

ความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดซิงเกิลนิวคลีโอไทด์ พอลิมอร์ฟิซึม ของทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์ แอลฟาอิน และการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันในผู้ป่วยไทยที่ได้รับ การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากจากผู้บริจาคพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจนตรงกัน



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2557  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RELATIONSHIP BETWEEN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNFA) GENE  
POLYMORPHISM AND ACUTE GRAFT VERSUS HOST DISEASE AFTER HLA  
MATCHED SIBLING ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL  
TRANSPLANTATION) IN A THAI POPULATION

Mr. Akkapon Poolcharoen



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medicine  
Department of Medicine  
Faculty of Medicine  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2014  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดซิงเกิลนิวคลีโอไทด์  
พอลิมอร์ฟิซึม ของทูเมอร์ เนโครซิสแฟคเตอร์ แอลฟาอิน  
และการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันใน  
ผู้ป่วยไทยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต  
จากจากผู้บริจาคพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจนตรงกัน

โดย

นายอรรคพล พูลเจริญ

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงณัฐธิยา หิรัญกาญจน์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ไศภณ นภากาศ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงมนาริปี โอศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงณัฐธิยา หิรัญกาญจน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจตทะนง แก้วสงคราม)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(พันเอก รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ต้นตัญญี นำเบญจพล)

อรรถพล พูลเจริญ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดซิงเกิลนิวคลีโอไทด์ พอลิมอร์ฟิซึม ของทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์ แอลฟาอิน และการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันในผู้ป่วยไทยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากจากผู้บริจาคพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจนตรงกัน (RELATIONSHIP BETWEEN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNFA) GENE POLY MORPHISM AND ACUTE GRAFT VERSUS HOST DISEASE AFTER HLA MATCHED SIBLING ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION) IN A THAI POPULATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. นพ.อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร. พญ.ณัฐฐิยา หิรัญกาญจน์, 42 หน้า.

บทนำ: ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันเป็นภาวะแทรกซ้อนสำคัญที่พบได้ ร้อยละ 25 - 50 ในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจนตรงกัน มีการศึกษาพบว่าไซโตไคน์หลายชนิดอาจมีบทบาทในพยาธิวิทยาของภาวะดังกล่าว การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของซิงเกิลนิวคลีโอไทด์ พอลิมอร์ฟิซึมของทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์ แอลฟาอิน และการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันในผู้ป่วยไทยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจนตรงกัน

วิธีการศึกษา: การศึกษาย้อนหลังถึงในผู้ป่วย 60 รายที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจนตรงกัน (15 รายมีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน และ 45 รายไม่มีภาวะดังกล่าว) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิดซิงเกิล นิวคลีโอไทด์ พอลิมอร์ฟิซึมของทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์ แอลฟาอินและการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันที่ตำแหน่ง -308, -238 และ -863

ผลการศึกษา: มีแนวโน้มความสัมพันธ์แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติของการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันทุกระดับความรุนแรงและอัลลีล -238A (OR = 6.77, P = 0.087) และพบความสัมพันธ์เพิ่มอัตราการรอดชีวิตทั้งหมดเมื่อเปรียบเทียบระหว่างอัลลีลที่ตำแหน่งเดียวกันของอัลลีล-238A และอัลลีล-308A ไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตทั้งหมดที่ 5 ปี ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันและกลุ่มที่ไม่มีภาวะดังกล่าว

สรุปผลการศึกษา: มีแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีล -238A และการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันทุกระดับความรุนแรงในผู้ป่วยไทยและพบว่า อัลลีล-238A และอัลลีล-308A อาจมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตทั้งหมดเมื่อเทียบกับอัลลีลในตำแหน่งเดียวกัน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงผลของไซโตไคน์ชนิดอื่นรวมทั้งประชากรตัวอย่างในการศึกษาที่มากกว่านี้

ภาควิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5674091230 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA GENE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM / ACUTE GRAFT VERSUS HOST DISEASE / ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION / THAI

AKKAPON POOLCHAROEN: RELATIONSHIP BETWEEN TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNFA) GENEPOLYMORPHISM AND ACUTE GRAFT VERSUS HOST DISEASE AFTER HLA-MATCHED SIBLING ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION) IN A THAI POPULATION. ADVISOR: ASST. PROF. UDOMSAK BUNWORASATE, M.D., CO-ADVISOR: PROF. NATTIYA HIRANKARN, M.D., Ph.D., 42 pp.

Background: Acute graft-versus-host disease (acute GVHD) afflicts 25% - 50% of HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic cell transplantations. Some evidences suggest that certain cytokines may play a significant role in the development of acute GVHD. This study aimed to investigate the role of tumor necrosis factor alpha (TNFA) gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the occurrence and severity of acute GVHD after HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic cell transplantations in a Thai population.

Method: A total of 60 patients (15 patients with acute GVHD and 45 patients without acute GVHD) were retrospectively evaluated for clinical outcomes after matched -sibling allogeneic hematopoietic cell transplantation. SNPs of TNFA gene at position -308, -238, - 863 was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. The associations between these SNPs and acute GVHD were analysed by chi-squared test.

Result: No statistically significant differences was found, but trends towards association were seen between SNPs and acute GVHD of all grades for alleles -238A (OR =6.77, P=0.087) and trends towards association with improvement of overall survival comparing between genotypes of each allele were seen for alleles-238A and -308A. Five-year overall survival rates comparing the patients with acute GVHD with those without acute GVHD revealed no statistically significant differences.

Conclusion: These findings suggest that TNFA gene SNPs at position -238A maybe associated with acute GVHD and also maybe associated with improvement of overall survival. However, further studies with more patients and cytokine genes are required to identify the cytokine gene polymorphisms and their associations with transplant-related complication in the Thai population.

Department: Medicine

Field of Study: Medicine

Academic Year: 2014

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย

หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์อุดมศักดิ์ บุญวรเศรษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

2.ศาสตราจารย์ ดร.แพทย์หญิงณัฐิยา หิรัญกาญจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

3.อาจารย์ แพทย์หญิงจันทิญา จันสว่างภูวนะ ให้ข้อเสนอแนะและความคิดเห็น

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครูอาจารย์ ที่ช่วยอบรมสั่งสอนให้ข้าพเจ้า

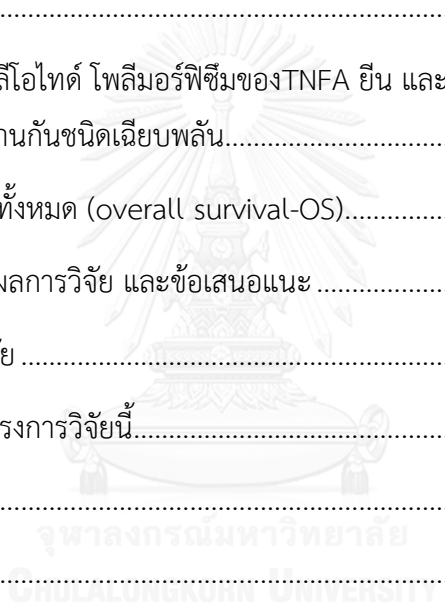


## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	3
1.4 สมมุติฐาน .....	3
1.5 กรอบแนวคิดของการวิจัย .....	4
1.6 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ .....	4
1.7 ปัญหาทางจริยธรรม.....	5
1.8 ข้อจำกัดทางการวิจัย.....	5
1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	6
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	13
3.1 รูปแบบการวิจัย .....	13
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย.....	13

3.3 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย.....	14
3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	16
3.5 การดำเนินการวิจัย.....	17
3.6 การรวบรวมข้อมูล.....	18
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	20
4.1 ข้อมูลพื้นฐาน.....	20
4.2 ผลของซิงเกิลนิวคลีโอไทด์ โพลีมอร์ฟิซึมของTNFA ยีน และปัจจัยเสี่ยงอื่นต่อการเกิด ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน.....	24
4.3 อัตราการรอดชีวิตทั้งหมด (overall survival-OS).....	27
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	35
5.1 อภิปรายผลการวิจัย.....	35
5.2 ข้อจำกัดสำหรับโครงการวิจัยนี้.....	37
5.3 สรุปผลการศึกษา.....	37
รายการอ้างอิง.....	38
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	42





## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดง Acute graft-versus-host disease (GVHD) staging .....	15
ตารางที่ 2 แสดง Acute graft-versus-host disease (GVHD) grading.....	15
ตารางที่ 3 แสดงความถี่ของจีโนไทป์ของทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์ แอลฟาอิน .....	21
ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย.....	21
ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลพื้นฐานตามระดับความรุนแรงของภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน...	23
ตารางที่ 6 แสดง Univariate analysis ระหว่าง จีโนไทป์ของ TNFA ยีนรวมถึงปัจจัยเสี่ยงอื่น และการเกิด Acute GHVD all grade .....	25
ตารางที่ 7 แสดง Univariate analysis ระหว่าง จีโนไทป์ของ TNFA ยีนรวมถึงปัจจัยเสี่ยงอื่น และการเกิด Acute GHVD grade II-IV .....	26
ตารางที่ 8 แสดง Univariate analysis ระหว่าง จีโนไทป์ของ TNFA ยีนรวมถึงปัจจัยเสี่ยงอื่น และการเกิด Acute GHVD gr III-IV .....	27

## สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 แสดงพยาธิวิทยาของการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน<sup>(22)</sup> ..... 8



## สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดของการวิจัย .....	4
แผนภูมิที่ 2 แสดง Overall survival ในผู้ป่วยทั้ง 60 คน .....	28
แผนภูมิที่ 3 แสดง Overall survival ระหว่างกลุ่มที่มี acute GVHD และกลุ่มที่ไม่มี acute GVHD .....	29
แผนภูมิที่ 4 แสดง Overall survival ระหว่างกลุ่มที่มี acute GVHD gr II-IV และกลุ่มที่ไม่มี acute GVHD.....	30
แผนภูมิที่ 5 แสดง Overall survival ระหว่างกลุ่มที่มี acute GVHD gr III-IV และกลุ่มที่ไม่มี acute GVHD.....	31
แผนภูมิที่ 6 แสดง Overall survival ระหว่างอัลลีลที่ตำแหน่ง -863.....	32
แผนภูมิที่ 7 แสดง Overall survival ระหว่างอัลลีลที่ตำแหน่ง -308.....	33
แผนภูมิที่ 8 แสดง overall survival ระหว่างอัลลีลที่ตำแหน่ง -238 .....	33
แผนภูมิที่ 9 แสดง Relapse free survival .....	34

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
OR	Odds Ratio
HLA	Human Leucocyte Antigen
TNFA	Tumor Necrosis Factor Alpha
GVHD	Graft-Versus-Host Disease
TBI	Total Body Irridation



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การทำ HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation หรือการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจน (Human leucocyte antigen: HLA) ตรงกันคือการปลูกถ่ายที่ผู้ป่วยและผู้บริจาคมีเอชแอลเอแอนติเจนชนิด HLA - A, HLA - B, HLA - DRB1 ตรงกัน 6 ตำแหน่งเป็นวิธีการที่มีการศึกษาและนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในไขกระดูกทั้ง โรคมะเร็งทางโลหิตวิทยาเช่นมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง, โรคโลหิตจางธาลัสซีเมีย, โรคไขกระดูกฝ่ออย่างรุนแรง (severe aplastic anemia) และโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลืองบางชนิด<sup>(1)</sup>

แม้ความก้าวหน้าจากศึกษาในปัจจุบันทำให้มีความรู้ความเข้าใจ เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน การทำงาน และ โครงสร้างสภาวะแวดล้อมของเซลล์ในไขกระดูก จะทำให้สามารถนำมาพัฒนาวิธีการ ในกระบวนการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคจนประสบความสำเร็จ แต่อัตราการมีชีวิตรอดของผู้ป่วยในระยะยาวมีเพียงร้อยละ 40 - 60 จากภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ ที่เกิดขึ้นภายหลัง<sup>(2)</sup>

จากการศึกษา Human genome sequencing ได้พบว่า การที่มี single nucleotide polymorphisms (SNPs) ทั้ง ในตำแหน่ง regulatory และ coding region ของไซโตไคน์ ยีนต่างๆ ส่งผลต่อระดับของระดับของไซโตไคน์นั้นๆ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยได้พบของความสัมพันธ์ ระหว่าง SNPs ของไซโตไคน์หลายชนิด กับการเกิดภาวะแทรกซ้อนภายหลังจากการปลูกถ่ายอวัยวะเช่นภายหลังการปลูกถ่ายหัวใจ<sup>(3,11)</sup>

สำหรับพยาธิสภาพของภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจนตรงกันโดยพบได้ ร้อยละ 25 - 50 พบว่าสารทูเนออร์ เนโครซิส แฟคเตอร์ แอลฟา (Tumor necrosis factor alpha; TNFA) มีบทบาทสำคัญทุกขั้นตอน มีรายงานพบว่าระดับของสาร TNFA ที่สูงในเลือดก่อนการปลูกถ่ายมีความสัมพันธ์กับอุบัติการณ์ของเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน และยังคงสัมพันธ์กับความรุนแรงภาวะดังกล่าว<sup>(1, 8, 10, 11, 13, 24)</sup>

มีการศึกษาพบว่า SNPs ของยีน TNFA และ graft versus host disease ของประชากรในทวีปเอเชียจะมีอัลลีล ที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติเป็นเพราะไซโตไคน์ของประชากรแต่ละเชื้อชาติมีความหลากหลายแตกต่างกันมาก รวมถึงผลของไซโตไคน์ โพลีมอร์ฟิซึมต่อผลแทรกซ้อนของการทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในประชากรแต่ละเชื้อชาติที่ต่างกัน ก็มีความแตกต่างกัน<sup>(7,8,10,12,17)</sup>

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของซิงเกิลนิวคลีโอไทด์ โพลีมอร์ฟิซึมของ ทุเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์ แอลฟาในคนไทยที่เป็นผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตและได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต จากพี่น้องที่มีเฮชแอลเอแอนติเจนตรงกัน ว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันในประชากรไทยหรือไม่ แล้วนำผลที่ได้มาปรับปรุงสูตรยาที่ให้เพื่อป้องกันภาวะดังกล่าวให้เหมาะสมในประชากรไทยต่อไป

## 1.2 คำถามการวิจัย

### คำถามหลัก (Primary research question)

ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเฮชแอลเอแอนติเจนตรงกัน และมี เอ อัลลีล (A allele: AA, AG) ที่ตำแหน่ง -308 มีการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน มากกว่า ผู้ที่ไม่มี เออัลลีล (non-A: GG) ใช่หรือไม่ อย่างไร

### คำถามรอง (Secondary research question)

- 1) ความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิด SNPs ของ TNFA gene ที่ตำแหน่ง -308A, -238A, -863A ในผู้ป่วยไทยที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตเป็นอย่างไร
- 2) อัตราการรอดชีวิตทั้งหมด (overall survival) ภายหลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเฮชแอลเอแอนติเจนตรงกันมีความสัมพันธ์กับ TNFA gene SNPs หรือไม่ อย่างไร
- 3) SNPs ของ TNFA gene ที่ตำแหน่ง -863A, -238A มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันหรือไม่ อย่างไร
- 4) การเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตทั้งหมดหรือไม่

### 1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

#### วัตถุประสงค์ทั่วไป (General objectives )

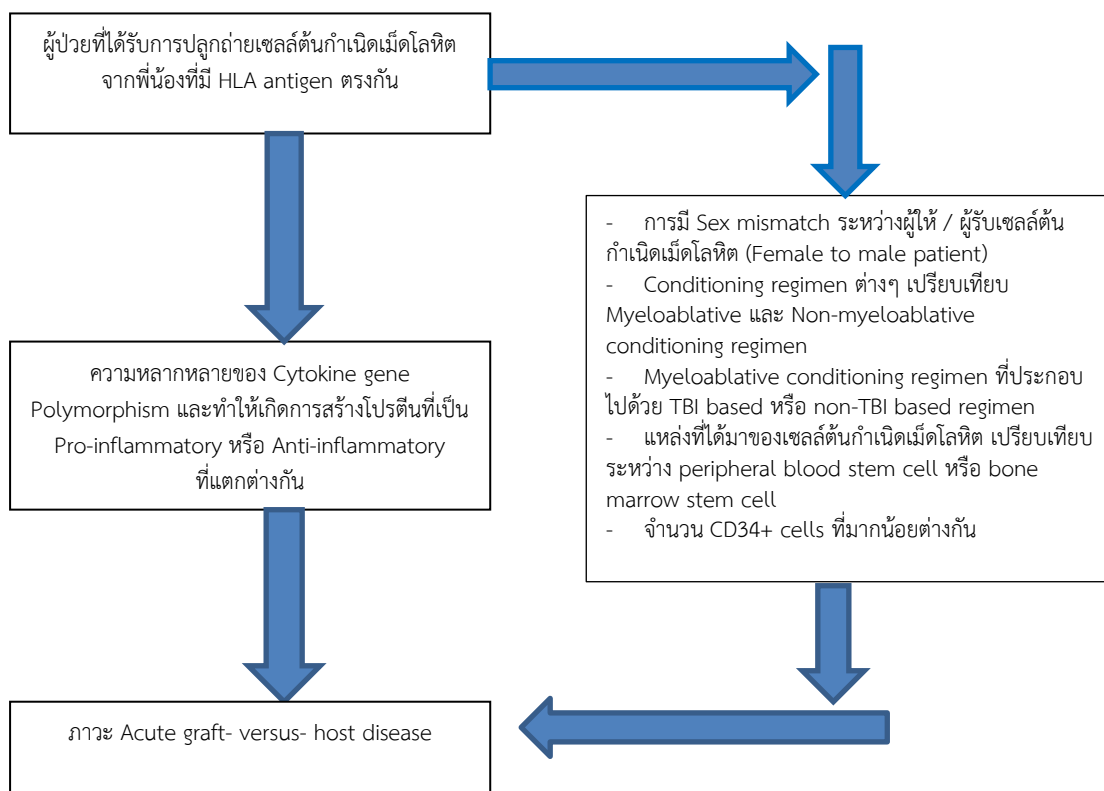
1. เพื่อศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม SNPs ของ TNFA gene ในประชากรไทย ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอแอนติเจนตรงกันทั้งในกลุ่มที่มีภาวะแทรกซ้อนเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลันและกลุ่มที่ไม่มี จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความสัมพันธ์กับการเกิดผลแทรกซ้อนดังกล่าว
2. เพื่อศึกษาหาปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน นอกเหนือจาก SNPs ของ TNFA gene
3. เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตทั้งหมดของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตและได้รับการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอแอนติเจนตรงกัน

### 1.4 สมมุติฐาน

ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจนตรงกัน และมี เออัลลีล (A allele: AA, AG) ที่ ตำแหน่ง -308 มีการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน ไม่ต่างจาก ผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่ไม่มี เออัลลีล (A allele: AA, AG)

## 1.5 กรอบแนวคิดของการวิจัย

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวคิดของการวิจัย



CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 1.6 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

รวบรวมผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังของเม็ดเลือดขาวชนิด มัยอีลอยด์, หรือโรคมัยอีโลดิสพลาสติก ซินโดรม หรือมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิด ลิมโฟยด์ ที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจน ตรงกัน ทั้ง 6 ตำแหน่งที่มารับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และมีตัวอย่างเลือดเก็บแช่แข็งไว้ที่ห้องปฏิบัติการตรวจเนื้อเยื่อ (tissue typing) ดีกอปร.ชั้น 17 ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2549 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2557



รวบรวมข้อมูลทั่วไป ได้แก่ เพศ, อายุ, หมู่โลหิต, ประเภท conditioning regimen ที่ใช้, ปริมาณของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (CD 34+ cell doses), แหล่งที่มาของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (peripheral blood หรือ bone marrow stem cell), ข้อมูลการวินิจฉัยภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกัน ชนิดเฉียบพลัน, ข้อมูลการมีชีวิตรอด, ข้อมูลการเสียชีวิต

ตรวจความหลากหลาย SNPs ของ TNFA gene ของผู้ป่วยทางห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เพื่อตรวจ TNFA gene ที่ promoter position –308 (A/G), –863 (A/C) และ –238 (G/A)

## 1.7 ปัญหาทางจริยธรรม

หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person) การวิจัยนี้เป็นการศึกษาจากเลือด ตัวอย่างที่เก็บไว้ ไม่มีการติดต่อเพื่อเก็บข้อมูลโดยตรงจากผู้เข้าร่วมในการวิจัย ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้เข้าร่วมในการวิจัย โดยในแบบบันทึกข้อมูลจะไม่มี identifier ที่จะระบุถึงตัวผู้เข้าร่วมในการวิจัย

### หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence)

ผู้เข้าร่วมในการวิจัยจะไม่ได้รับประโยชน์ใดๆ อาจเกิดความเสียหายต่อตัวผู้เข้าร่วมในการวิจัย เพียงเล็กน้อย คือความลับของผู้เข้าร่วมในการวิจัยอาจถูกเปิดเผย ผู้วิจัยจะเก็บรักษาความลับของผู้เข้าร่วมในการวิจัย

### หลักความยุติธรรม (Justice)

คือมีเกณฑ์การคัดเลือกและออกชดเชย เมื่อพิจารณาถึงความเสี่ยงและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ผู้วิจัยจึงจะขอยกเว้นการขอความยินยอมจากผู้เข้าร่วมในการวิจัย ทั้งนี้ผู้วิจัยจะขออนุญาตจากผู้อำนวยการโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

## 1.8 ข้อจำกัดทางการวิจัย

เป็นการศึกษาแต่ในผู้ป่วยไทยเท่านั้น และศึกษาเฉพาะไซโตไคน์ ยีน โพลีมอร์ฟิซึมของ TNFA เพียงชนิดเดียว

เป็นการศึกษาแบบ Retrospective case control จึงอาจทำให้มีอคติทางการวิจัยเกิดขึ้น

ตำแหน่งอัลลีล โพลีมอร์ฟิซึมของ TNFA ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน ในแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกันซึ่งไม่มีข้อมูลดังกล่าวในประเทศไทย ดังนั้นการเลือกตำแหน่งอัลลีลมาตรวจจึงมีความสำคัญ

### 1.9 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของ SNPs ของ TNFA ยีน และการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลัน ในประชากรไทยที่ได้รับการรักษาด้วยวิธีการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตซึ่งจะมีผลในการปรับยาที่ให้เพื่อป้องกันการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลันให้เหมาะสมกับประชากรไทย

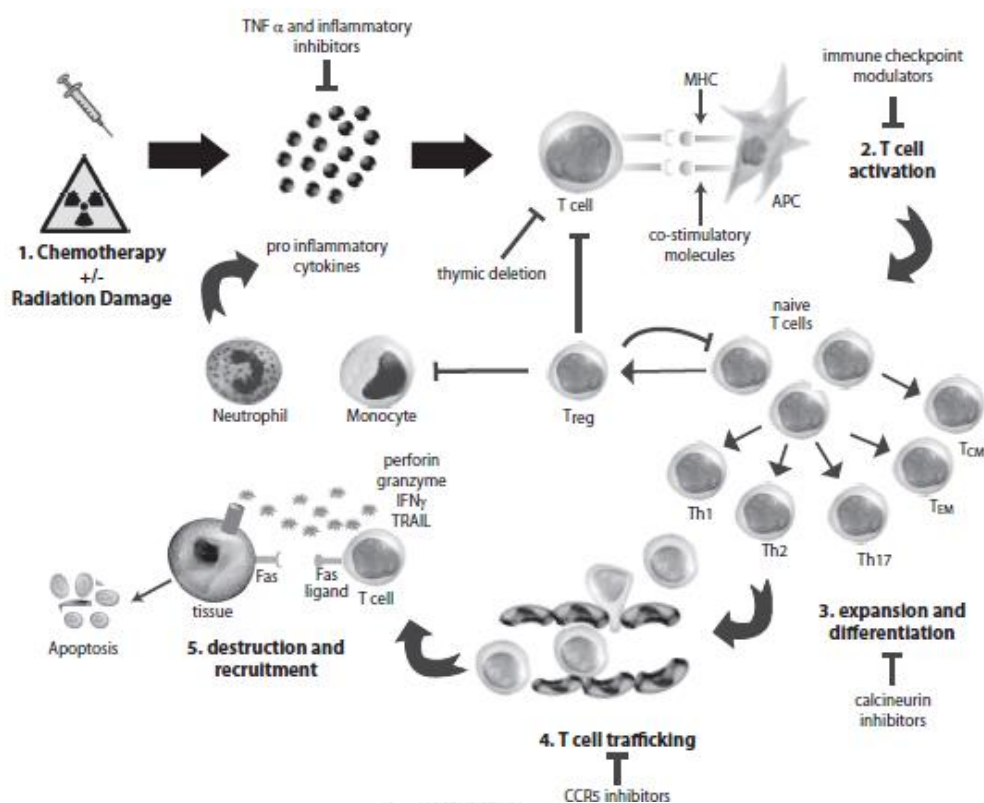


## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน (Acute graft-versus-host disease) เป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้ร้อยละ 25 - 50 หลังการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจน (Human leucocyte antigen) ตรงกันแม้ว่าจะได้รับยากดภูมิ และทำให้เพิ่มอัตราการเจ็บป่วย รวมถึงเพิ่มอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ โดยภาวะนี้ มักจะเกิดขึ้นภายใน 100 วันแรกภายหลังจากการทำปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต และมีอาการแสดงทางคลินิกที่พบได้บ่อยใน 3 อวัยวะคือ ผิวหนัง ทางเดินอาหารและตับ<sup>(23,25,26,27)</sup> โดยภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันนี้ มีพยาธิกำเนิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างเม็ดเลือดขาวชนิด T- lymphocyte ของผู้บริจาค เม็ดเลือดขาวผู้ป่วยที่ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell และสารไซโตไคน์ต่างๆ ประกอบไปด้วยขั้นตอนแรก คือ การเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (tissue injury) จาก conditioning regimen ที่ได้รับในขั้นตอนแรกของกระบวนการปลูกถ่ายจะกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวผู้ป่วยที่ทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell และการเกิดการบาดเจ็บต่อเนื้อเยื่อของผู้รับ (tissue injury) ทำให้มีการปลดปล่อยไซโตไคน์ ชนิดต่างๆ ที่เป็น Pro-inflammatory cytokine เช่น interleukin-1 , tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 ต่างๆ จากนั้น antigen presenting cell ของผู้ป่วย และ inflammatory cytokine เหล่านี้ จะไปกระตุ้นเม็ดเลือดขาว T- lymphocyte ของผู้บริจาค ทำให้มีการหลั่ง Pro- inflammatory cytokine ชนิด interleukin-2 และ interferon gamma ให้เกิดการกระตุ้นเม็ดเลือดขาว ชนิด T-lymphocyte, natural killer cell และ macrophage ทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์ต่างๆ ออกมาเป็นจำนวนมากกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้น โดยเซลล์ที่ตอบสนองนี้จะมารวมกันเพื่อก่อให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ และทำให้เซลล์ที่เป็นเซลล์เป้าหมายเกิดการตายลง (Apoptosis) และก่อให้เกิดลักษณะอาการทางคลินิกขึ้นดังรูปภาพที่ 1<sup>(22,23,24,28,29)</sup>

รูปภาพที่ 1 แสดงพยาธิวิทยาของการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน<sup>(22)</sup>



จากข้อมูลการเกิด เนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันที่พบได้ร้อยละ 25-50 หลังการปลูกถ่าย เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอ แอนติเจน (Human Leucocyte Antigen) ตรงกัน<sup>(1,6)</sup> และการศึกษาถึงพยาธิวิทยาของการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันทำให้มีความเข้าใจและเห็นความสำคัญของไซโตไคน์ต่อการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันและ ผลการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต การเกิดการเพิ่มขึ้นของ ไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ในระยะแรกของพยาธิวิทยาการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน และการเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากของไซโตไคน์ ในระยะถัดมาก่อนที่จะกระตุ้นเม็ดเลือด T-lymphocyteและมีการทำลายเนื้อเยื่อตามมา ทำให้มีการศึกษาพบว่าระดับของไซโตไคน์ก่อนและหลังการทำการปลูกถ่าย มีผลต่อผลลัพธ์ของการทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต จากการศึกษา Human genome sequencing ได้พบว่า การที่มี SNPs ทั้งในตำแหน่ง Regulatory และ Coding region ของ ไซโตไคน์ยีนต่างๆ ส่งผลต่อระดับของระดับของ ไซโตไคน์นั้นๆและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยได้พบของความสัมพันธ์ ระหว่าง SNPs ของ ไซโตไคน์หลายชนิดกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนภายหลังจากการปลูกถ่ายและผลลัพธ์ของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตได้เช่นเดียวกัน<sup>(3,5,6,8,9,13,14,15,16)</sup>

TNFA เป็น pro inflammatory cytokine สร้างโดยเม็ดเลือดขาว monocyte และ macrophage และ T lymphocyte ซึ่งยีน ที่ควบคุมการสร้าง TNFA มีความหลากหลายมาก และอยู่บน Class III region ของ Major histocompatibility complex บนโครโมโซมคู่ที่ 6 มีการศึกษาพบว่า SNPs ของ TNFA ยีนในแต่และจีโนมไทป์ จะมีพบต่อระดับของ TNFA ในเลือด (11,13,15,16) โดยตำแหน่งที่มีการศึกษากันมากคือ -308 โดยมีการศึกษาพบว่า อัลลีล 308A มีการเพิ่มขึ้นของ transcriptional activity และพบว่าสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ TNFA (33,34) อีกตำแหน่งที่มีการศึกษาคือ -238A มีการศึกษาพบว่าสัมพันธ์กับ repression site ซึ่งพบว่า -238A มีการเพิ่มของ Transcriptional repression แต่การศึกษาในการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน มีทั้งข้อมูลที่รายงานถึงอุบัติการณ์ในการเกิดมากขึ้น และข้อมูลที่รายงานผลตรงกันข้าม และตำแหน่งสุดท้ายที่มีความน่าสนใจคือ -863 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการจับกับ NF-kB มีการศึกษาพบว่า A อัลลีล มีการเพิ่มขึ้น 3-4 เท่าของ LPS-induced gene expression มีรายงานพบว่าสัมพันธ์อุบัติการณ์ของ severe rheumatoid arthritis และการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน จากศึกษาของ Hirankarn และคณะ (21,30) ได้รายงานความชุกของ TNFA ยีน ในประชากรไทยที่เป็นคนปกติแต่ละอัลลีล ดังนี้ -308 พบอัลลีล A 9.7%, G 90.3% , - 863 พบอัลลีล A 15.3%, C 84.7% และ -238 พบ อัลลีล A 3.6%, G 96.4%

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง มีผู้กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างผลแทรกซ้อน ภายหลังจากการทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเนื้อเยื่อ HLA ตรงกัน กับ ความหลากหลายของ Tumor necrosis factor alpha (TNFA) gene single nucleotide polymorphism ดังนี้

Mulliganและคณะ<sup>(6)</sup> ได้ทำการศึกษา 22 Polymorphism ของ 11 immunoregulatory genes ในผู้ป่วยที่ได้รับการทำปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจำนวน 160 คน เก็บข้อมูลระหว่างปีคศ 1991 - 1990 จากศูนย์ปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในออสเตรเลีย โดยผู้ป่วยได้รับ Conditioning regimen แบบ Myeloablative regimen พบว่า SNPs ของ TNFA 488A) จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันทุกระดับความรุนแรง(odds ratio [OR] 16.9), ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน grades II-IV (OR 3.3), ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเรื้อรัง (OR 12.5), และอัตราการเสียชีวิตในช่วงต้นภายหลังจากการทำปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (OR 3.4) และยังพบว่า Fas -670G ของผู้ป่วย และ Interleukin (IL)-6 -174G ของผู้

บริจาค จะเป็นปัจจัยอิสระต่อการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน ในขณะที่ Interleukin-10 ATA and Fas -670 genotype ของผู้ป่วยก็จะเป็นปัจจัยอิสระต่อการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเรื้อรังด้วย นอกเหนือไปจากนี้ยังพบว่า Interleukin-1beta+3953T ของผู้ป่วย มีความสัมพันธ์กับภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันที่ต่ำ ในขณะที่ Fas -670G จะเกี่ยวข้องกับ การติดเชื้อภายหลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต

Xiao และคณะ<sup>(17)</sup> ได้ทำการศึกษาเรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างงาไซโตไคน์ ยีน SNPs และ ผลลัพธ์ของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในผู้ป่วยชาวจีนโดยผู้บริจาคที่ไม่ใช่พี่น้อง (unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation) โดยศึกษาในผู้ป่วย 138 คน ที่ได้รับ Unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation ทำการตรวจ TNFA genes 4 ตำแหน่งคือ -1031(T>C) , -863 (C>A), -857(C>T), -238 (G>A) และ TNFB gene +252 (A>G) พบว่า การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในผู้ป่วยและหรือผู้บริจาคที่มี จีโนไทป์ ของ TNFA ที่ตำแหน่ง -857 เป็นแบบ CC genotype และในผู้ป่วย ที่มี ยีน TNFB ตำแหน่ง +252 เป็น แบบ G allele positivity มีอุบัติการณ์ การเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันมากกว่า โดยในการทำ Multivariate analysis พบว่าในกลุ่มที่ผู้บริจาคมี จีโนไทป์ -857 CC มี Relative risk 2.29 ,P=0.006 และในผู้ป่วย ที่มี ยีน TNFB ตำแหน่ง +252 มี Relative risk 1.789 ,P=0.036 ในการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันในทุก ระดับความรุนแรงและนอกจากนี้ ยังพบว่าในกลุ่มที่ผู้บริจาคมี Genotype -857 CC มี Relative risk 3.748,p=0.002 ,P=0.063 และในผู้ป่วย ที่มี ยีน TNFB ตำแหน่ง +252 มี Relative risk 1.1.823,p=0.063 ในการเกิด ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันระดับ grades II-IV

Takahashi และคณะ<sup>(12)</sup> ได้ทำการศึกษาเรื่อง TNFA ยีน และ IL-10 ยีน SNPs ต่อระดับ ความรุนแรงของการเกิด ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน และการเกิด ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเรื้อรังในผู้ป่วยชาวจีนที่ ได้รับการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต 62 คน โดยได้รับ graft เป็นชนิด non-T cell depleted ทำการตรวจ TNFA ยีน และ IL-10 ยีน SNPs ทั้ง ก่อน และหลัง engraftment โดยทำการตรวจอัลลีล -308 พบว่าการมี donor derived A haplotype สัมพันธ์กับการเกิด ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน grade III-IV > grade 0-II (2/6 vs 2/56, p=0.04) และการมี donor derived IL-10 G haplotype จะมีการเกิดภาวะเนื้อเยื่อ ต่อต้านกันชนิดเรื้อรังมากกว่ากลุ่มที่ไม่มี ( p=0.01)

Bertinetto และคณะ<sup>10)</sup> ได้ทำการศึกษา ดูความสัมพันธ์ของ cytokine gene polymorphism และการเกิดภาวะ Acute graft versus host disease ในผู้ป่วยชาวอิตาลี 77 คนที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเฮชแอลเอ แอนติเจนตรงกันระหว่างปี ค.ศ. 2000-2003 โดยได้ทำการตรวจ TNFA gene polymorphism ที่ alleles -863 C/A, -857 C/T, และ G/A ที่ alleles -574, -308, -376, -244, -238 และ IL-10 gene polymorphism ที่ตำแหน่ง -1082 G/A, -819 C/A, -592 C/T พบว่า ผู้ป่วยที่มี อัลลีลที่ตำแหน่ง -238 แบบ AA, AG มีการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังน้อยกว่า GG อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ (p=0.027)

Ishikawa Y และคณะ<sup>(7)</sup> ได้ทำการศึกษา ในชาวญี่ปุ่น ที่ได้รับการรักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต จากผู้บริจาคที่ไม่ใช่พี่น้อง 462 คน ระหว่างปี 1994 - 1996 โดยการตรวจ Tumor necrosis factor alpha gene ตำแหน่ง Upstream region 3 alleles คือ -1031, -863, -857 และ Tumor necrotic factor alpha receptor 2 alleles คือ 196M, 196R พบว่า การทำการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในผู้ป่วยและหรือ ผู้บริจาคที่มี C haplotype ที่อัลลีล -1031 จะพบมีอุบัติการณ์ของการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน grades III-IV มากกว่า (P <0.05 สำหรับผู้บริจาคและ P<0.01 สำหรับผู้ป่วย) และพบอัตราการเป็นซ้ำของโรค (P<0.025 สำหรับผู้บริจาคและ P <0.01 สำหรับผู้ป่วย) มากกว่ากลุ่มที่มี Haplotype T homozygous สำหรับการปลูกถ่ายที่ผู้บริจาคมี TNFR-2 196 R จะพบอุบัติการณ์ของเกิด Severe graft-versus-host disease (p<0.05) และพบการกลับเป็นซ้ำของโรคน้อยกว่า ผู้บริจาคที่มี TNFR-2 196M สำหรับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในผู้รับที่มี TNFR-2 196R ไม่มีความสัมพันธ์กับ ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันแต่เพิ่มอัตราการกลับเป็นซ้ำ (p <0.025)

3.6 Goyal R K และคณะ<sup>(20)</sup> ได้การเก็บข้อมูลในศูนย์ปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในประเทศอเมริกา และประเทศแคนาดา ที่เป็นสมาชิกของ Pediatric blood and bone marrow consortium scientific committee โดยศึกษาในผู้ป่วยเด็ก (อายุเฉลี่ย 11ปี) ที่ป่วยเป็นโรคที่มีความผิดปกติของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตในไขกระดูก ทั้งหมด 180 คน โดยผลการศึกษาไม่พบว่า Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism มีผลต่ออุบัติการณ์โดยรวม ของ ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันแต่พบว่ามีความสัมพันธ์ กับระดับความรุนแรงของ ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันโดยเฉพาะเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลเฉพาะคนผิวขาว โดยการเกิด ภาวะ

เนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเย็บพลัน grades II-IV จะมีความสัมพันธ์กับอัลลีล -857 T (HR=0.47, p=0.04) -238 A allele (HR=1.76, p=0.002) ส่วนการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเย็บพลัน grades III-IV จะสัมพันธ์กับ -1031C อัลลีล (HR =2.38, p=0.03), -863 A อัลลีล (HR=3.18, p=0.003)





## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 รูปแบบการวิจัย

Retrospective case-control study

#### 3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

##### ประชากรเป้าหมาย ( target population )

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังของเม็ดเลือดขาวชนิด มัยอีลอยด์, โรคมัยอีโลดิสพลาสติก ซินโดรม และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิดลิมโฟยด์ ที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเฮชแอลเอแอนติเจน ตรงกัน ที่ตำแหน่ง HLA A, HLA-B, HLA-DRB1 ทั้ง 6 ตำแหน่ง

##### ประชากรตัวอย่าง ( study population)

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังของเม็ดเลือดขาวชนิด มัยอีลอยด์, โรคมัยอีโลดิสพลาสติก ซินโดรม และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิดลิมโฟยด์ ที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเฮชแอลเอแอนติเจน ตรงกัน ที่ตำแหน่ง HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 ทั้ง 6 ตำแหน่ง ตั้งแต่เดือนมกราคม 2549 - ธันวาคม 2558

##### เกณฑ์ในการคัดเลือกเข้าศึกษา (Inclusion criteria)

- 1) ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังของเม็ดเลือดขาวชนิด มัยอีลอยด์, โรคมัยอีโลดิสพลาสติก ซินโดรม และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิดลิมโฟยด์ ที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเฮชแอลเอแอนติเจน ตรงกัน ที่ตำแหน่ง HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 ทั้ง 6 ตำแหน่ง และมีตัวอย่างเลือดเก็บรักษาไว้ที่ห้องปฏิบัติการเฮชแอลเอ
- 2) ผู้ป่วยที่ได้รับยา methotrexate ร่วมกับยา cyclosporine เป็นยาที่ป้องกันการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน

3) มีการบันทึกข้อมูลในเวชระเบียนเกี่ยวกับการวินิจฉัยภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลัน

#### เกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

- 1) ผู้ป่วยที่บันทึกข้อมูลทั่วไปและข้อมูลในการวินิจฉัยภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันไม่ครบ
- 2) ผู้ป่วยที่ตีเอ็นเอในตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้มีการเสื่อมสภาพ หรือ ไม่สามารถแปรผลการตรวจได้

### 3.3 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย

HLA matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation หมายถึง การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอแอนติเจน ตรงกันทั้ง 6 ตำแหน่ง คือ HLA-A, HLA-B, HLA -DRB1

Tumor necrosis factor alpha gene single nucleotide polymorphism หมายถึง ความหลากหลายของพันธุกรรมของ cytokine gene ที่ผลิต - Tumor necrosis factor alpha protein ในระดับ single nucleotide

Acute graft-versus-host disease หมายถึง ภาวะการต่อต้านกันในช่วงต้น (โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน 100 วันแรก) ระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้บริจาคเสตีมเซลล์กับเนื้อเยื่อของผู้รับบริจาค โดยจะมีอาการแสดงให้เห็น 3 อวัยวะใหญ่ๆคือ ผิวหนัง, ทางเดินอาหารและตับโดยในการศึกษานี้หมายถึงผู้ป่วยที่มี Acute graft versus host disease grades I-IV ตาม Glucksberg grading and staging criteria ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดง Acute graft-versus-host disease (GVHD) staging

Stage	Skin involvement	Liver involvement	Intestinal tract involvement
1	Maculopapular rash <25% of body surface area	Total bilirubin 2.0–3.0 mg/dL	Diarrhea >500 mL/day
2	Maculopapular rash 25%- 50% of body surface area	Total bilirubin 3.0–6.0 mg/dL	Diarrhea >1000 mL/day
3	Generalized erythroderma	Total bilirubin 6.0–15.0 mg/dL	Diarrhea >1,500 mL/day
4	Generalized erythroderma with bullae formation and desquamation	Total bilirubin >15.0 mg/dL	Severe abdominal pain with or without ileus

ตารางที่ 2 แสดง Acute graft-versus-host disease (GVHD) grading

Grade	Degree of organ involvement
I	1-2 Skin rash, no gut involvement, no liver involvement, no decrease clinical performance
II	1-3 Skin rash, 1 gut involvement or 1 liver involvement (or both), mild decrease clinical performance
III	2-3 Skin rash, 2-3 gut involvement or 2-4 liver involvement ( or both), marked decrease clinical performance
IV	Similar to grade III with 2-4 organ involvement and extreme decrease in clinical performance

โดยแบ่งระดับความน่าเชื่อถือในการวินิจฉัยภาวะ Acute –graft- versus disease ดังนี้

1) Definite diagnosis acute- graft- versus host disease: มีอาการทางคลินิกที่เข้าได้กับภาวะ acute- graft- versus host disease และได้รับการตรวจยืนยันด้วยการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

2) Probable acute- graft- versus host disease : มีอาการทางคลินิกที่เข้าได้กับภาวะ acute- graft- versus host disease และตอบสนองต่อการรักษา acute- graft- versus host disease แต่ไม่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

3) Possible acute- graft- versus host disease: มีอาการทางคลินิกที่เข้าได้กับ acute- graft- versus host disease แต่อาการดีขึ้นเองโดยไม่ได้รับการรักษา หรือมีสาเหตุอื่นที่สามารถอธิบายอาการดังกล่าว และผู้ป่วยไม่ได้รับการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

โดยผู้ป่วยที่ถือว่ามีความเสี่ยงต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน (Acute- graft - versus host disease) ในการศึกษาผู้ป่วยในข้อ 1 - 2

### 3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

โดยเมื่อการศึกษาวิจัยเป็นแบบ retrospective study (case control study) จะคำนวณประชากรที่ต้องใช้ในการศึกษา โดยกำหนดค่าต่างๆดังนี้

$$\alpha = 0.05$$

$$Z_{\alpha/2} = 1.96$$

$$\beta = 0.20$$

$$Z_{\beta} = 0.842$$

For unmatched case - control study

$$n/\text{group} = \frac{\{Z_{\alpha/2}\sqrt{2P(1-P)} + \sqrt{Z_{\beta}P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)}\}^2}{(P_1 + P_2)^2}$$

เมื่อ

$P2 = \text{โอกาสที่กลุ่มควบคุมจะมีปัจจัยเสี่ยง (overall exposure rate} = 0.1)$

$P1 = P2(R) / 1+P2(R-1)$

$P = (P1+P2) / 2$

$R = \text{odd ratio} = 8$

โดยค่า odd ratio และ ความชุกของ allele ในประชากรไทยอ้างอิงจาก

1) Takahashi H, et al. “Contribution of TNF- a and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation.” Bone Marrow Transplantation (2000) 26, 1317–1323.

2) Hirankarn N, et al. “Genetic susceptibility to SLE is associated with TNF-alpha gene polymorphism -863, but not -308 and -238, in Thai population.” International Journal of Immunogenetics (2007) 34, 425–430.

เนื่องจาก ภาวะ Acute graft-versus-disease นี้ เป็น rare disease โดยอัตราการเกิด

Case : Control = 1 : 3

จำนวนผู้ที่ภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันที่ต้องการคือที่ต้องการคือ 15 คน ในขณะที่กลุ่มควบคุมต้องการประชากรจำนวน 45 คน จึงใช้ผู้ป่วยที่มารับการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคที่เป็นพี่น้องทั้งหมด 60 คน

### 3.5 การดำเนินการวิจัย

รวบรวมรายชื่อผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังของเม็ดเลือดขาวชนิด มัยอีลอยด์, โรคมัยอีโลดิสพลาสติก ซินโดรม และ มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิดลิมโฟยด์ ที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอแอนติเจนตรงกันที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2549 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2557 ที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์

ทำหนังสือขออนุญาตยังผู้อำนวยการโรงพยาบาลเพื่อขออนุญาตใช้ข้อมูลจากเวชระเบียนผู้ป่วย จากนั้นตรวจสอบว่ารายชื่อผู้ป่วยที่ได้มีตัวอย่างเลือดเก็บไว้เพียงพอต่อการตรวจทางห้องปฏิบัติการหรือไม่

บันทึกข้อมูลพื้นฐานทางคลินิกแบบบันทึกข้อมูล

ตรวจ PCR-RFLP ที่ตำแหน่ง -308,-238,-863 ตามขั้นตอนดังนี้

Determination of the -238, -308 and -863 polymorphisms in the promoter region of TNF- $\alpha$  gene was carried out by PCR-RFLP as previously described (Lu LP et al.2004, Allen RA et al. 2001, Wennberg P et al. 2002).

-238G/A polymorphism was amplified using forward primer (5'-AGA AGA CCC CCC TCG GAA CC-3') and reverse primer (5'-ATC TGG AGG AAG CGG TAG TG-3').

-308G/A polymorphism, a 134-bp product was achieved with forward primer (5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3') and reverse primer (5'-CAT CAA GGA TAC CCC TCA CAC TC-3').

-863C/A fragment (125-bp) was amplified with forward primer (5'-GGC TCT GAG GAA TGG GTT AC-3') and reverse primer (5'-CTA CAT GGC CCT GTC TTC GTT ACG-3').

### 3.6 การรวบรวมข้อมูล

ผู้วิจัยเป็นผู้บันทึกข้อมูลทั้งหมดลงในแบบฟอร์มบันทึกข้อมูลและบันทึกลงคอมพิวเตอร์  
แบ่งเป็น

- ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยได้แก่ เพศ, อายุ, โรคทางโลหิตวิทยาที่เป็นสาเหตุให้ต้องรับการรักษา

รักษาโดยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต, ประเภทของการทำปลูกถ่าย, ปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตที่ได้รับ, เพศของผู้บริจาคและเพศของผู้ป่วย (ผู้บริจาคเป็นเพศหญิงและผู้ป่วยเป็นเพศชาย, Myeloablative conditioning regimen หรือ Nonmyeloablative conditioning regimen, การฉายแสงทั้งร่างกายก่อนได้รับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต (TBI base condition regimen)

- ข้อมูลการวินิจฉัยภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน
- ข้อมูลผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ SNPs ของ TNFA gene

### 3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลในส่วนของคุณภาพ (Qualitative or categorical data) เป็นจำนวน (Frequency), ร้อยละ (Percentage) ข้อมูลเชิงปริมาณ (Quantitative data) นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ใช้ตัวทดสอบทางสถิติแบบ Chi- square test รายงานความเสี่ยงในรูป Odd ratio ในการทดสอบทางสถิติใช้ค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 95% โดย P-value ที่น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ และใช้โปรแกรม SPSS version 17 ช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูล



## บทที่ 4 ผลการวิจัย

การศึกษานี้มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรังของเม็ดเลือดขาวชนิด มัยอีลอยด์, โรคมัยอีโลดิสพลาสติก ซินโดรม และมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันชนิดลิมโฟอิด์ ที่ได้รับการรักษาด้วยการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากพี่น้องที่มีเอชแอลเอแอนติเจนตรงกัน 6 ตำแหน่ง (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1) ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และผู้ป่วยได้รับยา methotrexate ร่วมกับยา cyclosporine เป็นยาที่ป้องกันการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน ระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2549 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2557 และเลือดตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้สามารถสกัดดีเอ็นเอ และสามารถแปลผลการตรวจ PCR ได้ทั้งสิ้น 60 คน แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน (กลุ่มผู้ป่วยที่ต้องการศึกษา) 15 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดังกล่าว (กลุ่มควบคุม) 45 คน

### 4.1 ข้อมูลพื้นฐาน

จากการเก็บข้อมูลพื้นฐานของทั้งกลุ่มผู้ป่วยที่ต้องการศึกษาและกลุ่มควบคุม มีจำนวนทั้งหมด 60 คน มีผลการตรวจจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีล ของ TNFA ยีนตามตารางที่ 3 โดยเป็นเพศชายทั้งหมด 25 คน และเพศหญิงทั้งหมด 35 คน แบ่งเป็นกลุ่มที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลัน 15 คน และกลุ่มที่ไม่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลัน 45 คน ในกลุ่มที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลันมีค่ามัธยฐานของอายุผู้ป่วยเท่ากับ 38 ปี (พิสัยระหว่าง 20-52 ปี) ในกลุ่มที่ไม่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลันมีค่ามัธยฐานของอายุผู้ป่วยเท่ากับ 36 ปี (พิสัยระหว่าง 15-62 ปี) ดังตารางที่ 4

ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันมัยอีลอยด์ทั้งหมด 37 คน มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลันลิมโฟอิด์ทั้งหมด 12 คนและมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเรื้อรังมัยอีลอยด์ทั้งหมด 9 คน และโรคมัยอีโลดิสพลาสติก ซินโดรม ทั้งหมด 2 คน ผู้ป่วยได้รับเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิต 5-10 ล้านเซลล์ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทั้งหมด 50 คน และมากกว่า 10 ล้านต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทั้งหมด 4 คน ชนิดของ Conditioning regimen ที่ได้รับก่อนปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด



แบ่งเป็นชนิด Myeloablative regimen ทั้งหมด 55 คน โดยในจำนวนนี้มี 40 คนได้รับ Myeloablative regimen ชนิด TBI base regimen ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 แสดงความถี่ของจีโนไทป์ของทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์ แอลฟาอิน

allele	genotype	number	(%)
-308	GG	58	96.7
	AG	2	3.3
	AA	0	0
-238	GG	57	95
	AG	3	5
	AA	0	0
-863	CC	38	63.3
	AC	20	33.3
	AA	2	3.4

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

	aGVHD (n=15)	No aGVHD (n=45)	p-value
<b>Gender</b>			
— Female	9 (60%)	26 (57.8%)	1.000
— Male	6 (40%)	19 (42.2%)	1.000
<b>Age (years), mean (range)</b>	38 (20, 52)	36 (15, 62)	0.905
<b>TNF alpha</b>			
— -863+ (AA,AC)	6 (27.3%)	16 (72.7%)	0.766
— -308+ (AA,AG)	1 (50%)	1 (50%)	0.441

	aGVHD (n=15)	No aGVHD (n=45)	p-value
- -238+ (AA,AG)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0.151
<b>Diagnosis</b>			
- AML	9 (24.3%)	28 (75.7%)	1.000
- ALL	3 (25%)	9 (75%)	1.000
- CML	2 (22.2%)	7 (77.8%)	1.000
- MDS	1 (6.7%)	1 (2.2%)	0.441
<b>Dose CD 34</b>			
- CD34 <sup>+</sup> <5×10 <sup>6</sup> /kg	0 (0%)	5 (95%)	
- CD34 <sup>+</sup> 5-10×10 <sup>6</sup> /kg	13 (26%)	37 (74%)	
- CD34 <sup>+</sup> >10×10 <sup>6</sup> /kg	2 (40%)	3 (60%)	
<b>Donor to recipient</b>			
- Female to male	4 (36.4%)	7 (63.6%)	
- Other type	11 (22.4%)	38 (77.6%)	
<b>Conditioning regimen</b>			
- Myeloablative conditioning regimen	15 (27.3%)	40 (72.7%)	
- Non myeloablative regimen	0 (0%)	5 (100%)	
<b>TBI base conditioning regimen</b>			
	12 (30%)	28 (70%)	

Values presented as number (%) and Median (IQR). P-value corresponds to Fisher's exact test and Mann-Whitney u test

ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันทุกระดับความรุนแรงทั้งหมด 15 คน ระดับความรุนแรง 2 - 4 ทั้งหมด 11 คน ระดับความรุนแรง 3 - 4 ทั้งหมด 9 คนโดยมีข้อมูลพื้นฐานดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลพื้นฐานตามระดับความรุนแรงของภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน

	Acute GVHD all grade		Acute GVHD grade II-IV		Acute GVHD grade III-IV	
	yes	no	yes	no	yes	no
N	15	45	11	49	9	51
Gender						
— Female	9 (25.7%)	26 (74.3%)	7 (20%)	28 (80%)	5 (14.2%)	30 (85.8%)
— Male	6 (24%)	19 (76%)	4 (16%)	21 (84%)	4 (16%)	21 (84%)
Age (years) , median (range)	38 (20, 52)	36 (15, 62)	38 (20, 52 )	36 (15,62)	38 (20, 47)	36 (15, 62)
TNF alpha -863						
— A+ (AA,AC)	6 (27.3%)	16 (72.7%)	4 (18.2%)	18 (81.8%)	4 (12.5%)	18 (87.5%)
— A- (CC)	9 (23.7%)	29 (76.3%)	7 (18.4%)	31 (81.6%)	5 (13.1%)	33 (86.9%)
TNF alpha -308						
— A+ (AA,AG)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)
— A- (GG)	14 (24.1%)	44 (75.9%)	10 (17.2%)	48 (82.8%)	8 (13.8%)	50 (86.2%)
TNF alpha -238						
— A+ (AA,AG)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)
— A- (GG)	13 (22.8%)	44 (77.2%)	10 (17.5%)	47 (82.5%)	8 (14%)	49 (86%)
CD34 <sup>+</sup> 5-10×10 <sup>6</sup> /kg						
— yes	13 (26%)	37 (74%)	10 (20%)	40 (80%)	7 (14.2%)	42 (85.8%)
— no	2 (20%)	8 (80%)	1 (10%)	9 (90%)	2 (18.2%)	9 (81.8%)
CD34 <sup>+</sup> >10×10 <sup>6</sup> /kg						
— yes	2 (33.4%)	3 (66.6%)	0 (0%)	5 (100%)	1 (20%)	4 (80%)
— no	14 (25%)	42 (75%)	11 (19.6%)	45 (80.4%)	8 (14%)	47 (86%)
Female to male (donor to recipient)						
— yes	4 (36.4%)	7 (63.6%)	3 (27.3%)	8 (72.7%)	2 (18.2%)	9 (81.8%)
— no	11 (22.4%)	38 (77.6%)	8 (16.3%)	41 (83.7%)	7 (14.3%)	42 (85.7%)
Myeloablative conditioning						

	Acute GVHD all grade		Acute GVHD grade II-IV		Acute GVHD grade III-IV	
	yes	no	yes	no	yes	no
N	15	45	11	49	9	51
regimen						
— yes	15 (27.3%)	40 (72.7%)	11 (20%)	44 (80%)	9 (16.4%)	46 (83.6%)
— no	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)	5 (100%)	0 (.0%)	5 (100%)
TBI base regimen						
— yes	12 (30%)	28 (70%)	8 (20%)	32 (80%)	8 (20%)	32 (80%)
— no	3 (15%)	17 (85%)	3 (15%)	17 (85%)	1 (5%)	19 (95%)

#### 4.2 ผลของซิงเกิลนิวคลีโอไทด์ โพลีมอร์ฟิซึมของTNFA ยีน และปัจจัยเสี่ยงอื่นต่อการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน

4.2.1 การเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันทุกระดับความรุนแรง (Acute GVHD all grade) พบแนวโน้มโอกาสเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลันมากขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่อัลลีล -238A (OR=6.77, 95%CI= 0.32- 408.1, P=0.087) และอัลลีล -308A (OR=3.14, 95%CI=0.04-408, P=0.406) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดง Univariate analysis ระหว่าง จีโนไทป์ของ TNFA ยีนรวมถึงปัจจัยเสี่ยงอื่น และ การเกิด Acute GVHD all grade

		Acute GVHD all grade		Odds Ratio (95%CI)	P-value
		Yes (n=15)	No (n=45)		
Gender	Female	9 (25.7%)	26 (74.3%)	1.1 (0.29, 4.42)	0.880
	Male	6 (24%)	19 (76%)	0.91 (0.23, 3.47)	0.880
Age (years) , median (range)		38 (20, 52)	36 (15, 62)	1.01(0.95, 1.06)	0.905
TNF alpha -863	A+(AA,AC)	6 (27.3%)	16 (72.7%)	1.21 (0.3, 4.65)	0.757
	A-(CC)	9 (23.7%)	29 (76.3%)		
TNF alpha -308	A+(AA,AG)	1 (50%)	1 (50%)	3.14(0.04,252)	0.406
	A-(GG)	14 (24.1%)	44 (75.9%)		
TNF alpha -238	A+(AA,AG)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	6.77 (0.32, 408.1)	0.087
	A-(GG)	13 (22.8%)	44 (77.2%)		
CD34 <sup>+</sup> 5-10×10 <sup>6</sup> /kg	yes	13 (26%)	37 (74%)	1.41 (0.23, 15.19)	0.689
	no	2 (20%)	8 (80%)		
CD34 <sup>+</sup> >10×10 <sup>6</sup> /kg	yes	1 (25%)	3 (75%)	1 (0.02, 13.66)	1.000
	no	14 (25%)	42 (75%)		
Female to male	yes	4 (36.4%)	7 (63.6%)	1.97 (0.35, 9.52)	0.336
	no	11 (22.4%)	38 (77.6%)		
Myeloablative	yes	15 (27.3%)	40 (72.7%)	1 (0.45, 1)	0.178
	no	0 (0%)	5 (100%)		
TBI conditioning	yes	12 (30%)	28 (70%)	2.43 (0.54, 15.12)	0.206
	no	3 (15%)	17 (85%)		

4.2.2 การเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันระดับความรุนแรง II-IV (Acute GVHD grade II-IV) พบแนวโน้มโอกาสเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลันมากขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่อัลลีล -238A (OR=2.35, 95%CI= 0.04- 48.52, P=0.491) และอัลลีล -308A (OR=4.8, 95%CI=0.06-384, P=0.239) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดง Univariate analysis ระหว่าง จีโนไทป์ของ TNFA ยีนรวมถึงปัจจัยเสี่ยงอื่น และการเกิด Acute GVHD grade II-IV

		Acute GVHD II-IV		Odds Ratio (95%CI)	P-value
		Yes (n=11)	No (n=49)		
Gender	Female	7 (20%)	28 (80%)	1.31 (0.29, 6.91)	0.693
	Male	4 (16%)	21 (84%)	0.76 (0.14, 3.49)	0.693
Age (years) , median (range)		38 (20, 52 )	36 (15,62)	1.01 (0.94, 1.07)	0.940
TNF alpha -863	A+(AA,AC)	4 (18.2%)	18 (81.8%)	0.98 (0.18, 4.53)	0.982
	A-(CC)	7 (18.4%)	31 (81.6%)		
TNF alpha -308	A+(AA,AG)	1 (50%)	1 (50%)	4.8 (0.06, 384.36)	0.239
	A-(GG)	10 (17.2%)	48 (82.8%)		
TNF alpha -238	A+(AA,AG)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	2.35 (0.04, 48.52)	0.491
	A-(GG)	10 (17.5%)	47 (82.5%)		
CD34 <sup>+</sup> 5-10×10 <sup>6</sup> /kg	yes	10 (20%)	40 (80%)	2.25 (0.25, 108.33)	0.456
	no	1 (10%)	9 (90%)		
CD34 <sup>+</sup> >10×10 <sup>6</sup> /kg	yes	0 (0%)	4 (100%)	0 (0, 4.35)	0.327
	no	11 (19.6%)	45 (80.4%)		
Female to male	yes	3 (27.3%)	8 (72.7%)	1.92 (0.27, 10.49)	0.397
	no	8 (16.3%)	41 (83.7%)		
Myeloablative	yes	11 (20%)	44 (80%)	1 (0.3, 1)	0.269
	no	0 (0%)	5 (100%)		
TBI conditioning	yes	8 (20%)	32 (80%)	1.42 (0.29, 9.32)	0.637
	no	3 (15%)	17 (85%)		

4.2.3 การเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันระดับความรุนแรง III-IV (Acute GVHD grade III-IV) พบแนวโน้มโอกาสเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันเฉียบพลันมากขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่อัลลีล -238A (OR=3.06, 95%CI= 0.05- 63.88, P=0.362) อัลลีล -308A(OR=6.25, 95% CI=0.07-500, P=0.159) และ TBI base conditioning regimen (OR=4.75, 95% CI=0.55-221.64, P=0.125) ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดง Univariate analysis ระหว่าง จีโนไทป์ของ TNFA ยีนรวมถึงปัจจัยเสี่ยงอื่น และการเกิด Acute GVHD gr III-IV

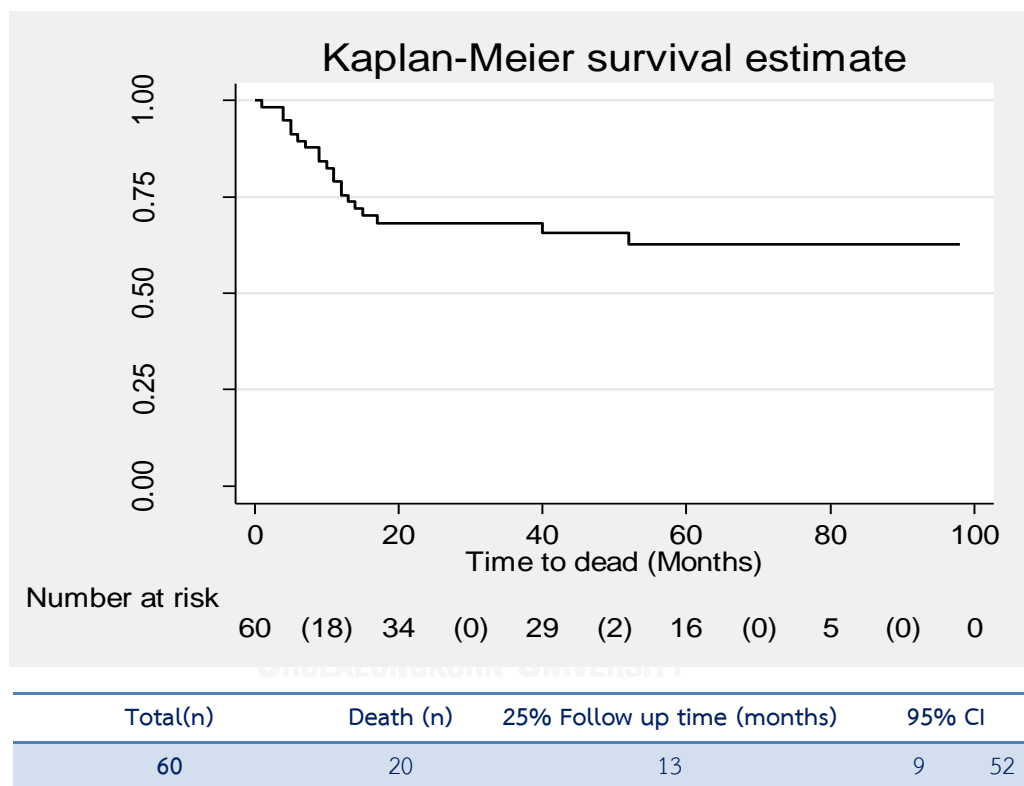
		Acute GVHD grade III-IV		Odds Ratio (95%CI)	P-value
		Yes (n=9)	No (n=51)		
Gender	Female	5 (14.2%)	30 (85.8%)	0.88 (0.17, 4.97)	0.855
	Male	4 (16%)	21 (84%)	1.14 (0.2, 6.02)	0.855
Age (years) , median (range)		38 (20, 47)	36 (15, 62)	1.01 (0.94, 1.07)	0.893
TNF alpha -863	A+(AA,AC)	4 (12.5%)	18 (87.5%)	1.47 (0.26, 7.75)	0.600
	A-(CC)	5 (13.1%)	33 (86.9%)		
TNF alpha -308	A+(AA,AG)	1 (50%)	1 (50%)	6.25 (0.07, 500)	0.159
	A-(GG)	8 (13.8%)	50 (86.2%)		
TNF alpha -238	A+(AA,AG)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	3.06 (0.05, 63.88)	0.362
	A-(GG)	8 (14%)	49 (86%)		
CD34 <sup>+</sup> 5-10×10 <sup>6</sup> /kg	yes	7 (14.2%)	42 (85.8%)	0.75 (0.11, 8.61)	0.744
	no	2 (18.2%)	9 (81.8%)		
CD34 <sup>+</sup> >10×10 <sup>6</sup> /kg	yes	1 (20%)	4 (80%)	1.47 (0.03, 17.56)	0.744
	no	8 (14%)	47 (86%)		
Female to male	yes	2 (18.2%)	9 (81.8%)	1.33 (0.12, 8.75)	0.744
	no	7 (14.3%)	42 (85.7%)		
Myeloablative	yes	9 (16.4%)	46 (83.6%)	1 (0.23, 1)	0.327
	no	0 (.0%)	5 (100%)		
TBI conditioning	yes	8 (88.9%)	32 (62.7%)	4.75 (0.55, 221.64)	0.125
	no	1 (11.1%)	19 (37.3%)		

#### 4.3 อัตราการรอดชีวิตทั้งหมด (overall survival-OS)

ในการศึกษานี้มีผู้ป่วยเสียชีวิตทั้งหมด 20 คนโดยอยู่ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันทุกระดับความรุนแรง 5 คนและในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน 15 คน โดยผู้ป่วย 18 คนเสียชีวิตจากการกลับเป็นซ้ำของโรคที่เป็นสาเหตุของการปลูกถ่าย 1 คนเสียชีวิตจากภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน และ 1 คนจากภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเรื้อรัง โดยในการศึกษานี้ไม่มี median follow up time เนื่องจาก มีผู้ป่วยเสียชีวิต ไม่ถึงร้อยละ 50 จึงเสนอที่ overall 25% follow up time คือที่เวลา 13 เดือนผู้ป่วยจะมีอัตราการรอดชีวิต

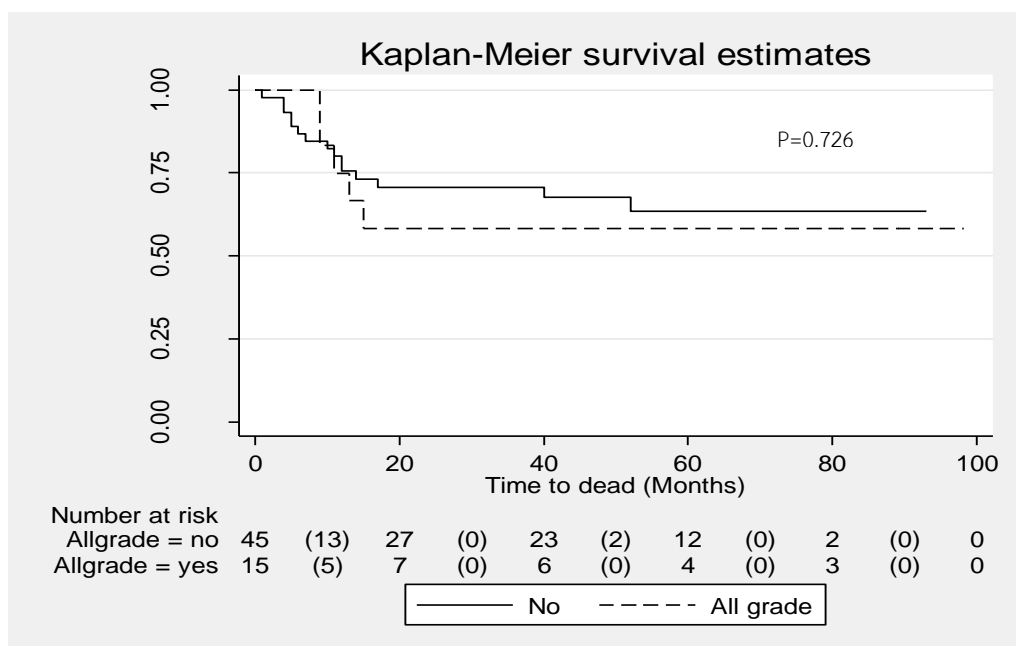
ทั้งหมด (overall survival-OS) ร้อยละ 75 โดยช่วงความเชื่อมั่นอยู่ระหว่าง 9 ถึง 52 เดือน (95%CI, 9-52 months) อัตราการรอดชีวิตทั้งหมด (overall survival-OS) ที่ 2 ปี ที่ร้อยละ 70 ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2 โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการมีชีวิตรอดระหว่างผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันทุกระดับความรุนแรง และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดังกล่าวดังแสดงในแผนภูมิที่ 3

แผนภูมิที่ 2 แสดง Overall survival ในผู้ป่วยทั้ง 60 คน





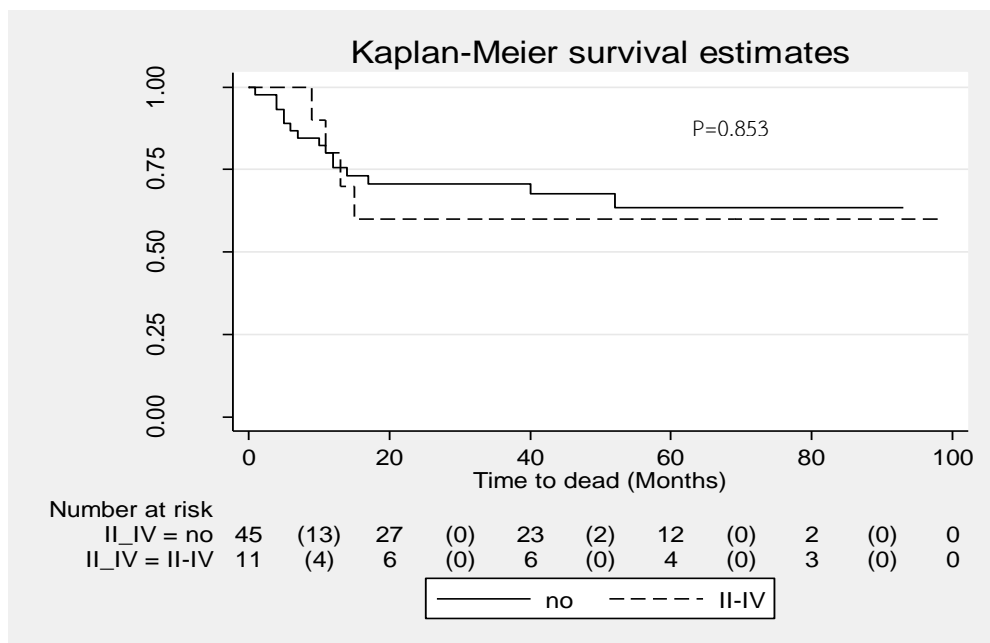
แผนภูมิที่ 3 แสดง Overall survival ระหว่างกลุ่มที่มี acute GVHD และกลุ่มที่ไม่มี acute GVHD



Group	Total (n)	Death (n)	25% Follow up time (months)	95%CI	p-value
No acute GVHD	45	15	14	6    52	0.726
Acute GVHD all grade	15	5	11	9    52	

ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันระดับความรุนแรง 2-4 มีผู้ป่วยเสียชีวิตทั้งหมด 4 รายจาก 11 ราย โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการรอดชีวิตทั้งหมด (overall survival-OS) ระหว่างผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันระดับความรุนแรง 2-4 และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดังกล่าว ดังแสดงในแผนภูมิที่ 4

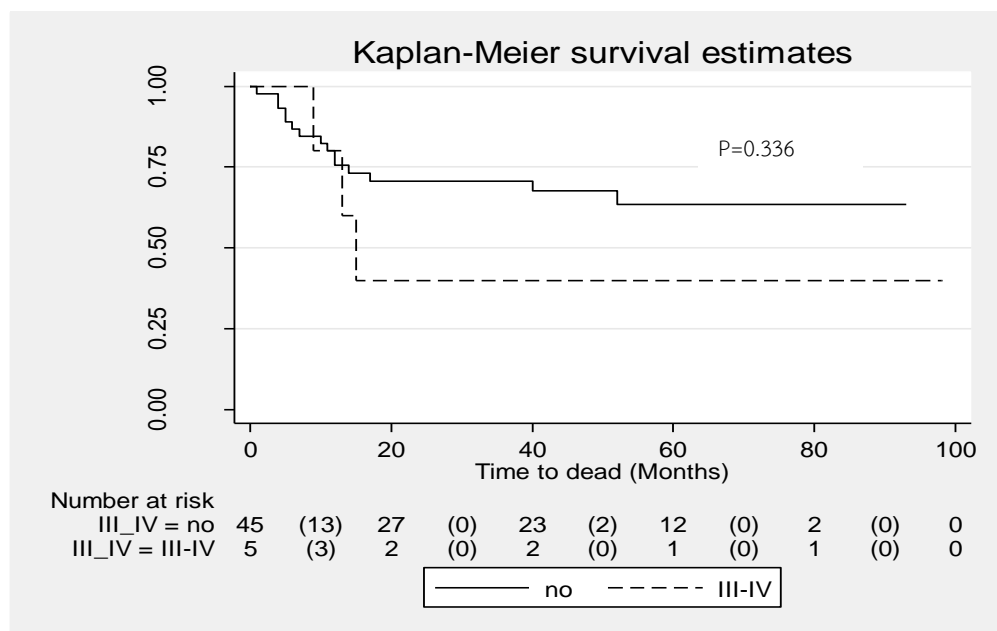
แผนภูมิที่ 4 แสดง Overall survival ระหว่างกลุ่มที่มี acute GVHD gr II-IV และกลุ่มที่ไม่มี acute GVHD



Group	Total (n)	Death (n)	25% Follow up time (months)	95%CI	p-value
No acute GVHD	45	15	14	6	52
Acute GVHD grade II-IV	11	4	13	9	52

ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันระดับความรุนแรง 3-4 มีผู้ป่วยเสียชีวิตทั้งหมด 4 คนจาก 9 คน โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการรอดชีวิตทั้งหมด (overall survival-OS) ระหว่างผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันระดับความรุนแรง 3-4 และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะดังกล่าว ดังกล่าวแสดงในแผนภูมิที่ 5

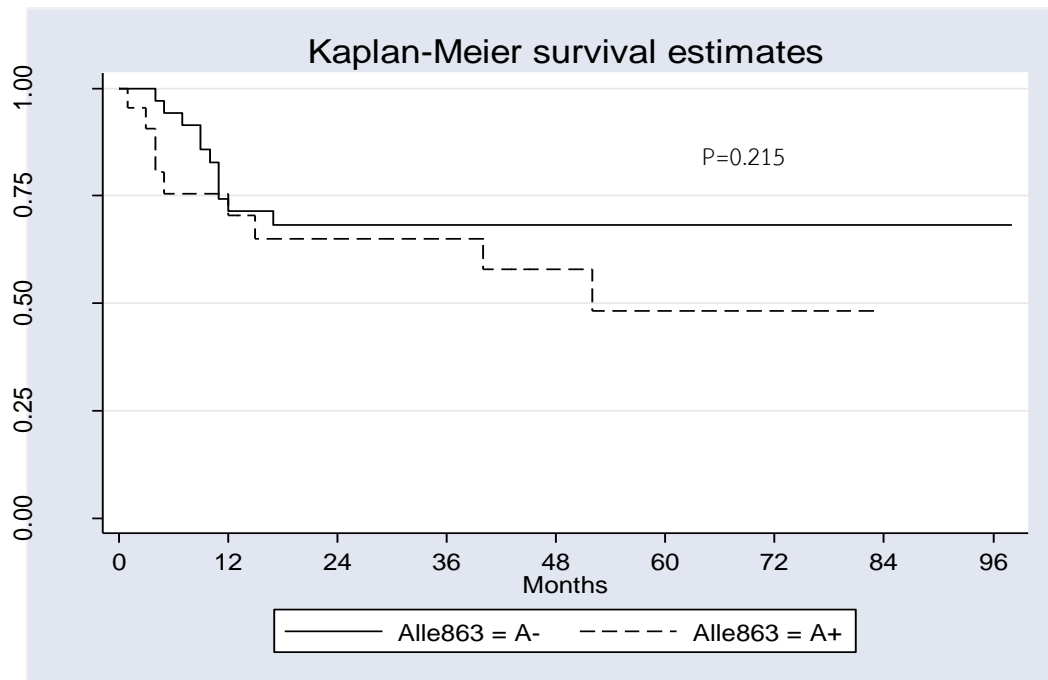
แผนภูมิที่ 5 แสดง Overall survival ระหว่างกลุ่มที่มี acute GVHD gr III-IV และกลุ่มที่ไม่มี acute GVHD



Group	Total (n)	Death (n)	25% Follow up time (months)	95%CI	p-value
No acute GVHD	45	15	14	6    52	0.336
Acute GVHD gr III-IV	5	3	13	9    52	

นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการรอดชีวิตทั้งหมด (overall survival-OS) ระหว่างจีโนไทป์ของแต่ละตำแหน่งทั้ง -863, -308 และ -238 ดังแสดงในแผนภูมิที่ 6, 7, 8 โดยที่ตำแหน่ง -308A<sup>+</sup> (AA,AG) มีผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ดังกล่าว 2 คนและไม่มีผู้เสียชีวิต ตำแหน่ง -863A<sup>+</sup> (AA,AC) มีผู้ป่วยมี จีโนไทป์ดังกล่าว 22 คน และเสียชีวิต 9 คน ส่วนตำแหน่ง -238A<sup>+</sup> (AA ,AG) มีผู้ป่วยมีจีโนไทป์ดังกล่าว 3 คน และไม่มีผู้เสียชีวิต

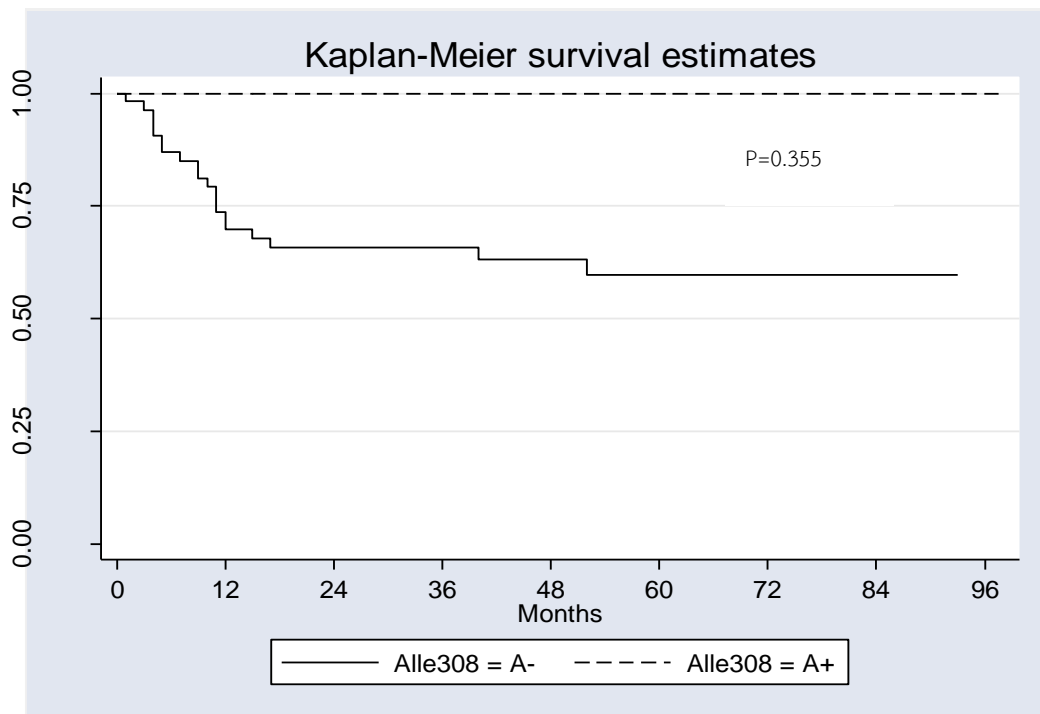
แผนภูมิที่ 6 แสดง Overall survival ระหว่างอัลลีลที่ตำแหน่ง -863



หมายเหตุ A+ (AA,AC) , A- (CC)

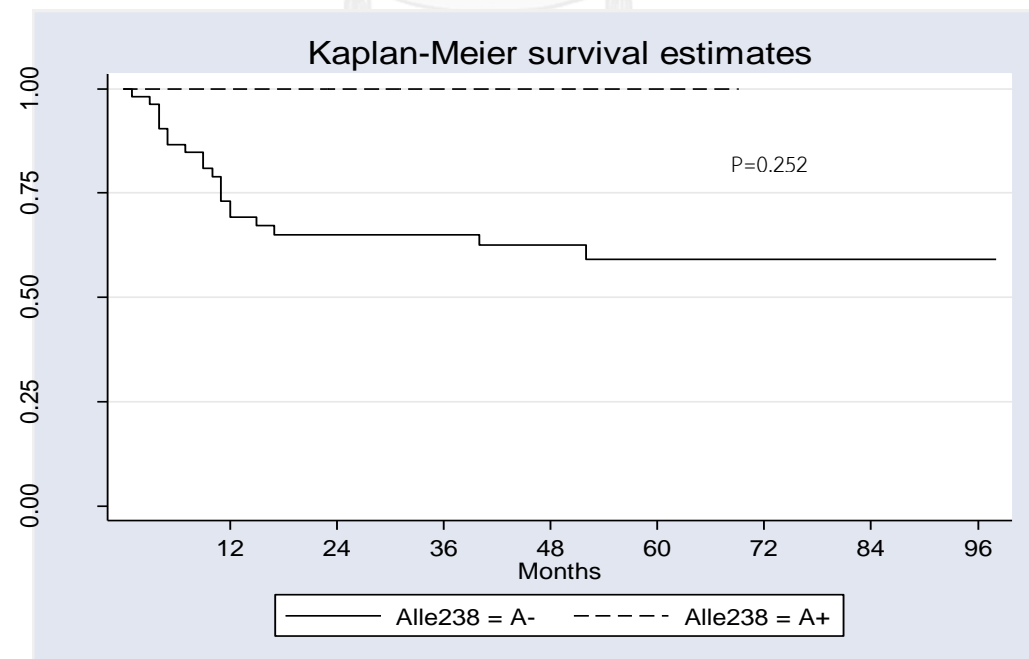


แผนภูมิที่ 7 แสดง Overall survival ระหว่างอัลลีลที่ตำแหน่ง -308



หมายเหตุ A+ (AA,AG) , A- (GG)

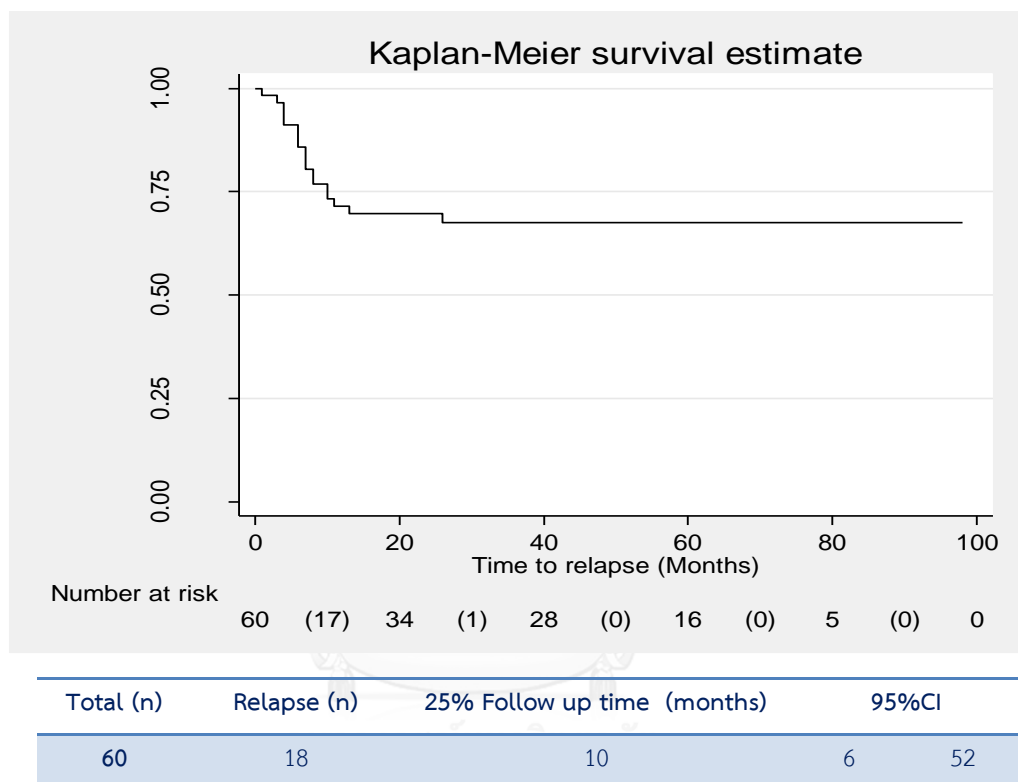
แผนภูมิที่ 8 แสดง overall survival ระหว่างอัลลีลที่ตำแหน่ง -238



หมายเหตุ A+ (AA,AG) , A- (GG)

ระยะเวลาการกลับมาเป็นโรครื้อซ้ำ (Relapse) จากคนไข้ 60 ราย พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไป 10 เดือน ผู้ป่วยจะมีโอกาสรอดจากการเป็นโรครื้อซ้ำ (Relapse free survival) ร้อยละ 75 โดยช่วงความเชื่อมั่นอยู่ระหว่าง 6 ถึง 52 เดือน (95%CI, 6-52 months) ดังแสดงในแผนภูมิที่ 9

แผนภูมิที่ 9 แสดง Relapse free survival



## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 อภิปรายผลการวิจัย

จากรายงานอุบัติการณ์การเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตในช่วงแรกหลังการปลูกถ่ายนอกจากนี้ยังพบว่า ร้อยละ 50 ของผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันจะมีอาการของภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเรื้อรังซึ่งส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของคนไข้ โดยภาวะนี้สามารถพบได้ร้อยละ 25-50<sup>(1,5,6)</sup> ในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตจากผู้บริจาคพี่น้องที่มีเฮชแอลเอ แอนติเจนตรงกันแสดงถึงยังมีปัจจัยอื่นในการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันนอกเหนือจากการมีเฮลแอลเอ แอนติเจนไม่ตรงกัน<sup>(24)</sup> ดังนั้นการหาปัจจัยดังกล่าวจะช่วยให้สามารถระบุผู้ป่วยที่เสี่ยงในการเกิดภาวะแทรกซ้อนดังกล่าวเพื่อให้การป้องกันภาวะดังกล่าวได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากการศึกษาถึงผลของไซโตไคน์ในพยาธิวิทยาของการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน ทำให้มีการศึกษาผลของไซโตไคน์ ยีน โพลีมอร์ฟิซึม โดยเฉพาะทูเมอร์ เนโครซิส แฟคเตอร์ แอลฟา (TNFA) โดยมีการศึกษาทั้งในการปลูกถ่ายอวัยวะ (Solid organ transplantation) ทั้งการปลูกถ่ายหัวใจ และการปลูกถ่ายไต โดยในการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตก็มีหลายการศึกษาถึงผลของ SNPs ของ TNFA ยีนในผลของการปลูกถ่าย ไม่ว่าจะเป็นการเกิดเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน และอัตราการรอดชีวิต การศึกษาจึงศึกษา SNPs ของ TNFA ยีน ที่ตำแหน่ง -308, -238, -863 ซึ่งการศึกษาถึงความสัมพันธ์กับระดับ TNFA ที่เพิ่มขึ้น<sup>(6,12,33)</sup> และความสัมพันธ์กับการเกิดเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน โดยมีการศึกษาอย่างแพร่หลายและมีทั้งผลการศึกษาที่สนับสนุนและคัดค้านความสัมพันธ์ดังกล่าว<sup>(4,6,7,8,10,12,14,17,18,20,24,33,34)</sup>

ในการศึกษานี้พบความถี่ของอัลลีล ณ ตำแหน่ง -238 (A 5%, C 95%), -308 (A 3.3%, G 96.7%), -863 (A 36.7%, C 63.3%) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานความถี่ในประชากรไทยจากการศึกษาความถี่อัลลีลของ 3 ตำแหน่งดังกล่าวก่อนหน้านี้<sup>(21,34)</sup> นี้อาจมีความคลาดเคลื่อนซึ่งอาจเกิดจากขนาดประชากรตัวอย่างในการศึกษานี้มีขนาดเล็กและเป็นผลตรวจอัลลีลในผู้ป่วยซึ่งต่างจากรายงานก่อนหน้านี้ซึ่งเป็นรายงานความถี่ในประชากรปกติ นอกจากนี้การที่ ยีนที่ควบคุมการสร้าง TNFA อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 บริเวณ Class III ของ MHC complex ซึ่งอยู่ตรงกลางระหว่าง Class I และ

Class II ทำให้การปลูกถ่ายจากพี่น้องที่มี เอชแอลเอ ตรงกันมักจะมี ยีนของ TNFA ตรงกันด้วยการศึกษานี้จึงทำการตรวจ TNFA ยีนเฉพาะในผู้ป่วย<sup>(18,24)</sup>

ในการศึกษานี้พบแนวโน้มเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันของ อัลลีล -238A แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางโดยก่อนหน้ามีทั้งรายงานที่สนับสนุนและคัดค้านความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันซึ่งอาจเกิดจากจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมในการศึกษา และความแตกต่างเชื้อชาติ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบแนวโน้มเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันระดับความรุนแรง 3-4 กับการได้รับการฉายสียทั่วร่างกายในการระบวนการปลูกถ่าย (TBI conditioning regimens) แม้จะไม่มีนัยทางสถิติแต่มีการศึกษาถึงผลของ TBI พบว่าแม้ขั้นตอนนี้จะทำลาย mononuclear cell ในร่างกายแต่ยังมีผลทำให้ระดับสาร TNFA ในเลือดสูงโดยสาร TNFA จะมีการหลั่งมาจาก เซลล์ endothelial cell และ keratinocyte ซึ่งการศึกษา<sup>(35)</sup> นี้ยังพบว่ามีอุบัติการณ์ของภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันเพิ่มขึ้นและการกลับเป็นซ้ำที่ลดลง

อัตราการมีชีวิตรอดทั้งหมดที่ 5 ปี ในการศึกษานี้คือ ร้อยละ 60 ใกล้เคียงกับข้อมูลอัตราการมีชีวิตรอดทั้งหมดของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตแบบใช้เซลล์ผู้บริจาคของหน่วยถ่ายปลูกเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้ตามเกณฑ์ที่มีรายงานของ Center for International Blood and Marrow Transplant Research และไม่พบความแตกต่างในอัตราการมีชีวิตรอดทั้งหมดระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันและกลุ่มที่ไม่มีภาวะดังกล่าว อย่างไรก็ตาม พบแนวโน้มของการเป็นปัจจัยในการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตทั้งหมดของอัลลีล -238A<sup>+</sup> (AA,AG) และอัลลีล -308A<sup>+</sup> (AA,AG) เนื่องจากไม่พบผู้เสียชีวิตในผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ดังกล่าว แต่อาจมีข้อจำกัดด้วยจำนวนผู้ป่วยที่น้อยและปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตทั้งหมดคือ ปัจจัยจากตัวโรคเองซึ่งการศึกษาได้รวมผู้ป่วยมะเร็งทางโลหิตวิทยาที่มีการพยากรณ์โรคหลากหลายไว้ด้วยกัน นอกจากนี้การที่การศึกษานี้มีผลการศึกษาที่ต่างจากการศึกษาอื่นแสดงให้เห็นว่าอาจมีปัจจัยอื่น หรือ ผลรวมของปัจจัยอื่นที่มีผลต่อผลลัพธ์ของการศึกษาไม่ว่าจะเป็นขนาดตัวอย่าง, study power, heterogeneity ของประชากร (อายุ, เชื้อชาติ, โรค และสถานะของโรค), transplant characteristics (ระดับความตรงกันของเอชแอลเอแอนติเจน, แหล่งของ stem cell, intensity of conditioning regimen)



## 5.2 ข้อจำกัดสำหรับโครงการวิจัยนี้ ได้แก่

อคติในงานวิจัย (Bias in research) เนื่องจากการศึกษานี้เป็น retrospective case control study จึงอาจมีอคติในงานวิจัยเกิดขึ้นได้ดังนี้

Sampling Bias เนื่องจากในกลุ่มผู้ป่วยในการศึกษานี้เป็นผู้ป่วยที่มารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เท่านั้น นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่เราต้องการศึกษา (Case) คือผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันนั้นอาจไม่ใช่ตัวแทนของประชากรที่เราต้องการศึกษาเนื่องจาก เป็นการศึกษาย้อนหลังโดยการรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลัน โดยผู้ป่วยกลุ่มนี้ต้องมีข้อมูลการวินิจฉัย ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการบันทึกในเวชระเบียน และระบบคอมพิวเตอร์ของโรงพยาบาลครบ นอกจากนี้ยังต้องมีเลือดตัวอย่างเก็บไว้ในปริมาณมากพอและมีคุณภาพสามารถตรวจและแปรผลตรวจทางห้องปฏิบัติการได้ ทำให้ผู้ป่วยที่อาจจะมีภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันที่อาจไม่ได้รับการวินิจฉัย หรือมีข้อมูลบันทึกไม่ครบถ้วนถึงในรายที่มีตัวอย่างเลือดเก็บรักษาไว้ไม่เพียงพอหรือไม่สามารถแปรผลตรวจทางห้องปฏิบัติการได้ ทำให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้ไม่สามารถเข้าร่วมการศึกษาได้

## 5.3 สรุปผลการศึกษา

มีแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างชนิด ซิงเกิลนิวคลีโอไทด์ โพลีมอร์ฟิซึม (SNPs) ของทูเมอร์เนโครซิสแฟคเตอร์แอลฟา (TNFA) ยีนที่ตำแหน่ง -238A และการเกิดภาวะเนื้อเยื่อต่อต้านกันชนิดเฉียบพลันในผู้ป่วยไทยและมีแนวโน้มความสัมพันธ์ในการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตทั้งหมดของตำแหน่ง -238A และ -308A

อย่างไรก็ตามแนวทางการศึกษาในอนาคต ควรมีการศึกษาถึงผลของไซโตไคน์ชนิดอื่นรวมทั้งประชากรตัวอย่างในการศึกษาที่มากกว่านี้ และอาจมีการศึกษาไปข้างหน้าเพื่อลดอคติงานวิจัยรวมถึงควรมีการศึกษาเพิ่มในการทำปฏิกายโดยใช้เซลล์จากผู้บริจาคที่ไม่ใช่พี่น้อง

## รายการอ้างอิง

1. Mickelson, E. M., E. Petersdorf. HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol.* 2000June;61(2):92-100.
2. Gratwohl, A., R. Brand, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36(9):757-769.
3. Turner, D.M, Grant S.C, et al. A genetic marker of high TNF alpha production in heart transplant recipients. *Transplantation.* 1995;1113-1117.
4. Cavet, J., P. G. Middleton. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood.* 1999;94(11): 3941-3946.
5. Socie, G., P. Loiseau, et al. Both genetic and clinical factors predict the development of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation.* 2001;72(4): 699-706.
6. Mullighan, C., S. Heatley, et al. Non-HLA immunogenetic polymorphisms and the risk of complications after allogeneic hemopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2004; 77(4): 587-596.
7. Ishikawa, Y., K. Kashiwase, et al. Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002;29(7): 569-575.
8. Kim, D. H., N. Y. Lee, et al. IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Transplantation .* 2005 ;79(11): 1615-1622.

9. Rocha, V., R. F. Franco, et al. Host defense and inflammatory gene polymorphisms are associated with outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 2002;100(12): 3908-3918.
10. Bertinetto F. E., et al . Role of non-HLA genetic polymorphisms in graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Immunogenetics*. 2006;(33) 375-384.
11. John E. Levine. Implications of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis and management of GVHD. *Int J Hematol*. 2011 May ; 93(5): 571–577.
12. Takahashi H, et al .Contribution of TNF-a and IL-10 gene polymorphisms to graft-versus-host disease following allo-hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* . 2000; 26, 1317–1323.
13. John A Hansen, et al. Defining Genetic Risk for GVHD and Mortality Following Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2010 November; 17(6): 483–492
14. Anne M. Dickinson, et al. Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow Transplants. *British Journal of Haematology*. 2002;127, 479–490.
15. Ting C, et al. Genomic studies of GVHD---lessons learned thus far. *Bone Marrow Transplantation* .2013; 48, 4—9.
16. Anne M. Dickinson, et al. Haematopoietic stem cell transplantation: can our genes predict clinical outcome. *Expert Review*.2007;1-192.
17. Haowen Xiao, et al. Immunosuppressive Cytokine Gene Polymorphisms and Outcome after Related and Unrelated Hematopoietic Cell Transplantation in a Chinese Population. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17:542-549,.
18. Anne M. Dickinson, et al. Impact of genomic risk factors on outcome after hematopoietic stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010; 95(6)

19. Berger M et al. Monitoring of TNFR1, IL-2Ra, HGF, CCL8, IL-8 and IL-12p70 following HSCT and their role as GVHD biomarkers in paediatric patients. Bone Marrow Transplantation. 2013; 1–7.
20. Goyal R K ,Yan Lin et al.Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphisms Are Associated with Severity of Acute Graft-Versus-Host Disease Following Matched Unrelated Donor Bone Transplantation in Children: A Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium Study. Blood Marrow Transplant. 2010; 16:927-936, 2010.
21. Hirankarn N, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn J. Genetic susceptibility to SLE is associated with TNF- $\alpha$  gene polymorphism -863, but not -308 and -238, in Thai population. International journal of immunogenetics. 2007 Dec;34(6):425-30
22. Sung AD, Chao NJ et . Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment. Stem cells translational medicine. 2013 Jan;2(1):25-32
23. Ziemer M, Haeusermann P, Janin A, Massi D, Ziepert M, Wolff D.Histopathological diagnosis of graft-versus-host disease of the skin: an interobserver comparison. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2014 Jul;28(7):915-24.
24. Petersdorf EW et al. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. Blood. 2013 Sep 12;122(11):1863-72.
25. Thomas ED, Storb R, Clift RA et al. Bone marrow transplantation.New Engl J Med. 1975; 292: 895–902.
26. Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow fromHL-A-matched sibling donors. Transplantation.1974;18:295–304.
27. Espana EM, Shah S, Santhiago MR, Singh AD. Graft versus host disease: clinical evaluation, diagnosis and management. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology . Ophthalmologie. 2013 May;251(5):1257-66.

28. Jaglowski SM, Devine SM. Graft-versus-host disease: why have we not made more progress?. *Current opinion in hematology*. 2014 Mar;21(2):141-7.
29. Dhir S, Slatter M, Skinner R. Recent advances in the management of graft-versus-host disease. *Archives of disease in childhood*. 2014 Dec;99(12):1150-7
30. Sodsai P, Nakkuntod J, Kupatawintu P, Hirankarn N. Distribution of cytokine gene polymorphisms in Thai population. *Tissue antigens*. 2011 Jun;77(6):593-7.
31. Veeraputhiran M, Mangan K. Sudden loss of the GVL effect following use of the TNF inhibitor infliximab in a chronic myelogenous leukemia patient with chronic GVHD. *Bone marrow transplantation*. 2010 Jun;45(6):1113-4.
32. Pidala J, Sarwal M, Roedder S, Lee SJ. Biologic markers of chronic GVHD. *Bone marrow transplantation*. 2014 Mar;49(3):324-31
33. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumornecrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997; 34: 391–399.
34. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL et al. Effect of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* .1997; 94:3195–3199.
35. Antin JH, Ferrara LM. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1992; 80: 2964–2968.
36. Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, et al. How to use an article about genetic association, A: background concepts. *JAMA*. 2009;301:74-81



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นายอรรคพล พูลเจริญ

วันเดือนปีเกิด 29 มีนาคม พ.ศ. 2524 จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2543 - 2548 แพทยศาสตร์ศึกษามหาวิทยาลัยนเรศวร

พ.ศ. 2550 - 2552 วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์โลหิตวิทยา

พ.ศ. 2556 - ปัจจุบัน กำลังฝึกอบรมหลักสูตรแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขา  
อายุรศาสตร์การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดโลหิตและ  
ไขกระดูก ที่หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาและประกาศนียบัตร

พ.ศ. 2546 แพทยศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร

พ.ศ. 2553 วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์โลหิตวิทยา



