายตัวแปรพบว่าเพศชายและ G/A จีโนไทป์ของ *Cdx-2* เป็นปัจจัยที่สัมพันธ์ระยะพาหะชนิดเข็มน้อยอย่างมีนัยยะสำคัญโดยมีอัตราส่วนออกที่ปรับแล้ว (adjusted odd ratio) 0.40 (95%CI 0.25 – 0.63) และ 1.83 (95%CI 1.10 – 3.04) ตามลำดับ

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบตัวแปรเดียวและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบหลายตัวแปรของปัจจัยที่สัมพันธ์กับผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเข็มน้อย

	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์
--	--------------------------	--------------------------

	แบบตัวแปรเดียว		แบบหลายตัวแปร	
	อัตราส่วนออก (95%CI)	p-value	อัตราส่วนออก (95%CI)	p-value
อายุ	0.99 (0.96 – 1.02)	0.806		
เพศชาย	0.39 (0.25 – 0.62)	< 0.001*	0.40 (0.25 – 0.63)	< 0.001*
จีโนไทป์ ของ <i>CdX-2</i>				
G/G	-	0.029*	-	0.045*
G/A	1.84 (1.12 - 3.02)	0.016*	1.83 (1.10 – 3.04)	0.019*
A/A	1.98 (1.03 - 3.77)	0.038*	1.85 (0.95 – 3.58)	0.068
ระดับวิตามินดีในเลือด	1.00 (0.98 - 1.02)	0.608		

\*p-value  $\leq$  0.05 แสดงว่ามีนัยยะสำคัญ, A; Adenosine, G; Guanine, CI; confident interval

## บทที่ 5

### อภิปราย สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผลการวิจัย

ความอ่อนแอของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สถานะ HBeAg ในเลือด การตอบสนองต่อการรักษาด้วย pegylated interferon และภาวะแทรกซ้อนจาก

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง เช่น ตับแข็งและมะเร็งตับ พบว่าสัมพันธ์กับความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีในหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ (18-20) SNPs ที่ได้รับการศึกษาในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่ *FokI*, *BsmI*, *Apal* และ *TaqI* (14) ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ 7 และ 8 พบว่าอัลลีลT จีโนไทป์ของ *FokI* แบบ C/T และ T/T สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังอย่างมีนัยยะสำคัญโดยมีอัตราส่วนออก 1.86 ( $p < 0.001$ ), 1.96 ( $p < 0.016$ ) และ 3.22 ( $p < 0.006$ ) ตามลำดับ (18, 19) การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับระยะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง คือ ระยะพาหะชนิดเชื้อมีน้อยและระยะตับอักเสบบีเรื้อรัง

จากการศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมนี้พบว่าสัดส่วนของ อัลลีล A อัลลีล G และจีโนไทป์ของ *CdX-2* แบบ G/G, G/A หรือ A/A ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื้อมีน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบบีเรื้อรังแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ โดย G/A จีโนไทป์ของ *CdX-2* สัมพันธ์กับระยะพาหะชนิดเชื้อมีน้อยในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังชาวไทยอย่างมีนัยยะสำคัญคิดเป็นอัตราส่วนออกที่ปรับแล้ว 1.83 (95%CI 1.10 – 3.04),  $p < 0.019$

*CdX-2* อยู่ในตำแหน่ง 5' (5' region) ของยีนตัวรับวิตามินดี ทำหน้าที่ปรับการทำงานของ การควบคุมการแสดงออกของยีนและการถอดรหัสของยีนตัวรับวิตามินดี จากการศึกษาของ Arai และคณะพบว่าอัลลีล G ของ *CdX-2* มีการถอดรหัสของยีนน้อยกว่าอัลลีล A ถึงร้อยละ 30 ซึ่งนำไปสู่ความแตกต่างของความหนาแน่นกระดูก (bone mineral density) ในสตรีวัยหมดประจำเดือนในประเทศญี่ปุ่น (22) นอกจากนี้การศึกษาในภาวะมวลกระดูกและกระดูกพรุนแล้ว ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของ *CdX-2* มีผลต่อโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกัน โดยพบ A/A จีโนไทป์ของ *CdX-2* เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อไวรัสและมะเร็ง (23, 24) ข้อมูลจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของ *CdX-2* ส่งผลถึงความแตกต่างของการถอดรหัสยีนและนำไปสู่ความแตกต่างของการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันสนับสนุนผลการศึกษาที่ว่า G/A จีโนไทป์ของ *CdX-2* เป็นปัจจัยที่สัมพันธ์และทำนายระยะพาหะชนิดเชื้อมีน้อย ทั้งนี้ระดับวิตามินดีในเลือดในผู้ป่วยที่มี *CdX-2* จีโนไทป์แตกต่างกันในกลุ่มระยะพาหะชนิดเชื้อมีน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบบีเรื้อรังไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ จึงเป็นไปได้ว่า G/A จีโนไทป์ของ *CdX-2* ควบคุมการทำงานของตัวรับวิตามินดีโดยไม่ขึ้นกับระดับวิตามินดีในเลือดซึ่งเป็นที่ต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

AA haplotype ของ *CdX-2/GATA* และ AAC haplotype ของ *CdX-2/GATA/FokI* สัมพันธ์กับกลุ่ม ระยะพาหะชนิดเข็ญน้อยอย่างมีนัยยะสำคัญโดยมีอัตราส่วนออก 1.43 (1.04 – 1.96),  $p$  0.025 และ 1.98 (1.34-2.91),  $p < 0.001$  ตามลำดับ นอกจากนี้การศึกษาพบความแตกต่างของ linkage disequilibrium ของ *CdX-2/GATA* และ *GATA/FokI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเข็ญน้อย (รูปที่ 13A) และกลุ่มระยะดับอักเสบริ้ว (รูปที่ 13B) ในขณะที่ linkage disequilibrium ของ *CdX-2/GATA* และ *GATA/FokI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเข็ญน้อย (รูปที่ 13A) และประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม (รูปที่ 13C) คล้ายคลึงกัน จึงเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบริ้วกลุ่มระยะดับอักเสบริ้ว มีลักษณะทางคลินิกนี้ขึ้นเนื่องมาจากความแตกต่างของภูมิคุ้มกันซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของยีนควบคุมตัวรับวิตามินดีในตำแหน่งดังกล่าว

*FokI* อยู่ในเอ็กซอนที่ 2 จากตำแหน่ง 5' (5' region) ของยีนตัวรับวิตามิน (6) ความแตกต่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของ *FokI* ทำให้เกิดการแปลรหัสแบบเลื่อนกรอบอ่าน (frameshift translation) ส่งผลให้รหัสเริ่มต้น (start codon) เปลี่ยนจากไทมีนเป็นไซโทซีนจึงเปลี่ยนจาก ATG เป็น ACG (11) (25) อัลลิล T ให้รหัสเริ่มต้นเป็น ATG ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มี 427 กรดอะมิโน (amino acids) ในขณะที่อัลลิล C ให้รหัสเริ่มต้นเป็น ACG ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มี 424 กรดอะมิโน (5, 15) จากการสร้างโปรตีนที่แตกต่างกัน ผู้ป่วยที่มีอัลลิล C ของ *FokI* มีปริมาณ IL-4 และ IL-10 ลดลงในขณะที่ IL-12 และ IFN- $\gamma$  สูง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดทีเฮลเปอร์ 1 และทีเฮลเปอร์ 2 ทำให้การกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบริ้วโดยระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง จากการศึกษาวิเคราะห์ห่อภิมาณพบ C/C จีโนไทป์ของ *FokI* สัมพันธ์กับความไวต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบริ้วอย่างมีนัยยะสำคัญ (14) ดังนั้นความแตกต่างของ *FokI* อาจทำให้เกิดความแตกต่างของการทำงานของภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบริ้วกลุ่มระยะพาหะชนิดเข็ญน้อย และกลุ่มระยะดับอักเสบริ้ว

จากการศึกษาของ Huang และคณะพบว่า *BsmI*, *Apal* และ *TaqI* สัมพันธ์กับการเกิดดับอักเสบก้ำเรื้อ (severe hepatitis flare) ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบริ้วอย่างมีนัยยะสำคัญ โดยพบ B/b จีโนไทป์ของ *BsmI*, B/a, B/T และ B/a/T haplotype ของ *BsmI/Apal* และ *BsmI/Apal/TaqI* ตามลำดับ น้อยกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีดับอักเสบก้ำเรื้อ (20) อย่างไรก็ตามไม่พบความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของ *BsmI*, *Apal* และ *TaqI* ที่สัมพันธ์กับผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบริ้วกลุ่มระยะพาหะชนิดเข็ญน้อยจากการศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมนี้

## 5.2 สรุปผลการวิจัย

G/A จีโนไทป์ของ *CdX-2* สัมพันธ์กับระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังชาวไทยอย่างมีนัยยะสำคัญ นอกจากนี้การศึกษาพบความแตกต่างของ linkage disequilibrium ของ *CdX-2/GATA* และ *GATA/FokI* ในกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรัง ซึ่งเป็นไปได้ว่าความแตกต่างของความหลากหลายของยีนตัวรับวิตามินดีนี้ นำไปสู่ความแตกต่างของภูมิคุ้มกันและทำให้เกิดลักษณะทางคลินิกที่ต่างกัันคือไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังกลุ่มระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและกลุ่มระยะตับอักเสบเรื้อรัง

## 5.3 ข้อเด่นของการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่พิสูจน์สมมุติฐานที่ว่าความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี ที่แตกต่างกันมีความสัมพันธ์ต่อภาวะภูมิคุ้มกันต้านทาน ทำให้เกิดสองลักษณะทางคลินิกคือ (1) ระยะพาหะชนิดเขื่อน้อย (2) ระยะตับอักเสบเรื้อรัง ซึ่งนำไปสู่การต่อยอดความรู้ความสัมพันธ์ระหว่างวิตามินดี ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดี ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และระยะของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง

## 5.3 ข้อต่อของการศึกษา

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีข้อจำกัดในการศึกษาบางประการ

1. เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีกับระยะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง คือ ระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและระยะตับอักเสบเรื้อรัง การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างใช้ข้อมูลความถี่จีโนไทป์จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มีตับอักเสบก้ำเรื้อ
2. ระดับวิตามินดีในเลือดในการศึกษานี้ได้จากการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยเพียง 1 ครั้ง ระดับวิตามินดีที่ได้อาจได้รับผลกระทบปัจจัยรบกวนเช่น ภาวะโภชนาการและการได้รับแสงแดดในขณะนั้น
3. การศึกษานี้ไม่ได้ตรวจวัดตัวชี้วัดอื่นทางภูมิคุ้มกันเช่น ระดับไซโตไคน์ (cytokine) และการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดทีเซลล์



#### 5.4 ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีชนิด  $CdX-2$  กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเขื่อน้อย อย่างไรก็ตามเนื่องจากค่านวนขนาดกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลความถี่จีโนไทป์จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มีตับอักเสบก้ำเรื้อ การนำผลการศึกษาความแตกต่างของ haplotype ไปใช้จึงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่ใหญ่ขึ้นเพื่อยืนยันผลการศึกษา

นอกจากนี้หากมีการศึกษาในอนาคต การตรวจวัดตัวชี้วัดอื่นทางภูมิคุ้มกันเช่น ระดับไซโตไคน์ (cytokine) และการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดทีเซลล์ เพื่ออธิบายกลไกการทำงานของภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยที่มีความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวรับวิตามินดีที่แตกต่างกัน จะเป็นประโยชน์ต่อการอธิบายภาวะภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังระยะพาหะชนิดเขื่อน้อยและระดับอักเสบเรื้อรังมากขึ้น



## บรรณานุกรม

1. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *The Lancet*. 2015;386(10003):1546-55.
2. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology*. 2006;130(3):678-86.
3. Chen C-J, Yang H-I, Su J, Jen C-L, You S-L, Lu S-N, et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *Jama*. 2006;295(1):65-73.
4. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(11):1118-29.
5. Terrault NA, Lok AS, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology*. 2018;67(4):1560-99.
6. Liver EAFTSOT. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*. 2017;67(2):370-98.
7. Ijaz B, Ahmad W, Javed FT, Gull S, Hassan S. Revised cutoff values of ALT and HBV DNA level can better differentiate HBeAg (-) chronic inactive HBV patients from active carriers. *Virology journal*. 2011;8(1):1-6.
8. Hu Y-C, Wang W-W, Jiang W-Y, Li C-Q, Guo J-C, Xun Y-H. Low vitamin D levels are associated with high viral loads in patients with chronic hepatitis B: A systematic review and meta-analysis. *BMC gastroenterology*. 2019;19(1):1-11.
9. Yu R, Tan D, Ning Q, Niu J, Bai X, Chen S, et al. Association of baseline vitamin D level with genetic determinants and virologic response in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Research*. 2018;48(3):E213-E21.
10. Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, Bikle D, White JH, Dawson-Hughes B, et al. Skeletal and extraskeletal actions of vitamin D: current evidence and outstanding questions. *Endocrine reviews*. 2019;40(4):1109-51.
11. Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, et al. The

nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*. 2012;33(3):456-92.

12. De Jongh RT, Lips P, Rijs KJ, van Schoor NM, Kramer MH, Vandenbroucke JP, et al. Associations between vitamin D receptor genotypes and mortality in a cohort of older Dutch individuals. *European journal of endocrinology*. 2011;164(1):75.

13. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica chimica acta*. 2006;371(1-2):1-12.

14. He Q, Huang Y, Zhang L, Yan Y, Liu J, Song X, et al. Association between vitamin D receptor polymorphisms and hepatitis B virus infection susceptibility: a meta-analysis study. *Gene*. 2018;645:105-12.

15. Chatzidaki V, Choumerianou D, Dimitriou H, Kouroumalis E, Galanakis E. Genetic variants associated with susceptibility to mother-to-child transmission of hepatitis B virus. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2012;24(10):1185-90.

16. Mostafa-Hedeab G, Sabry D, Abdelaziz GM, Ewaiss M, Adli N, Fathy W. Influence of vitamin D receptor gene polymorphisms on response to pegylated interferon in chronic hepatitis B Egyptian patients. *Reports of biochemistry & molecular biology*. 2018;6(2):186.

17. Shan B, Wang JY, Wang X, Fu JJ, Li L, Pan XC, et al. VDR rs7975232/Apol genetic variation predicts sustained HBsAg loss in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients treated with pegylated interferon. *Journal of medical virology*. 2019;91(5):765-74.

18. Peng Q, Yang S, Lao X, Li R, Chen Z, Wang J, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in VDR and DBP genes with HBV-related hepatocellular carcinoma risk in a Chinese population. *PloS one*. 2014;9(12):e116026.

19. Yao X, Zeng H, Zhang G, Zhou W, Yan Q, Dai L, et al. The associated ion between the VDR gene polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma and the clinicopathological features in subjects infected with HBV. *BioMed research international*. 2013;2013.

20. Huang Y, Liao Y, Chen W, Chen C, Hu J, Liu C, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and distinct clinical phenotypes of hepatitis B carriers in Taiwan. *Genes & Immunity*. 2010;11(1):87-93.

21. Huang Y, Liao Y, Chen W, Chen C, Hu J, Liu C, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and distinct clinical phenotypes of hepatitis B carriers in Taiwan. *Genes and immunity*. 2010;11(1):87.
22. Arai H, Miyamoto KI, Yoshida M, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001;16(7):1256-64.
23. Serrano D, Gnagnarella P, Raimondi S, Gandini S. Meta-analysis on vitamin D receptor and cancer risk: focus on the role of TaqI, ApaI, and Cdx2 polymorphisms. *European Journal of Cancer Prevention*. 2016;25(1):85.
24. Harishankar M, Selvaraj P. Influence of Cdx2 and TaqI gene variants on vitamin D3 modulated intracellular chemokine positive T-cell subsets in pulmonary tuberculosis. *Clinical therapeutics*. 2017;39(5):946-57.
25. Nunes IFdOC, Pinho FAd, Paiva AdA, Carvalho CMRGd. Influence of Polymorphism of Vitamin D Receptor (Fok I) on Hypertension. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2020;63.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

การวิจัยเรื่อง การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของยีนตัวรับวิตามินดีในกลุ่มผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังจากไวรัสตับอักเสบบี ระยะพาหะชนิดเขื่อน้อย และระยะที่มีตับอักเสบเรื้อรัง

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้านาย/นาง/นางสาว

ที่อยู่.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่.....และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและวันที่ พร้อมด้วย เอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบาย จากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ด้วยความ เต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใดๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่จะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิก การเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจาก ข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่นในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน อาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจสอบและประมวลผลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำ ไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอม ที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใดๆเพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการ ให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่าข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถยกเลิกการให้สิทธิ์ในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่าน กระบวนการต่างๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตหรือการวิจัยทางด้าน เกสซ์ภัณฑ์ เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

การจัดการกับตัวอย่างทางชีวภาพ

ไม่มีตัวอย่างชีวภาพ

มีแต่ไม่มีการขอเก็บ

มีและขอเก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

ข้าพเจ้า  ยินยอม

ไม่ยินยอม

ให้เก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

.....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์ หรือ ความเสี่ยง ที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสาร แสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน

(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ.....

## ภาคผนวก ข

## แบบบันทึกข้อมูล (Case Record Form)

Number \_ \_ \_

PT

Edition

EDIT

<b>Inclusion criteria</b>	
ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มีอายุ 30-60 ปี	
<b>Exclusion criteria</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- ผู้ป่วยตั้งครรรภ์</li> <li>- ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ระยะพาหะเชื่อน้อย (HBV carrier with low viral load) ภายหลังได้รับการรักษา</li> <li>- ผู้ป่วยมะเร็ง(cancers) ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ติดเชื้อ HIV ได้รับยากดภูมิ ผู้ป่วยโรคภูมิต้านทานต่อตนเองชนิดต่าง ๆ เป็นต้น และผู้ป่วยติดเชื้อระยะแพร่กระจาย (active infection)</li> <li>- ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีหรือเอชไอวีร่วมด้วย (HCV or HIV co-infection)</li> <li>- ผู้ป่วยที่มีภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อตับอักเสบบีเรื้อรัง ได้แก่ ผู้ป่วยตับแข็งที่เป็นมากแล้ว (decompensated cirrhosis) และมะเร็งตับ</li> </ul>	
<b>1.Clinical Phenotypes</b>	
1.1Clinical Phenotypes <input type="checkbox"/> 01inactive carrier <input type="checkbox"/> 02chronic hepatitis	
PHENO	
1.2 HBV DNA ..... IU/ml	
HBVDNA	
1.3 ALT .....	
ALT	
1.4 TE (transient elastography) ..... kPa	TE
<b>2.General information</b>	
2.1Age ..... years	A
2Date of birth.2 ___ / ___ / _____	DO
2.3Gender <input type="checkbox"/> 01Male <input type="checkbox"/> 02Female	GEND



<b>3.Hepatitis B status</b>	
3.1HBsAg	<input type="checkbox"/> 01Positive <input type="checkbox"/> 02Negative
3.2HBeAg	<input type="checkbox"/> 01Positive <input type="checkbox"/> 02Negative
3.3antiHBe	<input type="checkbox"/> 01Positive <input type="checkbox"/> 02Negative
3.4HBV Genotype .....	
3.5Treatment	<input type="checkbox"/> 01Yes <input type="checkbox"/> 02No
3.6Regimen .....	
3.7Duration of treatment .....	month
TIMEHBV	
3.8Remission	<input type="checkbox"/> 01Yes <input type="checkbox"/> 02No
3.9Please specify	<input type="checkbox"/> 01HBs seroconversion <input type="checkbox"/> 02HBs seroconversion
<b>4. Laboratory value</b>	
4.1AST .....	
4.2Platelet .....	
4.3AFP .....	
4.4Albumin .....	ALB
4.5Total bilirubin .....	TB
4.6Direct bilirubin .....	
4.7ALP .....	
4.8INR .....	
4.9Vitamin D level .....	
<b>5.Liver fibrosis/Cirrhosis</b>	
<b>** (1.4)TE (transient elastography) .....</b> kPa	
TE	
5.1Date 1stTE ___ / ___ / _____	DATE
<u>Imaging</u>	
5.2Ultrasound	<input type="checkbox"/> 01Yes <input type="checkbox"/> 02No
5.3Date 1 <sup>st</sup> Ultrasound ___ / ___ / _____	DATE
5.4CT	<input type="checkbox"/> 01Yes <input type="checkbox"/> 02No
5.5Date 1 <sup>st</sup> CT ___ / ___ / _____	DATE

5.6MRI	<input type="checkbox"/> 01Yes	<input type="checkbox"/> 02No	M
5.7Date 1 <sup>st</sup> MRI	___ / ___ / _____		DATEM
5.8CTP score.....			C
5.9MELD score .....			ME



## ภาคผนวก ค

ความถี่อัลลีล จีโนไทป์ และ Haplotype ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย *CdX-2*,  
*GATA*, *FokI*, *BsmI*, *ApaI* และ *TaqI* ในประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 9 ความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย *CdX-2*, *GATA*,  
*FokI*, *BsmI*, *ApaI* และ *TaqI* ในประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม

SNPs	Allele	Frequency (%)	Genotype	Frequency (%)
<i>CdX-2</i>	G	59.0	G/G	32.2
	A	41.0	G/A	53.6
			A/A	14.2
<i>GATA</i>	G	2.7	G/G	1.1
	A	97.3	G/A	3.3
			A/A	95.6
<i>FokI</i> ,	T	47.5	T/T	22.4
	C	52.5	T/C	50.3
			C/C	27.3
<i>BsmI</i>	G	91.8	G/G	83.6
	A	8.2	G/A	16.4
<i>ApaI</i>	T	33.9	T/T	11.5
	G	66.1	T/G	44.8
			G/G	43.7
<i>TaqI</i>	T	94.3	T/T	88.5
	C	5.7	T/C	11.5

ตารางที่ 10 ความถี่ Haplotype ของหก SNPs ตัวรับวิตามินดีประกอบด้วย *CdX-2*, *GATA*, *FokI*,  
*BsmI*, *ApaI* และ *TaqI* ในประชากรทั่วไปกลุ่มควบคุม

Haplotypes	Frequency (%)
<i>CdX-2/GATA</i>	
GG	2.7
GA	56.3
AG	0.0
AA	42.0
<i>CdX-2/GATA/FokI</i>	
GGT	1.0
GGC	1.7
GAT	27.0
GAC	29.3
AGT	0.0
AAT	19.5
AAC	21.5
<i>BsmI/ApaI/TaqI</i>	
GTT	25.7
GGT	66.1
ATT	2.5
ATC	5.7

## ภาคผนวก ง

บทคัดย่อ รางวัล Poster of distinction งานประชุม Digestive Disease Week (DDW) 2021  
(Virtual meeting, May 21-23, 2021)

**Association of vitamin D receptor polymorphisms in patients with chronic hepatitis B (HBV) infection in the inactive carrier and chronic hepatitis phases; a case-control study**

Prooksa Ananchuensook<sup>1</sup>, Sirinporn Suksawatamnauy<sup>1,2,3</sup>, Panarat Thaimai<sup>1,2,3</sup>,  
Supachaya Sriphoosanaphan<sup>1,2,3</sup>, Kessarinn Thanapirom<sup>1,2,3</sup>, Piyawat Komolmit<sup>1,2,3</sup>

1. Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

2. Center of Excellence in Liver Diseases, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand.

3. Liver Fibrosis and Cirrhosis Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

### Introduction

Host immune status is partly controlled by vitamin D receptor (VDR). Previous studies reported the association between VDR polymorphisms and severe flare-up hepatitis, decompensated cirrhosis, and hepatoma in patients with chronic HBV infection. These complications could be explained by the disease's natural history, which shows a different risk of the events between patients with HBV inactive carrier (IC) and chronic hepatitis (CH) phases. We propose that VDR polymorphisms, initially, influence the immune controls, resulting in these two different phases of chronic HBV infection, and subsequently result in several HBV related complications.

### Method

We enrolled 240 patients with chronic HBV infection aged 30-60 years in an outpatient liver clinic from February to August 2020. The IC phase was defined by HBV viral load (VL) < 2,000 IU/ml twice for six months apart, without a previous

history of HBV treatment. The CH phase was defined as persistent HBV VL > 2,000 IU/ml with evidence of hepatic inflammation or fibrosis, which require antiviral therapy according to AASLD HBV-treatment guideline. Six common *VDR* genes' single nucleotide polymorphisms (SNP), including *CdX-2*, *GATA*, *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, and *TaqI*, were studied from the patients' genomic DNA using TaqMan real-time PCR assay. The different outcomes in allele, genotype, and haplotype frequencies in between groups and linkage disequilibrium (LD) mapping were analyzed using a haplotype inference application.

## Results

Among 240 enrolled patients, there were 120 patients in each group of IC and CH, respectively. The proportion of male patients is lower in the IC group (50% vs. 70%,  $p=0.002$ ). The mean vitamin D levels were not statistically different between groups. None of the six *VDR* SNPs' genotype and allele frequencies showed statistically different in between groups. The CCA/TTG and CCG of the *CdX-2/GATA/FokI* haplotypes were significantly associated with IC and CH phases, respectively. The CCA haplotype demonstrated the strongest association ( $p$  0.005, OR 0.003, 95%CI 0-0.047) (Table 1). The SNPs' LD mapping revealed high LD scores in *BsmI/ApaI/TaqI* (BAT) haplotype in both groups. At the 5' end of the gene, the two haplotypes, *CdX-2/GATA* and *GATA/FokI*, showed significantly high LD scores in the CH group. However, the *GATA/FokI* in the IC group showed a lower LD score (52 vs. 99) (Figure 1).

## Discussion

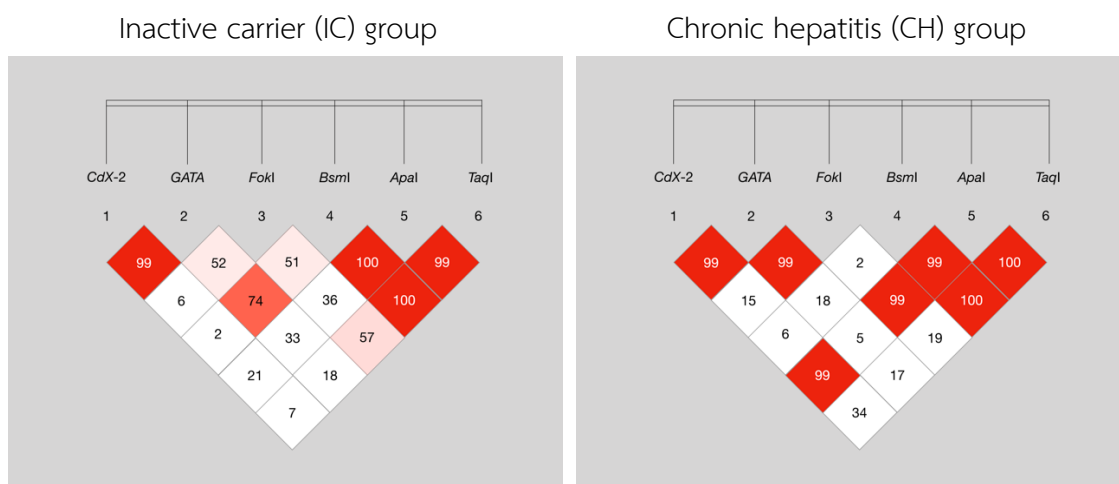
The results suggest that *VDR* polymorphisms, especially CCA or TTG haplotype of the *CdX-2/GATA/FokI* in Thai patients with chronic HBV infection, might be associated with HBV inactive carrier phase. The difference in LD of the *GATA/FokI* haplotype in between groups might represent a non-random selection in either group, resulting in, possibly, the variation of immune control. Further study with a larger population is required to confirm these results and our hypothesis.

**Table 1** Allele frequencies of *CdX-2/GATA/FokI* haplotypes in patients with HBV inactive carrier (IC) and chronic hepatitis (CH) phases

<i>CdX-2/GATA/FokI</i>	Frequency (%)		p-value	OR	95%CI
	Inactive carrier	Chronic hepatitis			
CCA	3.5	0.0	0.005*	0.003	0-0.047
CCG	1.1	4.6	0.020	4.47	1.13-17.69
CTA	24.4	25.1	0.861	1.03	0.68-1.57
CTG	26.1	31.2	0.215	1.28	0.86-1.91
TCG	0.0	0.0			
TTA	19.2	21.2	0.593	1.12	0.72-1.76
TTG	25.8	1.8	0.039	0.63	0.40-0.98

\*The corrected significant p-value is  $< 0.0167$ .

**Figure 1** Genomic organization and linkage disequilibrium (LD) mapping of six SNPs of vitamin D receptor (*VDR*) gene in patients with HBV inactive carrier (IC) and chronic hepatitis (CH) groups



ภาคผนวก จ

**บทคัดย่อ รางวัล Poster presentation with bursary award งานประชุม The international liver congress 2021 (European Association for the Study of the Liver (EASL) 2021) (Virtual meeting, June 21-23, 2021)**

**Association of Vitamin D receptor's Cdx-2 polymorphism and related haplotypes in patients with chronic hepatitis B infection in the inactive carrier and chronic hepatitis phases: a case-control study**

Prooksa Ananchuensook<sup>1</sup>, Sirinporn Suksawatamnuay<sup>1,2,3</sup>, Panarat Thaimai<sup>1,2,3</sup>, Supachaya Sriphoosanaphan<sup>1,2,3</sup>, Kessarinn Thanapirom<sup>1,2,3</sup>, Piyawat Komolmit<sup>1,2,3</sup>

1. Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
2. Center of Excellence in Liver Diseases, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Bangkok, Thailand.
3. Liver Fibrosis and Cirrhosis Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

**Background and Aims:** Vitamin D receptor (VDR) partly regulates host immune system. The association between VDR polymorphisms and severe flare-up hepatitis, cirrhosis and hepatoma in patients with chronic HBV infection were reported in previous studies. Patients with HBV inactive carrier (IC) and chronic hepatitis (CH) phases shows different disease's natural history and risk of complications. We hypothesize that VDR polymorphisms initially influence the host immune status which represented two different phases and consequently leading to HBV-related events.

**Method:** Patients with chronic HBV infection were enrolled from February to August 2020. The IC phase was defined as HBV viral load (VL) < 2,000 IU/ml twice for six months apart, without a previous history of HBV treatment. The CH phase was



defined as persistent HBV VL > 2,000 IU/ml with evidence of hepatic inflammation or fibrosis. Six common *VDR* genes' single nucleotide polymorphisms (SNP) including *CdX-2*, *GATA*, *FokI*, *BsmI*, *Apal*, and *TaqI*, were studied using TaqMan real-time PCR assay. The difference in allele, genotype, and haplotype frequencies in between groups and linkage disequilibrium (LD) mapping were analyzed using a haplotype inference application.

**Results:** Among 324 enrolled patients, there were 163 and 161 patients in IC and CH respectively. The proportion of male patients is lower in IC (46.0% vs. 68.3%,  $p < 0.001$ ). The mean vitamin D levels were not statistically different between groups. The proportion of alleles frequency of *CdX-2* in IC and CH was 53.7% and 62.7% for G allele and 46.3% and 37.3% for A allele which was statistically significant ( $p 0.019$ ). The proportion of GG genotype of *CdX-2* was less frequently found in IC compared to CH (27% vs 41%,  $p 0.028$ ). AA haplotype (*CdX-2/GATA*) and AAC haplotype (*CdX-2/GATA/FokI*) were significantly associated with IC with odd ratio (OR) 1.43,  $p 0.025$  and 1.98,  $p < 0.001$  respectively. By multivariate analysis, *CdX-2* G/A genotypes was independently associated with IC, with adjusted OR 1.83,  $p 0.019$ . The SNPs' LD mapping revealed high LD scores of *CdX-2/GATA* and *GATA/FokI* only in CH group.

**Conclusion:** The results suggest that *CdX-2* G/A genotypes was independently associated with IC status in Thai patients with chronic HBV infection. The difference in LD of the *CdX-2/GATA* and *GATA/FokI* haplotypes in between groups might represent a non-random selection in either group resulting in the variation of immune control.

**Figure:** Univariate and multivariate analysis of factors associated with HBV inactive carrier (IC) phase.

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95%CI)	p-value	OR (95%CI)	p-value
Age	0.99 (0.96 – 1.02)	0.806		
Gender (male)	0.39 (0.25 – 0.62)	< 0.001*	0.40 (0.25 – 0.63)	< 0.001*
<i>CdX-2</i> genotype				
G/G	-	0.029*	-	0.045*
G/A	1.84 (1.12 – 3.02)	0.016*	1.83 (1.10 – 3.04)	0.019*
A/A	1.98 (1.03 – 3.77)	0.038*	1.85 (0.95 – 3.58)	0.068
Vitamin D level	1.00 (0.98 – 1.02)	0.608		

\*Significant p-value

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พุกษา อนันต์ชื่นสุข
วัน เดือน ปี เกิด	11 เมษายน 2534
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2552 มัธยมศึกษาตอนปลาย เตรียมอุดมศึกษา พ.ศ. 2558 แพทยศาสตร์บัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	พ.ศ. 2562 วุฒิบัตรเพื่อแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรมสาขาอายุรศาสตร์ (วว. อายุรศาสตร์) พ.ศ. 2562 - 2564 แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาวิชาโรคทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 119/144 หมู่ 3 ถนน รัตนวิเบศร์ ตำบล ไทรมา อำเภอมือง จังหวัดนนทบุรี 11000