

การเปลี่ยนแปลงระดับแอนติเจนซินทูในซีรัมผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังก่อนและหลังรักษาหายด้วย
ยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง



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 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Changing of Serum Angiotensin II Level in Chronic Hepatitis C Patients Who Achieved
Sustained Virologic Response after Direct-acting Antiviral Agent Therapy



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 2017

Copyright of Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การเปลี่ยนแปลงระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัมผู้ป่วยไวรัส
ตับอักเสบซีเรื้อรังก่อนและหลังรักษาหายด้วยยาต้านเชื้อ
ไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง

โดย

นางสาวณิชา ธีราทร

สาขาวิชา

อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง มนาธิป โอศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ กำพล สุวรรณพิมลกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วัฒนา สุชีพศาลเจริญ)

ฉินา อีราทร : การเปลี่ยนแปลงระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัมผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ก่อนและหลังรักษาด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง (Changing of Serum Angiotensin II Level in Chronic Hepatitis C Patients Who Achieved Sustained Virologic Response after Direct-acting Antiviral Agent Therapy) อ.ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. นพ. ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์, หน้า.

บทนำ: ในสัตว์ทดลอง แองจิโอเทนซินทูทำให้เกิดพังผืดในตับผ่านระบบเรนิน-แองจิโอเทนซิน-แองจิโอเทนซินทู ต่อมาเกิดการค้นพบระบบแองจิโอเทนซินทู-แองจิโอเทนซิน-(1-7)-ตัวรับแมสซึ่งมีผลให้พังผืดในตับลดน้อยลง การรักษาไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังหายขาดส่งผลลดพังผืดในตับโดยมีหลักฐานทั้งทางพยาธิวิทยาและรังสีวิทยา นอกจากนี้ การตรวจไซโตไคน์จากเลือดสามารถแสดงการลดลงของสารที่ทำให้เกิดพังผืดและการเพิ่มขึ้นของสารที่สลายพังผืดในตับได้เช่นกัน

วัตถุประสงค์: ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับแองจิโอเทนซินทูหลังจากรักษาไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังหายขาดด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง

ระเบียบวิธีการวิจัย: การศึกษาเชิงวิเคราะห์แบบไปข้างหน้าในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2561 โดยคัดผู้ป่วยที่มีปัจจัยกระทบต่อระบบแองจิโอเทนซินทูออก เก็บข้อมูลผู้ป่วยและตัวอย่างเลือดก่อนและหลังจากหยุดการรักษาสัปดาห์ที่ 12 ตรวจระดับแองจิโอเทนซินทูด้วยวิธีอีเอ็มไอเอ็มถึงคิมูโนซอร์เบนท์เอสเสย์ และวัดความยืดหยุ่นของตับก่อนรักษาและหลังรักษา 48 สัปดาห์

ผลการศึกษา: ผู้ป่วย 40 คน อายุเฉลี่ย 57 ± 10.4 ปี เป็นผู้ชายร้อยละ 52 ค่ามัธยฐานความยืดหยุ่นของตับลดลงจาก 14.3 kPa เป็น 8.6 kPa ที่สัปดาห์ที่ 48 ค่ามัธยฐานของระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัม ก่อนรักษาเท่ากับ 149.0 ng/mL (พิสัยระหว่างควอไทล์ 115.4 pg/mL) เพิ่มขึ้นเป็น 286.88 pg/mL (พิสัยระหว่างควอไทล์ 191.1 pg/mL) หลังจากหยุดรักษาสัปดาห์ที่ 12 ($p < 0.001$)

สรุป: หลังจากรักษาไวรัสตับอักเสบบีหายขาดด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง ค่าความยืดหยุ่นของตับลดลงและแองจิโอเทนซินทูในซีรัมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2560

5974064630 : MAJOR MEDICINE

KEYWORDS: ANGIOTENSIN II / DIRECT-ACTING ANTIVIRAL / HEPATITIS C / FIBROGENESIS

NICHA TEERATORN: Changing of Serum Angiotensin II Level in Chronic Hepatitis C Patients Who Achieved Sustained Virologic Response after Direct-acting Antiviral Agent Therapy. ADVISOR: ASST. PROF. PIYAWAT KOMOLMIT, Ph.D., pp.

Introduction: Animal models revealed systemic angiotensin II (Ang II) augmented hepatic fibrosis via renin-angiotensin system, but Ang II/angiotensin (1-7)/Mas receptor axis resulting in hepatic fibrolysis. Eradication of hepatitis C (HCV) results in regression of hepatic fibrosis demonstrated by histology, imaging modalities, and serum cytokines. We hypothesize that Ang II might involve in a molecular pathway influencing hepatic fibrosis improvement after HCV eradication.

Methods: Chronic hepatitis C (CHC) patients with compensated liver disease were prospectively enrolled for direct-acting antiviral agents (DAA) between July 2016 and September 2017. Baseline characteristics, HCV viral load, HCV genotypes, liver enzymes and liver stiffness measurement (LSM) were assessed before treatment. Blood samples were collected at baseline and 24 weeks (SVR12) then evaluated for Ang II levels using enzyme-linked immunosorbent assay. LSM were repeated at 48 weeks.

Results: Forty patients were eligible for analysis. Mean±SD of age was 57±10.4 years and 52% were male. Median LSM were significantly decreased from 14.3 kPa at baseline to 8.6 kPa at 48 weeks. As compared to the baseline level, at SVR12, Ang II level was significantly increased from 149.0 (interquartile range or IQR 115.4) to 286.9 (IQR 191.1) pg/mL ($p<0.001$).

Discussion: After curative treatment of CHC by DAA, the improvement of LSM and increase in serum Ang II were demonstrated.

Department: Medicine

Student's Signature

Field of Study: Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเนื่องจากการสนับสนุนเป็นอย่างดีจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ดอกเตอร์นายแพทย์ปิยะวัฒน์ โกมลมิตร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์แพทย์หญิงเกศรินทร์ ถานะภิรมย์ ที่เสียสละเวลาในการให้คำแนะนำอย่างดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยทุกท่านที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่ามาเข้าร่วมงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ นางสาวสิรินพร สุขสวัสดิ์อำนาจ นางพนารัตน์ ไทยใหม่ นางสุกัญญา สิทธิสมวงศ์ นางนันทิยา ศรีสุนทร นางสาวพิมพ์ชนา รังษีธนชัยฤทธิ นางสาวนวกชมณ มุ่งนำตระกูล นางสาวกนกวรรณ สอนศิริ ที่ช่วยเหลือการทำวิจัย

ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่กล่าวมา ตลอดจนผู้ที่ไม่ได้กล่าวนามซึ่งมีส่วนให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ กราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดมา



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	1
สารบัญตาราง.....	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	3
บทที่ 1 บทนำ	5
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	5
1.2 คำถามของการวิจัย	6
1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	6
1.4 สมมติฐาน	6
1.5 ข้อยกเว้นเบื้องต้น	6
1.6 กรอบความคิดแนววิจัย	7
1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่จะใช้ในการวิจัย	8
1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	8
1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัยและมาตรฐานแก้ไข.....	8
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
3.1 รูปแบบการวิจัย	17
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย.....	17
3.2.1 ประชากร.....	17

3.2.2 สถานที่	18
3.2.3 เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง	18
3.2.4 ขนาดตัวอย่าง	18
3.2.5 การสังเกตและการวัด	19
3.2.6 ขั้นตอนการทำวิจัย	25
3.3 การรวบรวมข้อมูล	25
3.4 ข้อจำกัดในการวิจัย	26
3.5 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม	26
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	27
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	28
4.1 ผู้เข้าร่วมการศึกษา	28
4.2 ผลการวิเคราะห์การอักเสบและความยืดหยุ่นของตับ	28
4.3 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของแองจิโอเทนซินทูในซีรัม	32
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	35
5.1 อภิปรายผล	35
5.2 สรุปผลการศึกษา	36
5.3 เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าที่เคยศึกษา	37
5.4 ข้อดีของการศึกษานี้	37
5.5 ข้อด้อยของการศึกษานี้	37
5.6 ข้อเสนอแนะ	37
.....	39
รายการอ้างอิง	39
ภาคผนวก	43

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 51



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 กรอบความคิดแนววิจัย.....	7
ภาพที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน	20
ภาพที่ 3 การปั่นสารก่อนใช้ ด้วยเครื่องกวนสารละลาย (stirrer).....	21
ภาพที่ 4 ชุดทดสอบชนิด 96 ช่อง	22
ภาพที่ 5 Incubate ชุดทดสอบ.....	23
ภาพที่ 6 สีของสารหลังผสมสารตั้งต้น	24
ภาพที่ 7 สีของสารหลังผสมสารละลายสำหรับหาค่าปฏิกิริยา.....	24
ภาพที่ 8 ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือด แบ่งภาวะตับแข็งของผู้ป่วยและสายพันธุ์ของไวรัส.....	25
ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงระดับอะลานีน ทรานส์อะมิเนสก่อนรักษาและหลังรักษาสัปดาห์ที่ 24....	30
ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงความยืดหยุ่นของตับก่อนรักษาและหลังรักษาสัปดาห์ที่ 48.....	31
ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวทำละลายมาตรฐาน	33
ภาพที่ 12 แผนภาพกล่องแสดงระดับของแองจิโอเทนซินทูในซีรัมก่อนรักษาและหลังรักษา สัปดาห์ที่ 24.....	34
ภาพที่ 13 แสดงบทบาทของแองจิโอเทนซินทูในมนุษย์.....	36

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แนวทางการรักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง ในผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะตับแข็ง	14
ตารางที่ 2 แนวทางการรักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง ในผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็ง	15
ตารางที่ 3 รายละเอียดพื้นฐานของผู้ป่วยก่อนการรักษา.....	29



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Alpha-SMA	Alpha smooth muscle actin
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
Ang II	Angiotensin II
Ang-(1-7)	Angiotensin-(1-7)
AT1R	Angiotensin II receptor type 1
BAMBI	Bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor
CHC	Chronic hepatitis C
CTP	Child-Turcotte-Pugh score
DAA	Direct-acting antiviral agent
eGFR	estimated glomerular filtration rate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ET-1	Endothelin 1
HCV	Hepatitis C virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK/STAT	Janus-activated kinase/Signal transducers and activators of transcription pathway
kPa	Kilopascals

LSM	Liver stiffness measurement
MCP-1	Monocyte chemotactic protein type 1
MELD	Model for end-stage liver disease
MMP	Matrix metalloproteinases
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
PDGF	Platelet-derived growth factor
Peg-IFN	Pegylated interferon
PRRs	Pattern recognition receptors
RAS	Renin-angiotensin system
SVR	Sustained virologic response
TGF β	Transforming growth factor beta
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase type 1
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัญหาที่พบบ่อยและสำคัญ ปัจจุบันมีผู้ป่วยมากกว่า 185 ล้านคนทั่วโลก ผู้ป่วยร้อยละ 80-85 เกิดการติดเชื้อเรื้อรัง¹ ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น ตับแข็ง ภาวะความดันสูงในระบบหลอดเลือดดำของตับ และการเกิดมะเร็งตับตามมาได้² ข้อมูล พ.ศ. 2553 พบว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากภาวะตับแข็งและมะเร็งตับจากไวรัสตับอักเสบบี 287,400 ราย และ 195,700 รายตามลำดับ³ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความชุกของโรคปานกลางคือร้อยละ 1.7-2.3⁴ สำหรับประเทศไทยมีความชุกสูงสุดร้อยละ 2.72 ในประชากรอายุ 41-50 ปี⁵

การรักษามาตรฐานในปัจจุบัน สามารถทำให้ไวรัสตับอักเสบบีหายขาด คือตรวจไม่พบไวรัสในเลือดที่สัปดาห์ที่ 12 หลังหยุดการรักษา (sustained virologic response, SVR) ซึ่งส่งผลต่อการอักเสบของตับ ฟังผืดในตับ ภาวะความดันสูงในระบบหลอดเลือดดำของตับ มะเร็งตับ การเสียชีวิตที่เกี่ยวข้องกับโรคตับ การปลูกถ่ายตับ อาการอื่น และการเสียชีวิตจากสาเหตุอื่นที่เกี่ยวข้องกับไวรัสตับอักเสบบี⁶ การรักษาด้วยเพกกีเลต อินเตอร์เฟียร์อน (pegylated interferon, Peg-IFN) เป็นหลัก สามารถเข้าสู่ SVR ได้ร้อยละ 36 - 82 ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของไวรัส (genotype) และการรักษาด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงหรือดีเอเอ (direct-acting antiviral agent, DAA) เป็นหลัก ทำให้ผู้ป่วยเข้าสู่ SVR ได้มากกว่าร้อยละ 85 - 90 ในทุกสายพันธุ์

การศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าแองจิโอเทนซินทู (angiotensin II, Ang II) เป็นไซโตไคน์ (cytokine) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดในตับ โดยการฉีด Ang II ให้หนูที่มีพยาธิสภาพที่ตับ พบว่าตับของหนูมีพังผืดมากขึ้น⁷ และการยับยั้งตัวรับแองจิโอเทนซินทูชนิดที่หนึ่ง (angiotensin II receptor type 1, AT1R) สามารถยับยั้งการเกิดพังผืดในตับของหนูได้⁸ การศึกษาในมนุษย์พบว่าในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีมีการทำงานของแองจิโอเทนซิน คอนเวิร์ตติง เอนไซม์ (angiotensin converting enzyme, ACE) เพิ่มขึ้น และเมื่อได้รับการรักษาด้วย Peg-IFN ร่วมกับไรบาวิริน (ribavirin) ทำให้การทำงานของ ACE ลดลง⁹

ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับ Ang II ในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นไวรัสตับอักเสบบีและได้รับการรักษาด้วย DAA การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อพิสูจน์ว่าระดับ Ang II มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากรักษาผู้ป่วยให้หายจากไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วย DAA หรือไม่ ซึ่งจะช่วยสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า ภาวะการเกิดพังผืดในตับนั้นลดลงเมื่อหายจากโรค โดยผลที่เกิดขึ้นนั้น ไม่ได้เป็นผลจากการได้รับอินเตอร์เฟียร์อน

1.2 คำถามของการวิจัย

หลังจากรักษาไวรัสตับอักเสบบีด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง ผู้ป่วยมีระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัมเปลี่ยนแปลงหรือไม่ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการรักษา

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อพิสูจน์ว่าแองจิโอเทนซินทูซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการเกิดพังผืดในตับเปลี่ยนแปลงหลังจากรักษาไวรัสตับอักเสบบี

1.4 สมมติฐาน

ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่รักษาหายด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงมีระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัมเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการรักษา

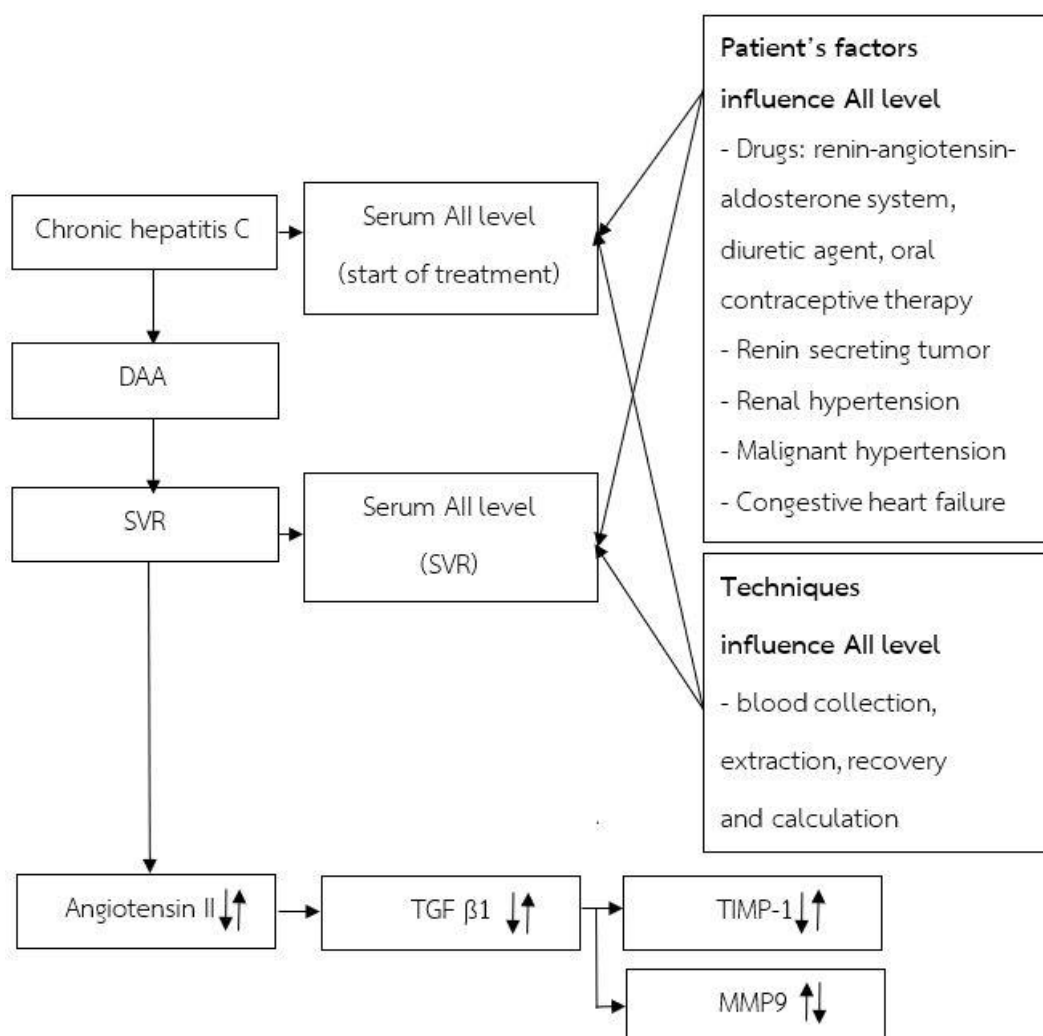
1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี



1.6 กรอบความคิดแนววิจัย

ภาพที่ 1 กรอบความคิดแนววิจัย



1.7 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่จะใช้ในการวิจัย

ไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรัง หมายถึงผู้ป่วยที่ตรวจพบภูมิต่อไวรัสตับอักเสบซี (anti HCV) และ ปริมาณไวรัสซีในเลือด (HCV RNA)

ไวรัสตับอักเสบซีหาย (sustained virologic response, SVR) หมายถึงตรวจไม่พบไวรัสใน เลือด (quantitative method, detection level of 15 IU/ml) ที่สัปดาห์ที่ 12 หลังหยุดการรักษา

การรักษาด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง (direct-acting antiviral therapy) หมายถึงการรักษาด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง 2 ชนิด อาจให้ไรบาวิริน (ribavirin) ร่วมด้วย แต่ไม่มีการให้เพกกีเลต อินเตอร์เฟียรอน (pegylated interferon, Peg-IFN)

ภาวะตับแข็ง วินิจฉัยจากการตรวจภาพรังสีวินิจฉัยของตับมีลักษณะบ่งชี้ภาวะตับแข็ง หรือ การตรวจชิ้นเนื้อตับ ประเมินลักษณะทางพยาธิวิทยาพบพังผืดในเนื้อตับตามระบบ METAVIR¹⁰ เท่ากับ 4 หรือตรวจวัดความยืดหยุ่นของเนื้อตับด้วย transient elastography ได้ค่ามากกว่าหรือ เท่ากับ 13 kilopascals

อัตราการกรองของไต (estimated glomerular filtration rate) ใช้สูตรคำนวณ Thai estimated GFR equation ดังนี้

$$eGFR = 375.5 \times \text{serum creatinine}^{(-0.848)} \times \text{อายุ}^{(-0.364)} \times 0.712 \text{ (ถ้าเป็นผู้หญิง)}$$

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

เพื่อพิสูจน์ว่า Ang II ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการเกิดพังผืดในตับมีการเปลี่ยนแปลง หลังจากรักษาไวรัสตับอักเสบซีหาย

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัยและมาตรฐานแก้ไข

กรณีผู้ป่วยได้รับยาจากสถานพยาบาลอื่น จะมีการแนะนำผู้ป่วยเรื่องการให้ข้อมูลเกี่ยวกับการรักษา และตรวจสอบชื่อยาทุกครั้ง que ผู้ป่วยมาตรวจติดตาม

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย คุปเฟอร์เซลล์ (Kupffer cell) ในตับ มีตัวรับรู้การติดเชื้อไวรัส ตั้วอักเสบซี (pattern recognition receptors, PRRs) ทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการอักเสบโดยการหลั่งไซโตไคน์ เช่น interleukin (IL) - 1 beta, IL-18 และกระตุ้นการสร้าง pro IL-1 และ pro IL-18 ผ่านกระบวนการของ nuclear factor kappa B (NF- κ B) ¹¹

เมื่อเกิดการติดเชื้อหรือการอักเสบในตับ สเตลเลตเซลล์ (stellate cell) จะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายไมโอไฟโบรบลาสต์ (myofibroblast-like cell) และหลั่งสารต่าง ๆ เช่น platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor beta (TGF β), monocyte chemotactic protein type 1 (MCP-1), endothelin 1 (ET-1), Ang II และ leptin รวมทั้งเพิ่มจำนวนตัวรับของสารดังกล่าวที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้มีการหลั่งและสะสมสารนอกเซลล์ (extracellular matrix) มากขึ้น นอกจากนี้สเตลเลตเซลล์ที่ถูกกระตุ้นยังหลั่ง tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), TGF β , tissue inhibitor of metalloproteinase type 1 (TIMP-1), collagen type 1 และ integrins ซึ่งยับยั้งกระบวนการตายของสเตลเลตเซลล์ และ TIMP-1 ยับยั้งการทำงานของ matrix metalloproteinases (MMPs) ส่งผลให้กระบวนการทำลายพังผืดลดลง ¹²

การศึกษาในระดับเซลล์ พบว่า Ang II ที่จับกับ AT1R กระตุ้น toll-like receptor 4 (TLR4) และยับยั้ง bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) ทำให้การทำงานของ TGF β 1 ในสเตลเลตเซลล์เพิ่มมากขึ้น ¹³ ส่งผลกระตุ้น Smad cascade ทำให้มีการสะสม collagen type 1, procollagen I, procollagen III และ fibronectin มากขึ้น มีการกระตุ้น TIMPs ยับยั้ง MMPs และกระตุ้นการสร้าง TGF β 1 นอกจากนี้ Ang II ยังกระตุ้น Janus-activated kinase/Signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway โดยตรง ทำให้เซลล์สร้าง collagen type 1 มากขึ้น ¹⁴ ส่งผลให้ตับมีพังผืดมากขึ้น

สำหรับผลของ Ang II ต่อการเกิดพังผืดนั้น เมื่อ Ang II ถูกแองจิโอเทนซิน คอนเวิร์ตติง เอนไซม์ทู (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) เปลี่ยนเป็นแองจิโอเทนซิน(-1-7) [angiotensin(-1-7), Ang(-1-7)] หรือจับกับตัวรับแองจิโอเทนซินทูชนิดที่สอง (angiotensin II receptor type II, AT2R) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงในทางตรงกันข้าม คือจะยับยั้งการทำงานของ TGF β 1 ทำให้พังผืดในตับลดลง ^{14,15}

การศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าการฉีด Ang II ให้หนูที่ได้รับการผ่าตัดผูกท่อน้ำดีเพื่อกระตุ้นการเกิดภาวะตับแข็ง เมื่อมีการติดตามตรวจชิ้นเนื้อตับเป็นระยะ ๆ พบว่าชิ้นเนื้อตับย้อมติด alpha smooth muscle actin (alpha-SMA) มากขึ้น และมีการสะสมคอลลาเจนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ⁷

การศึกษาการทำงานของเรนิน (renin) และ ACE ในผู้ป่วยตับอักเสบเรื้อรังและตับแข็ง พบว่ามีค่าการทำงานของ renin และ ACE สูงกว่ากลุ่มควบคุมตลอด 24 ชั่วโมง และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับตามช่วงวัน ซึ่งควรมีค่าต่ำในเวลาเช้า¹⁶ ในผู้ป่วยตับแข็งที่มีน้ำในช่องท้อง 15 ราย มีการทำงานของ renin และมีระดับ Ang II สูงขึ้น ร่วมกับมีระดับของแองจิโอเทนซินเจน (angiotensinogen) ลดลงเมื่อเทียบกับค่าปกติ¹⁷ นอกจากนี้ การศึกษาการวัดระดับ Ang II ด้วยวิธี radioimmunoassay ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี 30 รายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีมีค่าเฉลี่ยระดับ Ang II 219.25 ± 91.31 ng/L สูงกว่ากลุ่มควบคุม (60.70 ± 10.73 ng/L) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับ Ang II สัมพันธ์กับความรุนแรงของภาวะตับอักเสบและตับแข็ง¹⁸

การวัดระดับการทำงานของ ACE โดยใช้วิธีสเปกโทรโฟโตเมตริก (spectrophotometric method) ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง 50 ราย พบว่า ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีมีระดับการทำงานของ ACE สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังจากรักษาด้วย Peg-IFN ร่วมกับ ribavirin ผู้ป่วยมีระดับการทำงานของ ACE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁹

การตรวจติดตามที่ 12 เดือนหลังรักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วยอินเตอร์เฟอรอน (IFN) พบว่าชิ้นเนื้อตับมีการอักเสบลดลงและมีจำนวนสเตรลเลตเซลล์ที่ถูกกระตุ้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย IFN มีผลยับยั้งการแบ่งตัวของสเตรลเลตเซลล์ และลด expression ของ alpha-SMA โดยไม่สัมพันธ์การตอบสนองต่อการรักษาไวรัส¹⁹ อย่างไรก็ตาม การศึกษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่รักษาด้วย IFN พบว่า ผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบไวรัสในเลือดสัปดาห์ที่ 24 หลังหยุดการรักษา สามารถลดพังผืดในตับได้ 2.69 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ตรวจพบไวรัสในเลือดสัปดาห์ที่ 24 หลังหยุดการรักษา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ²⁰ และในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง 3,010 ราย พบว่า ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษามีพังผืดในตับแย่งน้อยกว่าผู้ป่วยกลุ่มอื่น (พังผืดในตับแย่ง ร้อยละ 7 ในกลุ่มที่ตอบสนองต่อการรักษา ร้อยละ 17 ในกลุ่มที่กลับเป็นซ้ำ และร้อยละ 21 ในกลุ่มที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา)²¹

แนวทางการรักษาไวรัสตับอักเสบบีด้วย DAA

แนวทางการรักษาไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2559²² มีรายละเอียดดังนี้

สายพันธุ์ 1

ผู้ป่วยที่ยังไม่มีภาวะตับแข็ง

สูตรที่ 1: Peg-IFN ฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง ร่วมกับ sofosbuvir รับประทาน ขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

สูตรที่ 2: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ daclatasvir รับประทานขนาด 60 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา นาน 12 สัปดาห์

สูตรที่ 3: ยาสูตรผสมระหว่าง sofosbuvir ขนาด 400 มิลลิกรัม และ ledipasvir ขนาด 90 มิลลิกรัมรับประทานวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ สามารถรักษานานเพียง 8 สัปดาห์ในผู้ป่วยสายพันธุ์ 1b ที่มี ปริมาณไวรัสซีในเลือด (HCV RNA) ก่อนการรักษา น้อยกว่า 6,000,000 IU/mL

สูตรที่ 4: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ simeprevir รับประทานขนาด 150 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา นาน 12 สัปดาห์

หมายเหตุ: simeprevir ไม่ให้ใช้ในสายพันธุ์ 1a ที่มี Q80k variant

สูตรที่ 5: ยาสูตรผสมระหว่าง paritaprevir ขนาด 150 มิลลิกรัม และ ritonavir ขนาด 100 มิลลิกรัม และ ombitasvir ขนาด 25 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ dasabuvir ขนาด 250 มิลลิกรัม รับประทาน วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

หมายเหตุ: ให้ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง ร่วมด้วยในสายพันธุ์ 1a

ผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็ง

สูตรที่ 1: Peg-IFN ฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง ร่วมกับ sofosbuvir รับประทาน ขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

สูตรที่ 2: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ daclatasvir รับประทานขนาด 60 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถช้ยา ribavirin ได้ให้รักษานานขึ้นเป็น 24 สัปดาห์

สูตรที่ 3: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ ledipasvir รับประทานขนาด 90 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วม กับ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถช้ยา ribavirin ได้ให้รักษานานขึ้นเป็น 24 สัปดาห์

สูตรที่ 4: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ simeprevir รับประทานขนาด 150 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง เป็น เวลานาน 12 สัปดาห์ ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถช้ยา ribavirin ได้ให้รักษานานขึ้นเป็น 24 สัปดาห์

สูตรที่ 5: ยาสูตรผสมระหว่าง paritaprevir ขนาด 150 มิลลิกรัม และ ritonavir ขนาด 100 มิลลิกรัม และ ombitasvir ขนาด 25 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ dasabuvir ขนาด 250 มิลลิกรัม รับประทานวันละ 2 ครั้ง และ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง ให้รักษานาน 12 สัปดาห์ สำหรับสายพันธุ์ 1b และนาน 24 สัปดาห์สำหรับสายพันธุ์ 1a

สายพันธุ์ 2

ผู้ป่วยที่มีหรือไม่มีภาวะตับแข็ง

สูตรที่ 1: Peg-IFN ฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง ร่วมกับ sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

สูตรที่ 2: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ daclatasvir รับประทานขนาด 60 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

สูตรที่ 3: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ ในผู้ป่วยที่ไม่มีตับแข็ง และนาน 16 ถึง 24 สัปดาห์ ผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็ง

สายพันธุ์ 3

ผู้ป่วยที่ยังไม่มีภาวะตับแข็ง

สูตรที่ 1: Peg-IFN ฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง ร่วมกับ sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

สูตรที่ 2: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 24 สัปดาห์

สูตรที่ 3: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ daclatasvir รับประทานขนาด 60 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

ผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็ง

สูตรที่ 1: Peg-IFN ฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง ร่วมกับ sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

สูตรที่ 2: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ daclatasvir รับประทานขนาด 60 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ ribavirin รับประทานขนาด 1,000-1,200 มิลลิกรัม โดยแบ่งรับประทานวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 16 ถึง 24 สัปดาห์

หมายเหตุ: รักษาเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ในกรณีที่ เป็นเพียง bridging fibrosis

สายพันธุ์ 4

ผู้ป่วยที่ยังไม่มีภาวะตับแข็ง

สูตรที่ 1: Peg-IFN ฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง ร่วมกับ sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์

สูตรที่ 2: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ daclatasvir รับประทานขนาด 60 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถ ใ้ยา ribavirin ได้ให้รักษานานขึ้นเป็น 24 สัปดาห์

สูตรที่ 3: sofosbuvir รับประทานขนาด 400 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ ledipasvir รับประทานขนาด 90 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ร่วมกับ ribavirin รับประทานวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถ ใ้ยา ribavirin ได้ให้การรักษาขึ้นเป็น 24 สัปดาห์

สรุปแนวทางการรักษาไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรังโดยไม่มี Peg-IFN มีรายละเอียดดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 แนวทางการรักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรังด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง ในผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะตับแข็ง

สายพันธุ์	Sofosbuvir / Ribavirin	Sofosbuvir / Ledipasvir	Sofosbuvir / Daclatasvir	AbbVie's	Sofosbuvir / Simeprevir
1a	-	8 - 12 สัปดาห์	12 สัปดาห์	12 สัปดาห์ + Ribavirin	12 สัปดาห์
1b	-	8 - 12 สัปดาห์	12 สัปดาห์	12 สัปดาห์	12 สัปดาห์
2	12 สัปดาห์	-	12 สัปดาห์	-	-
3	24 สัปดาห์	-	12 สัปดาห์	-	-
4	-	12 สัปดาห์	12 สัปดาห์	-	12 สัปดาห์
5 / 6	-	12 สัปดาห์	12 สัปดาห์	-	-

ตารางที่ 2 แนวทางการรักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรังด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง
ในผู้ป่วยที่มีภาวะตับแข็ง

สายพันธุ์	Sofosbuvir / Ribavirin	Sofosbuvir / Ledipasvir	Sofosbuvir / Daclatasvir	AbbVie's	Sofosbuvir / Simeprevir
1a	-	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin	24 สัปดาห์ + Ribavirin	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin
1b	-	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin	12 สัปดาห์ + Ribavirin	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin
2	16 - 20 สัปดาห์	-	12 สัปดาห์	-	-
3	-	-	16 - 24 สัปดาห์ + Ribavirin	-	-
4	-	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin	-	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin
5 / 6	-	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin	24 สัปดาห์ หรือ 12 สัปดาห์ + Ribavirin	-	-

ในปัจจุบัน การรักษาด้วย DAA ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการติดเชื้อโดยมีผลที่ไวรัสโดยตรง ไม่มีผลต่อการปรับภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นการรักษามาตรฐานที่มีผลต่อการหาย (SVR) สูง มีการศึกษาแบบ prospective ในหลายสถาบัน พบว่าหลังการรักษา ผู้ป่วยที่หายจากโรคจะมีค่าของ Model for end-stage liver disease (MELD) และ Child-Turcotte-Pugh (CTP) scores ลดลงภายในระยะเวลาไม่กี่เดือนหลังการจบรักษา ซึ่งบ่งว่าการทำงานของตับดีขึ้น²³

เนื่องจากการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า Ang II สัมพันธ์กับการเกิดพังผืดในตับ และการศึกษาในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังโดยวิเคราะห์การทำงานของ ACE พบว่าหลังจากรักษามีการทำงานของ ACE ลดลง แต่ยังไม่มีการศึกษาระดับของ Ang II ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รับการรักษาด้วย DAA การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อพิสูจน์ว่าระดับ Ang II อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากรักษาผู้ป่วยให้หายจากไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วย DAA โดยไม่ได้เป็นผลทางจากการรักษาหายด้วยยาอินเตอร์เฟียรอน



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

การศึกษาเชิงวิเคราะห์แบบไปข้างหน้า (prospective cohort, observational analytic study)

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

3.2.1 ประชากร (population)

เกณฑ์การคัดเลือกประชากรเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

1. อายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป
2. ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง โดยไม่มีภาวะตับแข็งที่เป็นมาก (chronic hepatitis B with compensated liver disease)
3. ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง

เกณฑ์การคัดเลือกประชากรออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

1. ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและ/หรือเอชไอวี
2. มีโรคตับจากสาเหตุอื่น ได้แก่ สุรา การคั่งของน้ำดี ตับอักเสบจากภูมิคุ้มกันตนเอง การติดเชื้อ มะเร็ง โรคหัวใจ ความผิดปกติแต่กำเนิดหรือพันธุกรรม
3. ใช้อยาที่ออกฤทธิ์ต่อระบบเรนิน แองจิโอเทนซิน แอลโดสเตอโรน เช่น ACE inhibitor, angiotensin receptor blocker, ยาขับปัสสาวะ หรือยาเม็ดคุมกำเนิด
4. มีโรคมะเร็ง
5. มีความดันโลหิตสูงมากกว่า 220/120 มิลลิเมตรปรอท
6. มีภาวะไตวายเรื้อรังที่ค่าการทำงานของไตน้อยกว่า < 60 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อตารางเมตร

เกณฑ์การถอนประชากรจากโครงการวิจัย (Withdrawal criteria)

1. อาสาสมัครขอถอนตัวจากการศึกษา
2. ไม่ได้ sustained virologic response

3.2.2 สถานที่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 1873 ถนน พระรามที่ 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

3.2.3 เทคนิคในการสุ่มตัวอย่าง (Sampling techniques)

ประชากรเป้าหมาย (Target population) ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรังในประเทศไทย

ประชากรตัวอย่าง (Sample population) ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรังที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.2.4 ขนาดตัวอย่าง (Sample size)

เนื่องจากไม่เคยมีการศึกษาระดับ Ang II ในซีรัมผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรังที่รักษาด้วย DAA หากพิจารณาการศึกษาใกล้เคียง ซึ่งวัด ACE activity ในซีรัมผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรังที่รักษาด้วย Peg-IFN⁹

$$n = \frac{(z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2 \sigma^2}{MCD^2}$$

n = ขนาดตัวอย่าง

z = ระดับความเชื่อมั่น 95% จากตาราง Z มีค่าเท่ากับ 1.96

α = ความผิดพลาดของการสรุปลักษณะประชากรจากค่าสถิติของตัวอย่าง กำหนดให้เป็น 0.05

β = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ ซึ่งให้เท่ากับ 0.1

σ^2 = ค่าความแปรปรวน = $(3.25)^2$ IU/L

MCD = Minimal clinical difference (expert opinion = 2.5 IU/L)

n = $(1.96 + 1.28)^2(3.25)^2 / (2.5)^2 = 18$ คน

พิจารณาเก็บตัวอย่างเพิ่ม 20% เป็น 23 คน สำหรับกรณีผู้ป่วยขาดการติดตาม หรือออกจาก
การวิจัย

3.2.5 การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

การสัมภาษณ์ประวัติและตรวจร่างกายทุกครั้งที่พบผู้ป่วย

ข้อมูลพื้นฐาน ได้แก่ อายุ เพศ โรคประจำตัว ยาที่ใช้ ประวัติการรักษาไวรัสตับอักเสบบี

การตรวจทางห้องปฏิบัติการก่อนการรักษาและหลังจากหยุดรักษา 12 สัปดาห์ (SVR) ได้แก่ ความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (complete blood count) การแข็งตัวของเลือด (coagulogram) การทำงานของไต (blood urea nitrogen และ creatinine) เกลือแร่ (electrolyte) การทำงานของตับ (liver biochemical test) สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี และปริมาณไวรัสซีในเลือด

วัดความยืดหยุ่นของตับ (liver stiffness measurement, LSM) ก่อนรักษาและหลังจากรักษา 48 สัปดาห์ด้วยวิธี transient elastography (TE) โดยเครื่องไฟโบรสแกน [Fibroscan® 502 Touch (Echosens, Paris)] ค่ากลางความยืดหยุ่นของตับใช้มีฐานของการวัดสำเร็จ 10 ครั้ง โดยมีอัตราการวัดสำเร็จมากกว่าร้อยละ 70 (success rate > 70%) และสัดส่วนพิสัยระหว่างควอไทล์ต่อมีฐานน้อยกว่าร้อยละ 30 (interquartile range/median liver stiffness ratio <30%) ผู้ทำการตรวจได้รับการประกาศนียบัตรรับรองและมีประสบการณ์การตรวจอย่างน้อย 100 ครั้ง การตรวจใช้หัวตรวจขนาดกลาง (M probe) ตรวจที่ตับกลีบขวา โดยผู้ป่วยงดน้ำและอาหารอย่างน้อย 2 ชั่วโมง ก่อนตรวจ และตรวจในท่านอนหงายยกแขนขาขึ้นเหนือศีรษะ²⁴

การตรวจระดับ Ang II ในซีรัม ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ต้องการศึกษา ก่อนรักษาและหลังหยุดการรักษา 12 สัปดาห์

1. เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยทุกคนที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
2. ตรวจระดับ Ang II ในซีรัมของผู้ป่วยทุกคนพร้อมกันด้วยวิธี ELISA โดยใช้ ELISA kit for human Ang II (CEA005Hu, Cloud-Clone Corp., Katy, TX) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

2.1 ขั้นตอนการเตรียมสารที่ใช้เป็นตัวกระทำปฏิกิริยา (Reagent preparation)

2.1.1 การทำสารละลายมาตรฐาน (standard solution)

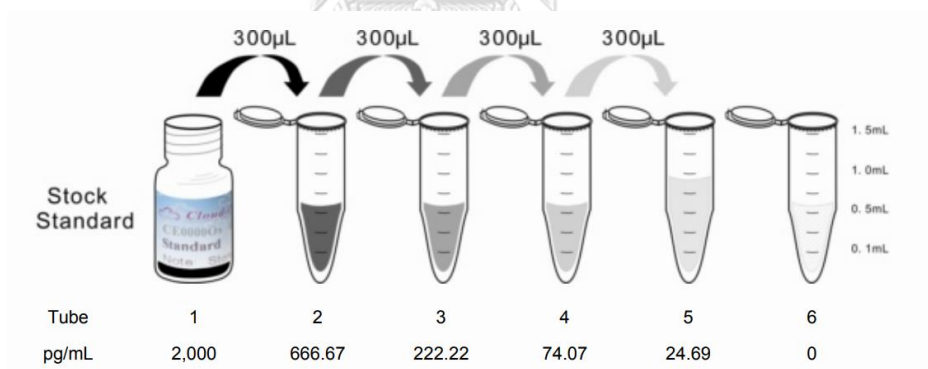
2.1.1.1 นำตัวทำละลายมาตรฐาน (standard diluent) 1 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (18 – 25 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที เขย่าสารเบา ๆ โดยไม่ทำให้เกิดฟอง

2.1.1.2 สารละลายมาตรฐานตั้งต้น (หลอดที่ 1) มีความเข้มข้น 20,000 pg/mL ให้เตรียมสารละลายหลอดที่ 2 ให้มีความเข้มข้น 2,000 pg/mL

2.1.1.3 เตรียมสารละลายหลอดที่ 3-6 โดยใส่สารละลายมาตรฐาน 0.6 มิลลิลิตร และเจือจางให้มีความเข้มข้น 666.67 pg/mL, 222.22 pg/mL, 74.07 pg/mL, 25.69 pg/mL ตามลำดับ

2.1.1.4 หลอดที่ 7 ไม่ใส่สารละลายมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้นเป็น 0 pg/mL (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน



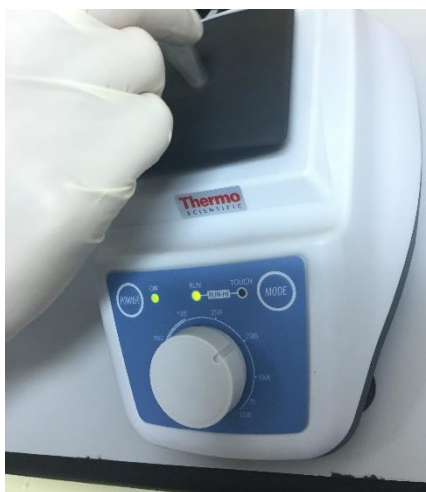
(ภาพจาก CEA005HU 96 Test ELISA Kit for Angiotensin II Instruction manual)

2.1.2 สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา ชนิด A (Detection reagent A)

2.1.2.1 ปั่นสารก่อนใช้ (ภาพที่ 3)

2.1.2.2 เจือจาง 100 เท่า

ภาพที่ 3 การปั่นสารก่อนใช้ ด้วยเครื่องกวนสารละลาย (stirrer) โดยความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที



2.1.3 สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา ชนิด B (Detection reagent B)

2.1.3.1 ปั่นสารก่อนใช้

2.1.3.2 เจือจาง 100 เท่า

2.1.4 สารละลายสำหรับล้าง (Wash solution)

2.1.4.1 เตรียมสารละลายสำหรับล้างเข้มข้น (wash solution concentrate) ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 580 มิลลิลิตร รวมปริมาตรสารละลายสำหรับล้าง 600

มิลลิลิตร

2.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์

2.2.1 ชุดทดสอบนี้เป็นชนิด 96 ช่อง (96-microwell plate) ให้กำหนดช่อง (well) สำหรับสารละลายมาตรฐาน และช่องสำหรับสารที่ต้องการทดสอบ

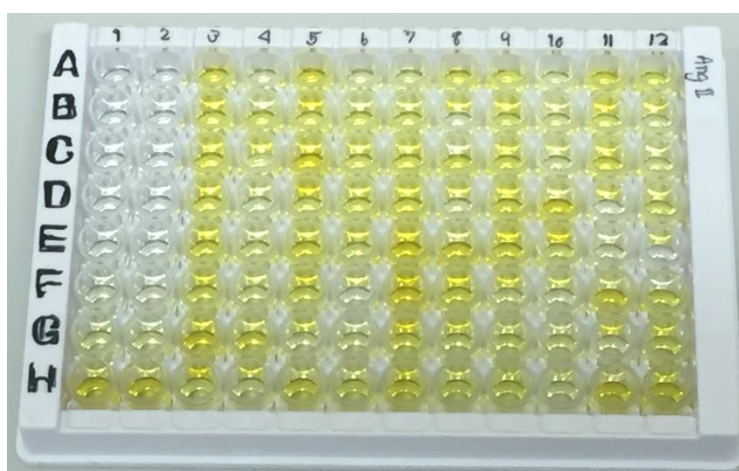
2.2.2 เตรียมสารที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร/ช่อง

2.2.3 ใส่สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา ชนิด A ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/ช่อง

2.2.4 ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ microplate shaker

2.2.5 อบ (incubate) ชุดทดสอบในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 5)

ภาพที่ 4 ชุดทดสอบชนิด 96 ช่อง กำหนดสดมภ์ (column) ที่ 1 และ 2 เป็นสารละลายมาตรฐาน และสดมภ์ที่ 3 -12 รวม 80 ช่อง เป็นสารที่ต้องการทดสอบ (ซีรัมของผู้ป่วย 40 คน ก่อนและหลังรักษา 12 สัปดาห์ รวม 80 ตัวอย่าง)



หมายเหตุ ในช่วงแรกของการวิเคราะห์ สารจะไม่มีสี (ขั้นตอน 2.2.1 – 2.2.10) ภาพนี้เป็นภาพหลังจากวิเคราะห์สารครบทุกขั้นตอนแล้ว

2.2.6 หลังจากถูกความร้อน ส่วนของสารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา ชนิด A จะขุ่นขึ้นเล็กน้อย ให้ตั้งชุดทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าสารในแต่ละช่องจะรวมเป็นเนื้อเดียวกันเหมือนเดิม (ภาพที่ 5)

2.2.7 ใช้ปิเปตต์แบบหลายช่อง (multi-channel pipette) ล้างสารด้วยสารละลายสำหรับล้างปริมาตร 350 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 1 นาที ซับของเหลวที่เหลือในช่องด้วยกระดาษ ล้างสารด้วยขั้นตอนดังกล่าวรวม 3 ครั้ง

2.2.8 ใส่สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา ชนิด B ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/ช่อง

2.2.9 อบชุดทดสอบในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.2.10 ล้างตามขั้นตอน 2.2.7 รวม 5 ครั้ง

ภาพที่ 5 Incubate ชุดทดสอบในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

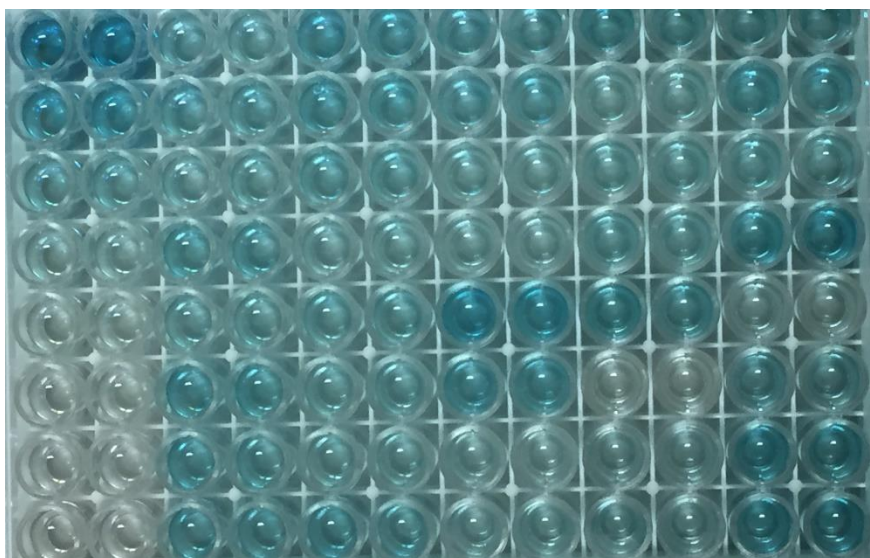


2.2.11 ใส่สารตั้งต้น (substrate) ปริมาตร 90 ไมโครลิตร/ช่อง ออบชุดทดสอบในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องในบริเวณที่ไม่ถูกแสง จะสังเกตว่าสารที่ไม่มีสี จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้า (ภาพที่ 6)

2.2.12 ใส่สารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยา (stop solution) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/ช่อง จะสังเกตว่าสารสีฟ้า จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 7)

2.2.13 ตรวจสอบว่าไม่มีอากาศหรือฟองในสาร นำไปวัดค่าที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร

ภาพที่ 6 สีของสารหลังผสมสารตั้งต้น จะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีฟ้า



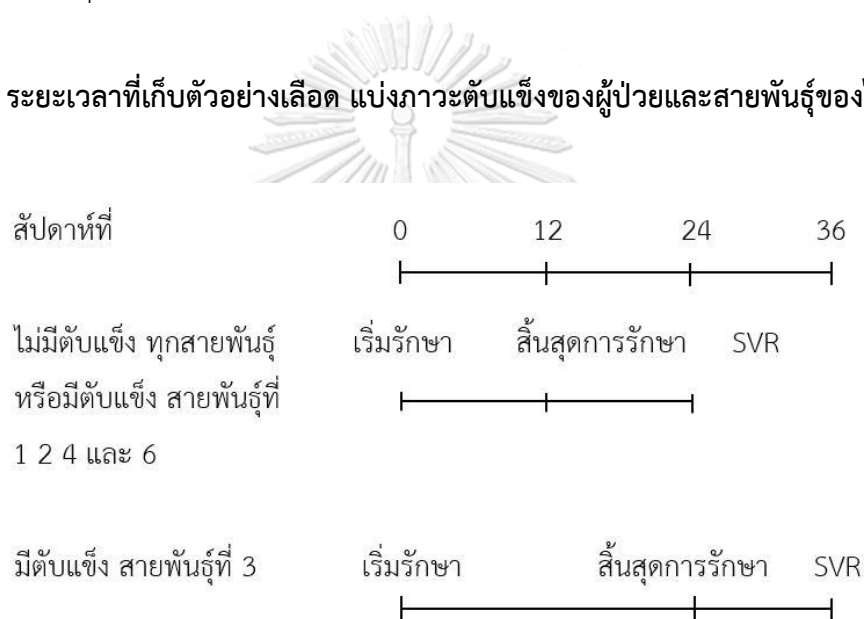
ภาพที่ 7 สีของสารหลังผสมสารละลายสำหรับหยุดปฏิกิริยา จะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง



3.2.6 ขั้นตอนการทำวิจัย

1. ชี้แจงวัตถุประสงค์ ขั้นตอนการวิจัยกับผู้ป่วย
2. ผู้ป่วยลงชื่อให้การยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (informed consent)
3. ผู้ป่วยมาตรวจติดตามการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอกทุก 2-4 สัปดาห์ พบแพทย์เพื่อสัมภาษณ์ประวัติและตรวจร่างกาย ผู้ป่วยรับการเจาะเลือดสำหรับตรวจความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด การทำงานของไต และการทำงานของตับเพื่อติดตามการรักษา และสำหรับตรวจระดับ Ang II ที่ก่อนเริ่มการรักษา และหลังจากเริ่มรักษาทุก 12 สัปดาห์จนถึง 12 สัปดาห์หลังหยุดการรักษา โดยมีรายละเอียดดังภาพที่ 8

ภาพที่ 8 ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างเลือด แบ่งภาวะตับแข็งของผู้ป่วยและสายพันธุ์ของไวรัส



4. รวบรวมตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับ Ang II ในซีรัมด้วยวิธี ELISA ที่ห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านโรคตับ

3.3 การรวบรวมข้อมูล

สถานที่ หน่วยโรคระบบทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
ผู้เก็บข้อมูล คือ ผู้ดำเนินการวิจัย

3.4 ข้อจำกัดในการวิจัย

การตรวจระดับ Ang II ในซีรัม อาจไม่ได้แปรผันตามกับระดับ Ang II ในเนื้อเยื่อตับ แต่การเจาะชิ้นเนื้อตับในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่จะรับการรักษาด้วย DAA ในปัจจุบันมีความเสี่ยงมากกว่าประโยชน์ที่ได้รับ นอกจากนี้ ในการศึกษาที่ผ่านมา แสดงว่าระดับ Ang II ในผู้ป่วยโรคตับสูงกว่าปกติ และ Ang II ที่สูงขึ้นในเลือดมีผลต่อการเกิดพังผืดในตับของสัตว์ทดลองจริง ดังนั้น การวัดระดับ ANG II ในซีรัมของผู้ป่วยน่าจะเป็นตัวบ่งชี้แทน (surrogate marker) ที่เหมาะสม

3.5 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

หลักความเคารพในบุคคล (respect for person)

อาสาสมัครทุกคนที่เข้าร่วมงานวิจัยนี้จะได้รับการชักชวนให้เข้าร่วมโดยสมัครใจ และมีขั้นตอนตามมาตรฐาน อธิบายให้เข้าใจถึงหลักการเหตุผลที่มาของงานวิจัย ร่วมกับบรรยายวิธีการเข้าร่วมและการปฏิบัติตัวระหว่างเข้าร่วมงานวิจัย และถึงแม้จะเข้าร่วมแล้วก็ตาม ก็มีสิทธิที่จะถอนตัวจากงานวิจัยได้โดยไม่ต้องชดใช้ค่าเสียหาย หรือถูกละเลยการดูแลรักษา โครงการวิจัยได้แสดงความเคารพในความเป็นส่วนตัวและการรักษาความลับ (privacy and confidentiality) โดยการเข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากอาสาสมัครไม่สมัครใจจะเข้าร่วม หรือเปลี่ยนใจก็สามารถปฏิเสธถอนตัวได้ตลอดเวลา โดยการขออนุญาตออกจากโครงการวิจัยนี้จะไม่มีการดูแลรักษาโรคของอาสาสมัครในอนาคต มีการรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร โดยข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวอาสาสมัครจะได้รับการปกปิดและไม่เปิดเผยต่อสาธารณชน

หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (beneficence/non-maleficence)

อาสาสมัครจะได้รับการรักษาไวรัสตับอักเสบบีตามมาตรฐาน และผู้วิจัยจะวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดเพื่อพิสูจน์สมมติฐานว่าระดับของ Ang II เปลี่ยนแปลงหลังจากรักษาไวรัสตับอักเสบบีหาย เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาการรักษาผู้ป่วย ทั้งนี้ อาสาสมัครต้องให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีตและปัจจุบันแก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริงและแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ร่วมในโครงการวิจัย

ความเสี่ยงจากการวิจัย: ผู้ป่วยได้รับการเจาะเลือดปริมาณ 2 มิลลิลิตร/ครั้ง รวม 3-4 ครั้งต่อคน โดยจำนวนครั้งที่เจาะเลือดไม่เพิ่มขึ้น ไม่มีความเสี่ยงเพิ่มเติมจากการตรวจรักษาตามปกติ และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าอาสาสมัครได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่พึงมี ในกรณีที่อาสาสมัครได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัยได้ตลอด 24 ชั่วโมง

หลักความยุติธรรม (justice)

งานวิจัยนี้มีเกณฑ์การคัดเข้าและออกอย่างชัดเจนตามระเบียบวิธีวิจัย และเพื่อความปลอดภัยของอาสาสมัคร อาสาสมัครทุกท่านจะได้รับการดูแลตามมาตรฐานอย่างเท่าเทียมกัน หากเกิดอันตรายหรือภาวะแทรกซ้อนจากการวิจัย อาสาสมัครจะได้รับการดูแลอย่างเหมาะสมโดยไม่เสียค่าใช้จ่ายและอาสาสมัครทุกท่านมีหมายเลขโทรศัพท์เพื่อติดต่อผู้วิจัยได้ตลอด 24 ชั่วโมง

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY) โดยเปรียบเทียบระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัมก่อนและหลังการรักษาโดยใช้ repeated measure quantitative pre-post observational study (paired sample t-test) สำหรับข้อมูลเชิงพรรณนาแสดงเป็นความถี่และร้อยละ ข้อมูลเชิงปริมาณแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) หรือค่ามัธยฐาน (median) และพิสัยระหว่างควอไทล์ (interquartile range) กำหนดค่า $p < 0.05$ มีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผู้เข้าร่วมการศึกษา

ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบซีเรื้อรังที่รักษาหายขาดด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงเข้าร่วมการวิจัย 40 คน ผู้ป่วยทั้งหมดไม่มีเกณฑ์การคัดเลือกประชากรออกจากโครงการวิจัยและไม่มีผู้ป่วยถอนตัวออกจากการศึกษา กลุ่มตัวอย่างในการศึกษานี้มีอายุเฉลี่ย 57 ± 10.4 ปี เป็นเพศชายร้อยละ 52.5 ได้รับการวินิจฉัยไวรัสตับอักเสบซีสายพันธุ์ 1 ร้อยละ 64.1 สายพันธุ์ 3 ร้อยละ 23.1 และสายพันธุ์ 6 ร้อยละ 12.8 ปริมาณไวรัสก่อนรักษาเฉลี่ย $6.2 \pm 0.6 \log \text{ IU/mL}$ (3,040,636.2 IU/mL) รายละเอียดพื้นฐานของผู้ป่วยก่อนการรักษาแสดงดังตารางที่ 3

สูตรยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ sofosbuvir ร่วมกับ daclatasvir ร้อยละ 75 และ sofosbuvir ร่วมกับ ledipasvir ร้อยละ 25 และมีผู้ป่วยร้อยละ 70 ได้รับ ribavirin ร่วมด้วย

4.2 ผลการวิเคราะห์การอักเสบและความยืดหยุ่นของตับ

ค่ามัธยฐานระดับอะลานีน ทรานส์อะมิเนส (alanine transaminase, ALT) ก่อน ก่อนรักษา 57.0 IU/mL (พิสัยระหว่างควอไทล์ 31.0 – 118.5 IU/mL) ลดลงเป็น 18.5 IU/mL (พิสัยระหว่างควอไทล์ 12.0 – 30.7 IU/mL) ที่ 24 สัปดาห์หลังการรักษา แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

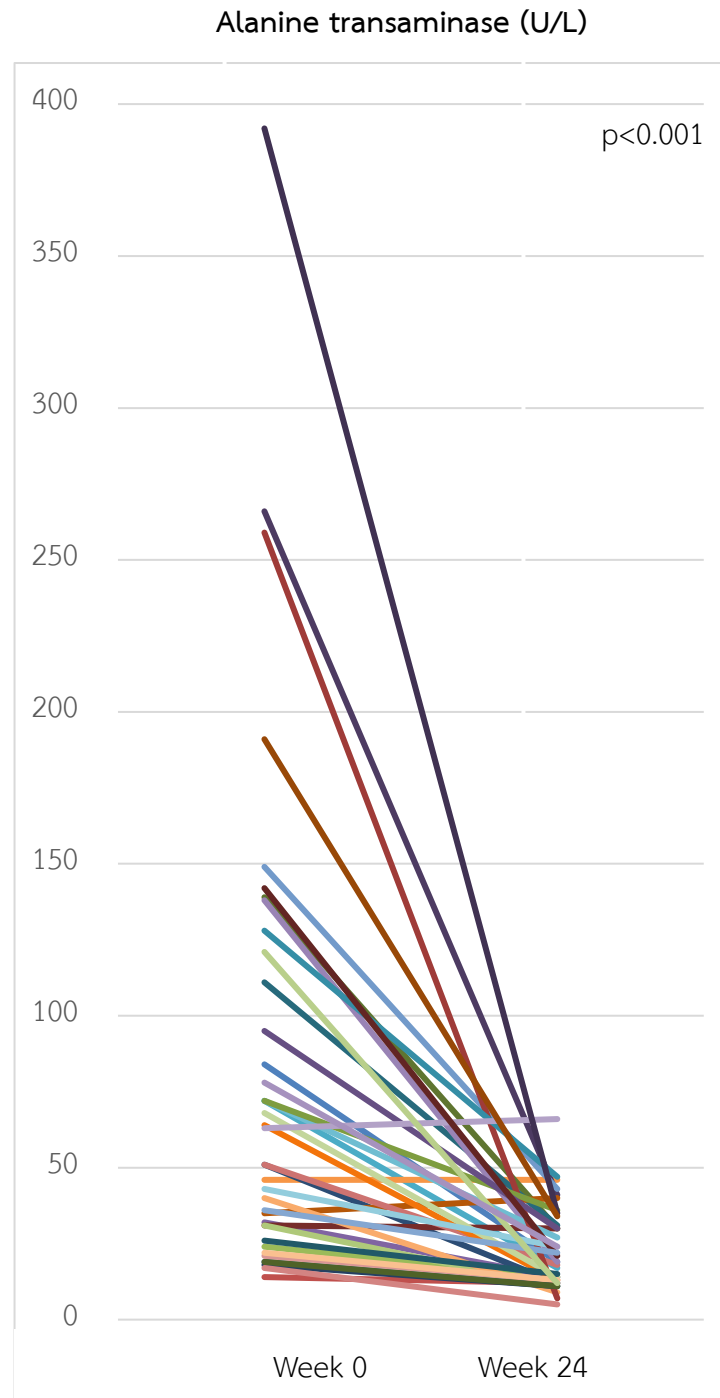
ค่าเฉลี่ยระดับ ALT การรักษา $83.1 \pm 79.5 \text{ IU/mL}$ ลดลงเป็น $22.4 \pm 13.9 \text{ IU/mL}$ ที่ 24 สัปดาห์หลังการรักษา แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในภาพที่ 9

ค่าเฉลี่ยและมัธยฐานความยืดหยุ่นของตับก่อนรักษาเท่ากับ 17.4 และ 14.3 kPa และหลังรักษาสัปดาห์ที่ 48 เท่ากับ 10.5 และ 8.6 kPa ตามลำดับ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในภาพที่ 10

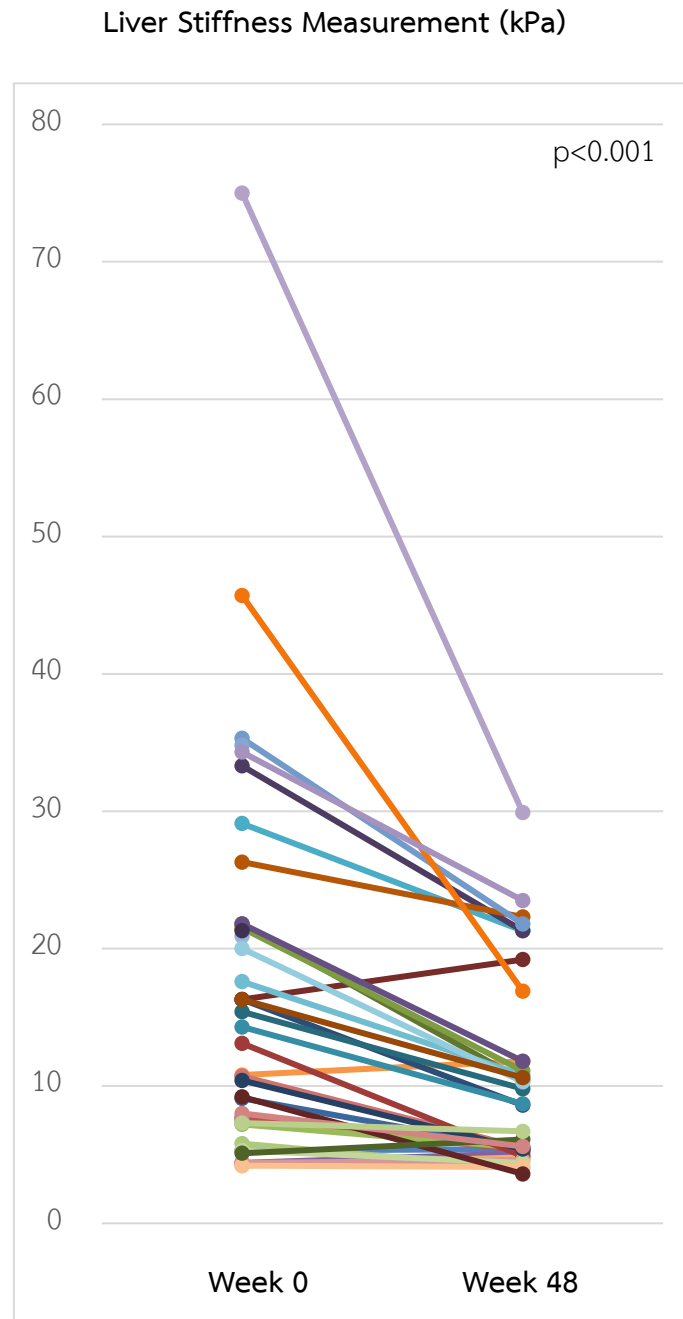
ตารางที่ 3 รายละเอียดพื้นฐานของผู้ป่วยก่อนการรักษา

อายุ (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน), ปี	57 \pm 10.4
เพศชาย, จำนวน (ร้อยละ)	21 (52.5)
สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี	
1, จำนวน (ร้อยละ)	25 (64.1)
3, จำนวน (ร้อยละ)	9 (23.1)
6, จำนวน (ร้อยละ)	5 (12.8)
ปริมาณไวรัส (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน), log IU/ml	6.2 \pm 0.6
สูตรยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง	
Sofosbuvir/Daclatasvir, จำนวน (ร้อยละ)	30 (75%)
Sofosbuvir/Ledipasvir, จำนวน (ร้อยละ)	10 (25%)
การใช้ยาไรบาไวรัส, จำนวน (ร้อยละ)	28 (70%)
การทำงานของตับ (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	
แอสปาเทต ทรานส์อะมิเนส, U/L	66.7 \pm 49.9
(มัธยฐาน, พิสัยระหว่างควอไทล์)	57.0, 59.0
อะลานีน ทรานส์อะมิเนส, U/L	83.1 \pm 79.5
(มัธยฐาน, พิสัยระหว่างควอไทล์)	57.0, 87.5
อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส, U/L	88.3 \pm 37.0
อัลบูมิน, g/dl	4.0 \pm 0.3
โกลบูลิน g/dl	3.9 \pm 0.8
บิลิรูบินทั้งหมด, mg/dl	1.0 \pm 0.4
ผลตรวจอื่น ๆ (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	
ปริมาณเกล็ดเลือด, $10^9/L$	181.5 \pm 70.8
อัตราการกรองของไต, ml/min/1.73m ²	91.7 \pm 14.0

ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงระดับอะลานีน ทรานส์อะมิเนสก่อนรักษาและหลังรักษาสัปดาห์ที่ 24



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงความยืดหยุ่นของตับก่อนรักษาและหลังรักษาสัปดาห์ที่ 48



4.3 ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของแองจิโอเทนซินทูในซีรัม

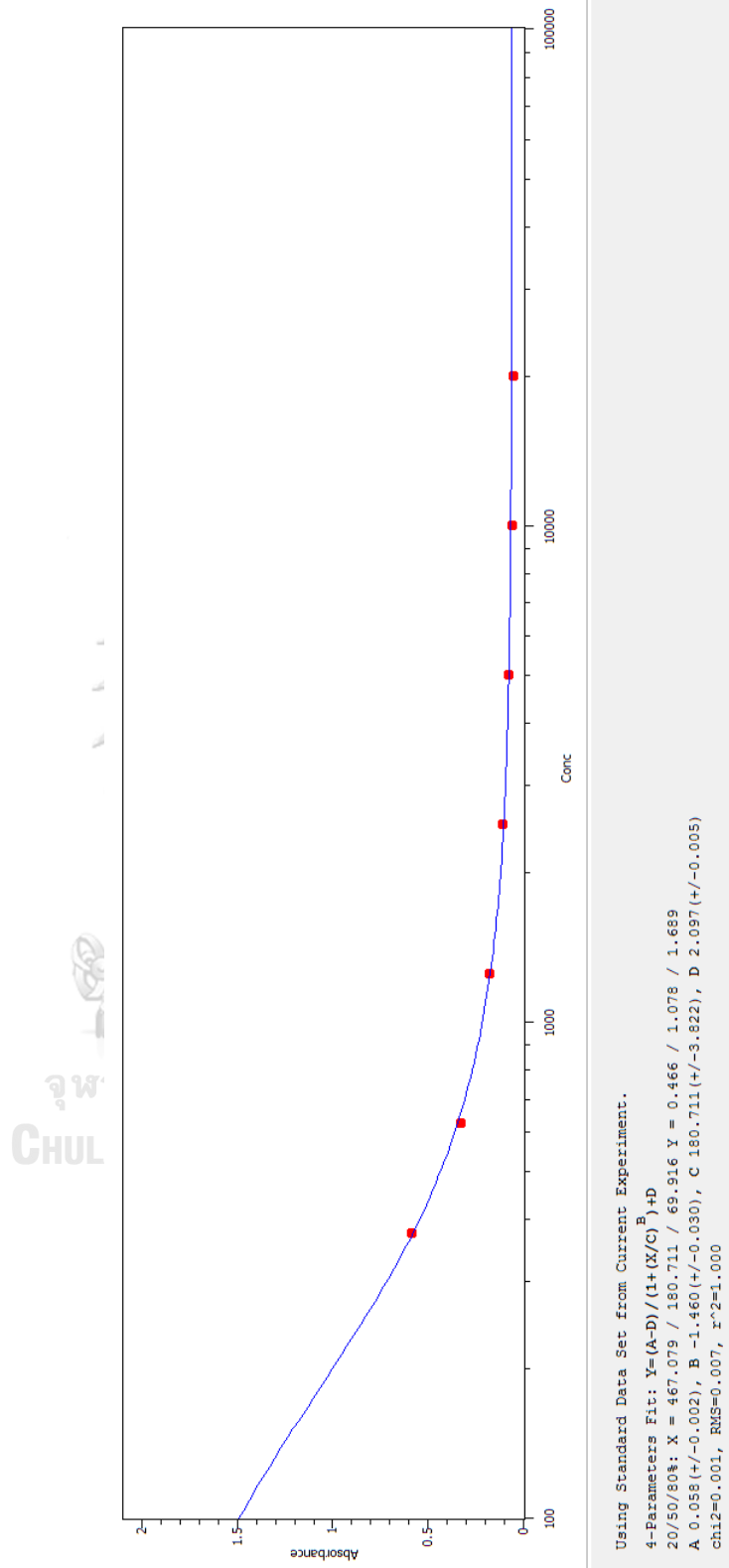
ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวทำละลายมาตรฐานของห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านโรคตับเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิง พบว่าความสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 1 ดังภาพที่ 10

ค่ามัธยฐานของระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัม ก่อนรักษาเท่ากับ 149.0 ng/mL (พิสัยระหว่างควอไทล์ 115.4 pg/mL) และเพิ่มขึ้นเป็น 286.88 pg/mL (พิสัยระหว่างควอไทล์ 191.1 pg/mL) หลังจากหยุดรักษาสัปดาห์ที่ 12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 11

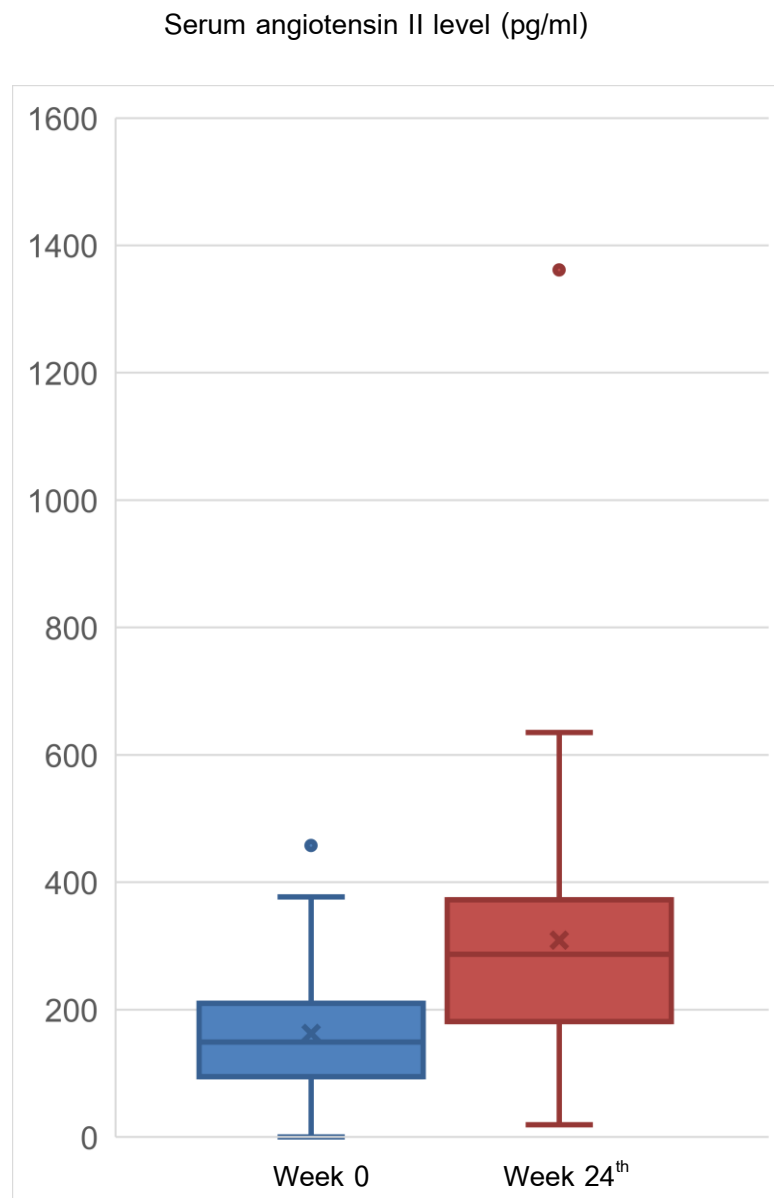
ค่าเฉลี่ยของระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 162.4 ± 110.2 pg/mL ก่อนรักษาเป็น 309.0 ± 220.4 pg/mL หลังจากหยุดรักษาสัปดาห์ที่ 12 ($p < 0.001$)



ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวทำลายมาตรฐานของห้องปฏิบัติการศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านโรคตับ
เปรียบเทียบค่าอ้างอิง พบว่าความสัมพันธ์ (R²) เท่ากับ 1



ภาพที่ 12 แผนภาพกล่องแสดงระดับของแองจิโอเทนซินทูในซีรัมก่อนรักษาและหลังรักษา สัปดาห์ที่ 24



บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล

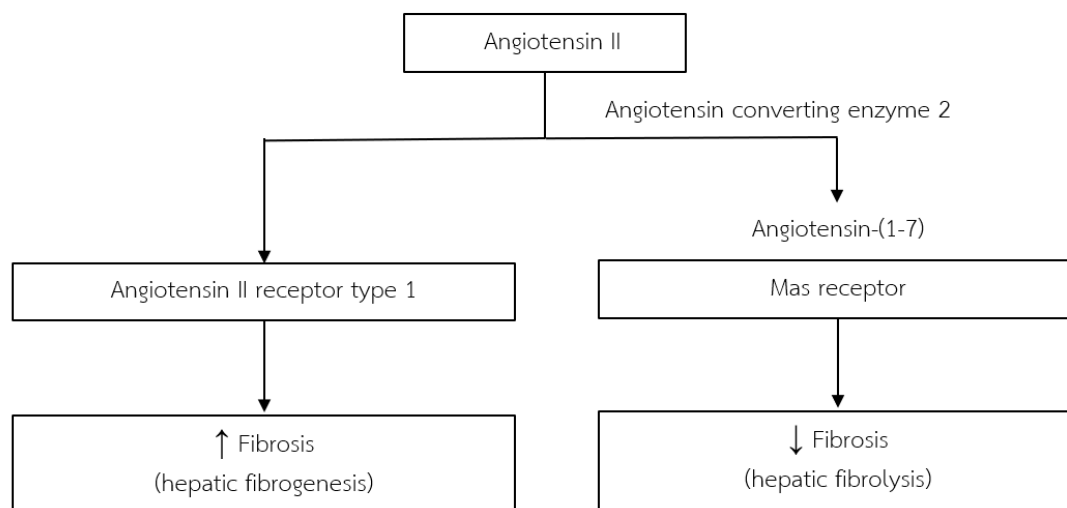
ไวรัสตับอักเสบบีที่พบในผู้ป่วยกลุ่มตัวอย่างที่มารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในช่วงปี พ.ศ. 2559-2560 เป็นสายพันธุ์ 1 3 และ 6 ร้อยละ 64.1 23.1 และ 12.8 ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ทั้งสามเป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อย่างไรก็ตาม ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ซึ่งตั้งอยู่ในภาคกลางของประเทศไทยพบไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ที่ 1 มากกว่าสายพันธุ์ที่ 3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทย แต่พบมากในภาคใต้ของประเทศ²⁵ สูตรยาด้านไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงที่ใช้ในการศึกษานี้มีสองสูตร ได้แก่ sofosbuvir ร่วมกับ daclatasvir และ sofosbuvir ร่วมกับ ledipasvir เนื่องจากเป็นยาด้านไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงเพียงสามชนิดที่สามารถจัดหาได้ในช่วงเวลาดังกล่าว

การลดลงของพังผืดในตับ และการป้องกันการเกิดพังผืดสะสมในตับเพิ่มขึ้นเป็นประโยชน์ที่ได้รับจากการรักษาไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังให้หายขาด วิธีการวัดความยืดหยุ่นของตับด้วยเครื่องไฟโบรสแกนสามารถแบ่งระดับของปริมาณพังผืดในตับได้ และเป็นที่ยอมรับในการประเมินพังผืดในตับด้วยวิธีการตรวจที่ไม่รุกราน²⁴ การศึกษานี้แสดงการลดลงของมัธยฐานความยืดหยุ่นของตับจากก่อนการรักษา 14.3 kPa เป็น 8.6 kPa หลังจากรักษา 48 สัปดาห์ สอดคล้องกับการศึกษาในประเทศสวิตเซอร์แลนด์ที่พบว่ามัธยฐานของความยืดหยุ่นของตับลดลงจาก 14.3 kPa (พิสัยระหว่างควอไทล์ 10.35 – 21.15 kPa) เป็น 9.1 kPa (พิสัยระหว่างควอไทล์ 6.1 – 13.9 kPa) หลังหยุดการรักษาไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วยยาด้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง 40 สัปดาห์ ($p < 0.001$) และ สอดคล้องกับการลดลงของ FIB-4 score (Fibrosis-4 score) และ APRI (AST to Platelet Ratio Index) ซึ่งเป็นการประเมินพังผืดในตับโดยใช้การเจาะตรวจเลือด²⁶

การศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่าแองจิโอเทนซินทูทำให้เกิดพังผืดสะสมในตับมากขึ้น โดยแองจิโอเทนซินทูจับกับตัวรับแองจิโอเทนซินทูชนิดที่หนึ่ง (angiotensin II type 1 receptor)²⁷ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ เพื่อพิสูจน์การเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์ชนิดนี้หลังจากรักษาผู้ป่วยให้หายจากไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วยยาด้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงซึ่งตัวยาไม่มีผลต่อกระบวนการเกิดหรือลดพังผืดในตับดังเช่นการรักษาด้วยอินเตอร์เฟียรอน ผลการศึกษาพบว่าระดับของแองจิโอเทนซินในซีรัมของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นที่ 24 สัปดาห์หลังการรักษาในขณะที่ค่าความยืดหยุ่นของตับซึ่งแสดงถึงพังผืดใน

ต่ำลดลง ผลที่เกิดขึ้นนี้อาจอธิบายได้จากระบบแองจิโอเทนซินทู-แองจิโอเทนซิน-(1-7)-ตัวรับแมสซึ่งส่งผลดพั้งผิดในตับ²⁷ ดังภาพที่ 13

ภาพที่ 13 แสดงบทบาทของแองจิโอเทนซินทูในมนุษย์



ผู้วิจัยคาดว่าในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังนั้น หลังจากรักษาหายด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง พังผืดในตับลดลงด้วยกลไกของแองจิโอเทนซินทูที่แตกต่างจากในสัตว์ทดลอง สิ่งที่ค้นพบจากการศึกษานี้ อาจอธิบายเหตุผลที่การใช้ยับยั้งแองจิโอเทนซิน คอนเวิร์ตติง เอนไซม์ในมนุษย์ไม่สามารถลดการเกิดพังผืดในตับได้ ดังจะเห็นได้จากการศึกษาแบบไปข้างหน้าของ ริส และคณะ (2012) ที่ให้ยับยั้งแองจิโอเทนซิน คอนเวิร์ตติง เอนไซม์ในผู้ป่วยเอชไอวีที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นเวลา 3 ปี ไม่มีผลยับยั้งหรือลดการเกิดพังผืดในตับ²⁸ และยังส่งผลไปในทางตรงกันข้ามอีกด้วย²⁹

5.2 สรุปผลการศึกษา

หลังจากรักษาไวรัสตับอักเสบบีหายขาดด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง ค่ามัธยฐานความยืดหยุ่นของตับลดลงและระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5.3 เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าที่เคยศึกษา

เนื่องจากไม่เคยมีการศึกษาระดับแองจิโอเทนซินทูในซีรัมผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่รักษาด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงมาก่อน จึงไม่สามารถเปรียบเทียบได้

5.4 ข้อดีของการศึกษานี้

เป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้าในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่รักษาด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรงซึ่งตัวยาไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของพังผืดในตับโดยตรง ผู้วิจัยตรวจสอบปัจจัยที่มีผลต่อระบบแองจิโอเทนซินทูเป็นระยะ ๆ ตลอดการศึกษา และผลของการศึกษานี้แตกต่างจากในสัตว์ทดลอง อาจทำให้อธิบายสาเหตุที่ยาที่ยับยั้งแองจิโอเทนซิน คอนเวิร์ตติง เอนไซม์หรือยาที่ยับยั้งการจับตัวรับแองจิโอเทนซินทูชนิดที่หนึ่งไม่ได้ผลลดพังผืดในตับของมนุษย์

5.5 ข้อดีของการศึกษานี้

การเจาะตรวจชิ้นเนื้อตับเพื่อประเมินพังผืดในตับเป็นการตรวจมาตรฐานสูงสุด (gold standard) ในอดีตมีจากการศึกษาที่เปรียบเทียบผลพังผืดจากการเจาะชิ้นเนื้อตับก่อนและหลังรักษาไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังด้วยอินเตอร์เฟียร์อน พบว่า พังผืดในตับลดลงหลังจากรักษาไวรัสตับอักเสบบีหายขาด^{30,31} การศึกษานี้ไม่ได้ประเมินพังผืดโดยการเจาะตรวจชิ้นเนื้อตับ ระดับอะลานีน ทรานส์อะมิเนสอาจส่งผลต่อความยืดหยุ่นของตับได้²⁴ อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน วิธีการตรวจความยืดหยุ่นของตับด้วยไฟโบรสแกนเป็นที่ยอมรับ และในทางปฏิบัติรวมทั้งงานวิจัยในปัจจุบันไม่มีการเจาะตรวจชิ้นเนื้อตับเพื่อติดตามระดับของพังผืดในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่รักษาหายด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง เนื่องจากมีความเสี่ยงมากกว่าประโยชน์ที่จะได้รับ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาแสดงว่าความยืดหยุ่นของตับสามารถพยากรณ์อัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังได้ โดยมีพื้นที่ใต้กราฟ receive operating characteristic เท่ากับ 0.82 (ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 0.68 – 0.90) ซึ่งจัดอยู่ในเกณฑ์ดี³²

5.6 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับระบบแองจิโอเทนซินทู แองจิโอเทนซิน-(1-7) ตัวรับแมส [angiotensin II/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis] ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่รักษา

หายขาดด้วยยาต้านเชื้อไวรัสที่ออกฤทธิ์โดยตรง เพื่อพิสูจน์ความเกี่ยวข้องกับกระบวนการลดลงของ พังผืดในตับต่อไป เช่น ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับแองจิโอเทนซิน-(1-7) ในซีรัม ศึกษาหรือ ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาเคมี (activity) ของแองจิโอเทนซิน คอนเวิร์ตติง เอนไซม์ 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2)

นอกจากนี้ การเจาะชิ้นเนื้อตับเพื่อประเมินพังผืด รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของ ไซโตไคน์หรือเอนไซม์ต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อตับ จะพิสูจน์ความเกี่ยวข้องของไซโตไคน์และเอนไซม์นั้นต่อ ปริมาณพังผืดในตับได้ดียิ่งขึ้น



รายการอ้างอิง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1. Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM. Lancet Seminar – Hepatitis C. *Lancet (London, England)*. 2015;385(9973):1124-1135.
2. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*. 2013;57(4):1333-1342.
3. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 380(9859):2095-2128.
4. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2015;61(1):77-87.
5. Wasitthanasem R, Posuwan N, Vichaiwattana P, et al. Decreasing Hepatitis C Virus Infection in Thailand in the Past Decade: Evidence from the 2014 National Survey. *PloS one*. 2016;11(2):e0149362.
6. Chung RT, Davis GL, Jensen DM, Masur H, Saag MS, Thomas DL. Hepatitis C guidance: AASLD-IDS recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology*. 2015;62(3):932-954.
7. Bataller R, Gabele E, Parsons CJ, et al. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats. *Hepatology*. 2005;41(5):1046-1055.
8. Hirose A, Ono M, Saibara T, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker inhibits fibrosis in rat nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2007;45(6):1375-1381.
9. Husic-Selimovic A, Sofic A, Huskic J, Bulja D. Effect of Antiviral Therapy on Serum Activity of Angiotensin Converting Enzyme in Patients with Chronic Hepatitis C. *Med Arch*. 2016;70(2):92-96.
10. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997;349(9055):825-832.
11. Kwon Y-C, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus infection: establishment of chronicity and liver disease progression. *EXCLI Journal*. 2014;13:977-996.

12. Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(11):1728-1734.
13. Li YS, Ni SY, Meng Y, et al. Angiotensin II facilitates fibrogenic effect of TGF-beta1 through enhancing the down-regulation of BAMBI caused by LPS: a new pro-fibrotic mechanism of angiotensin II. *PLoS one*. 2013;8(10):e76289.
14. Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2015;8:7.
15. Acuna MJ, Pessina P, Olguin H, et al. Restoration of muscle strength in dystrophic muscle by angiotensin-1-7 through inhibition of TGF-beta signalling. *Human molecular genetics*. 2014;23(5):1237-1249.
16. Cugini P, Letizia C, Lucia P, Di Palma L, Scavo D. The circadian rhythm of serum angiotensin-converting enzyme is disrupted in ascitic liver cirrhosis. *Enzyme*. 1989;41(2):94-100.
17. Imai M, Sokabe H. Plasma renin and angiotensinogen levels in pathological states associated with oedema. *Archives of Disease in Childhood*. 1968;43(230):475-479.
18. Liu Z, Tan M, Qiu D, Liu L. [The relationship between hepatitis B and renin-angiotensin-aldosterone system]. *Hua xi yi ke da xue xue bao = Journal of West China University of Medical Sciences = Huaxi yike daxue xuebao / [bian ji zhe, Hua xi yi ke da xue xue bao bian wei hui]*. 1991;22(3):303-306.
19. Guido M, Rugge M, Chemello L, et al. Liver stellate cells in chronic viral hepatitis: the effect of interferon therapy. *J Hepatol*. 1996;24(3):301-307.
20. Akhtar E, Manne V, Saab S. Cirrhosis regression in hepatitis C patients with sustained virological response after antiviral therapy: a meta-analysis. *Liver Int*. 2015;35(1):30-36.
21. Poynard T, McHutchison J, Manns M, et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1303-1313.
22. สมาคมโรคตับแห่งประเทศไทย. แนวทางการดูแลรักษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี ซี เรื้อรัง ในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2559. 2559.

23. Coilly A, Fougerou-Leurent C, de Ledinghen V, et al. Multicentre experience using daclatasvir and sofosbuvir to treat hepatitis C recurrence - The ANRS CUPILT study. *J Hepatol.* 2016;65(4):711-718.
24. Sebastiani G, Gkouvatsos K, Pantopoulos K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World Journal of Gastroenterology : WJG.* 2014;20(32):11033-11053.
25. Wasitthanasem R, Vongpunsawad S, Siripon N, et al. Genotypic distribution of hepatitis C virus in Thailand and Southeast Asia. *PloS one.* 2015;10(5):e0126764.
26. Bachofner JA, Valli PV, Kröger A, et al. Direct antiviral agent treatment of chronic hepatitis C results in rapid regression of transient elastography and fibrosis markers fibrosis-4 score and aspartate aminotransferase-platelet ratio index. *Liver International.* 2017;37(3):369-376.
27. Simoes ESAC, Miranda AS, Rocha NP, Teixeira AL. Renin angiotensin system in liver diseases: Friend or foe? *World J Gastroenterol.* 2017;23(19):3396-3406.
28. Reese LJ, Tider DS, Stivala AC, Fishbein DA. Effects of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors on Liver Fibrosis in HIV and Hepatitis C Coinfection. *AIDS research and treatment.* 2012;2012:978790.
29. Vlachogiannakos J, Tang AKW, Patch D, Bruuoughs AK. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II antagonists as therapy in chronic liver disease. *Gut.* 2001;49(2):303-308.
30. Serejo F, Costa A, Oliveira AG, Ramalho F, Batista A, De Moura MC. α -Interferon Improves Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Digestive Diseases and Sciences.* 2001;46(8):1684-1689.
31. Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, et al. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Annals of internal medicine.* 2000;132(7):517-524.
32. Vergniol J, Foucher J, Terrebonne E, et al. Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2011;140(7):1970-1979, 1979.e1971-1973.

ภาคผนวก

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาที่ได้รับการตอบรับจาก European Association for the Study of the Liver (EASL) ให้นำเสนอเป็น poster presentation ใน International Liver Congress 2018 ณ กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส วันที่ 13 เมษายน พ.ศ. 2561 ในหัวข้อเรื่อง Involvement of angiotensin II/angiotensin-(1-7) fibrinolytic pathway in improvement of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients who had sustained virological response by direct-acting antiviral therapy: a prospective trial โดยมีบทคัดย่อ ดังนี้

Abstract

Background and Aims: There is growing evidence that angiotensin II (Ang II)/angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)]/Mas receptor axis, a counter regulatory arm of renin angiotensin system (RAS), involves in fibrinolysis in *in vitro*/animal models. Eradication of hepatitis C (HCV) results in improvement of liver fibrosis by multi-mechanisms, including viral factors and stellate cells deactivation through the reduction of TGF-beta 1 stimulation and matrix enzymes changes toward the fibrinolytic stage. We hypothesize that this newly established pathway, to some extent, might involve in the improvement of liver fibrosis in chronic hepatitis C (CHC) patients who had sustained virological response (SVR) by direct acting antiviral drugs (DAA).

Method: After exclusion of factors that might affect RAS, forty CHC patients with compensated liver disease (mean age: 57±1.7 years; 52% male) were enrolled prospectively for 12-week DAA therapy and achieved SVR between July 2016 and September 2017. Baseline characteristics, HCV viral load (mean 6.2±0.1log IU/mL), HCV genotypes [1 (64.1%), 3 (23.1%) and 6 (12.8%)], liver enzymes and liver stiffness measurement (LSM) using Fibrosan[®] were assessed before starting the therapy. Blood samples for Ang II/Ang-(1-7) levels were collected at baseline, 12 and 24 weeks (SVR

12 weeks). LSM were repeated at 48 weeks. All patient samples (-70C storage) were evaluated simultaneously. Standard ELISA methods were used for the assays.

Results: The alanine aminotransaminase (ALT) levels were significantly decreased from 83 ± 12.6 IU/mL at baseline to 22 ± 2.2 IU/mL ($p < 0.001$) at 24 weeks. Mean and median LSM were significantly decreased from 17.4 and 14.3 kPa at baseline to 10.5 and 8.6 kPa at 48 weeks, respectively (Fig. 1A). Baseline mean of Ang II level was 162.4 ± 17.4 pg/mL. The level at 24 weeks (SVR 12 weeks) was significantly increased to 309.0 ± 34.9 pg/mL ($p < 0.001$) (Fig. 1B). By the same period, the mean Ang-(1-7) levels were significantly increased from 329.6 ± 22.2 pg/mL to 422.1 ± 21.4 pg/mL ($p < 0.001$) (Fig. 1C).

Conclusion: Supporting the *in vitro* and *vivo* evidences, increased Ang II and Ang-(1-7) serum levels are demonstrated in CHC patients who achieved SVR from DAA therapy along with the improvement of liver fibrosis. This RAS counter regulatory axis pathway might, in part, involve in the promotion of hepatic fibrosis regression in this scenario.

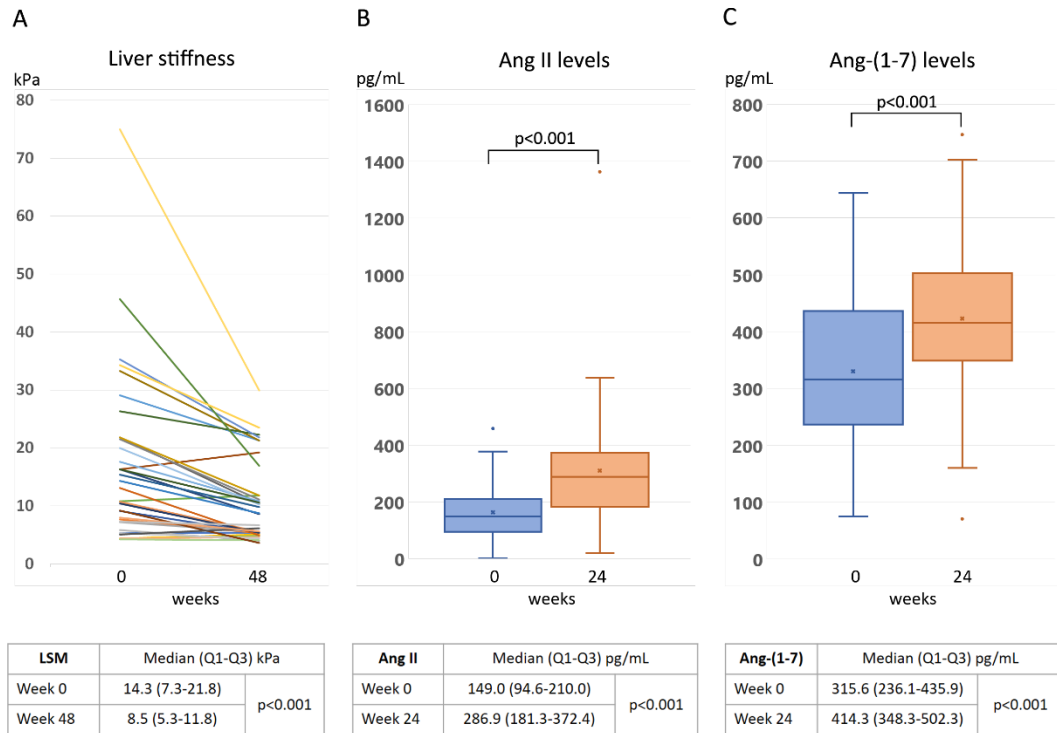


Fig. 1. Changes of liver stiffness, serum Ang II and Ang-(1-7) levels in CHC patients at baseline and after having SVR (A) Median LSM (kPa) at baseline (0 week) and 48 weeks, (B) and (C) Box plot graphs of serum Ang II and Ang-(1-7) levels (pg/mL) at baseline (0 week) and 24 weeks (SVR 12 weeks), respectively.

นอกจากนี้ การศึกษาต่อยอดจากงานวิจัยนี้ได้เป็นได้รับการตอบรับให้นำเสนอเป็น oral presentation ใน research forum ของ American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) ในงานประชุม Digestive Disease Week 2018 ณ เมืองวอชิงตัน ดีซี ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อวันที่ 3 มิถุนายน พ.ศ. 2561 ในหัวข้อเรื่อง Increased angiotensin II/angiotensin-(1-7) levels in chronic hepatitis C patients who had sustained virologic response with direct-acting antiviral drugs suggest their role in the improvement of hepatic fibrosis โดยมีบทคัดย่อ ดังนี้

Abstract

Background and aim: Angiotensin II (Ang II)/angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)]/Mas receptor axis, a counter-regulatory pathway of the classical renin angiotensin system (RAS), recently has been proven to play a critical role in hepatic fibrosis degradation both *in vitro* and *in vivo*. Eradication of hepatitis C viral (HCV) infection is associated with regression of hepatic fibrosis. Indeed, shifting balance from the profibrotic to fibrolytic stages could also be demonstrated by upregulation of fibrolytic enzymes, matrix metalloproteinases (MMPs) and down regulation of its inhibitor, tissue inhibitor of MMPs (TIMPs), in local tissues and serum. We hypothesize that Ang II/Ang-(1-7) might involve in the improvement of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C (CHC) patients who had sustained virologic response (SVR) by direct-acting antiviral drugs (DAA).

Method: CHC patients with compensated liver disease were prospectively enrolled for 12-week DAA treatment between July 2016 and September 2017. After exclusion of factors that might affect RAS, forty patients who achieved SVR were eligible for analysis. Baseline characteristics, HCV RNA, HCV genotypes, liver enzymes and liver stiffness measurement (LSM) using Fibroscan® were assessed before treatment. Blood samples were collected at baseline and 24 weeks (SVR12). LSM were repeated at 48 weeks. All blood samples (-70C storage) were evaluated for Ang II, Ang-(1-7), TIMP-1, and MMP-9 levels simultaneously using standard ELISA methods.

Results: Mean \pm SEM of age was 57 ± 1.7 years and 52% were male. HCV genotypes were 1 (64.1%), 3 (23.1%) and 6 (12.8%), mean HCV RNA was 6.2 ± 0.1 log IU/mL. Serum alanine aminotransferase (ALT) levels were 83 ± 12.6 IU/mL at baseline and significantly decreased to 22 ± 2.2 IU/mL ($p<0.001$) at 24 weeks. Mean and median LSM were significantly decreased from 17.4 and 14.3 kPa at baseline to 10.5 and 8.6 kPa at 48 weeks, respectively. As compared to the baseline levels, at 24 weeks (SVR12), in favour of fibrolytic side, the mean MMP-9 levels were increased from 365.7 ± 33.9 to 681.6 ± 67.6 ng/mL, and the mean TIMP-1 levels were significantly decreased from 268.8 ± 11.3 to 241.9 ± 10.2 ng/mL ($p=0.006$). By the same period, both Ang II and Ang-(1-7) levels were significantly increased from 162.4 ± 17.4 to 309.0 ± 34.9 pg/mL ($p<0.001$) and from 329.6 ± 22.2 to 422.1 ± 21.4 pg/mL ($p<0.001$), respectively (Figure 1, Table 1).

Conclusions: After curative treatment of CHC by DAA, the improvement of liver stiffness was demonstrated as early as 12 months. In addition, the dynamic changes indicating fibrolytic status occur earlier as demonstrated by the changes of serum MMP-9 and TIMP-1 levels. Importantly, the driving signals of these processes, to a certain degree, might be the Ang II/Ang-(1-7) fibrolytic axis, as shown by the increased levels of both proteins, supporting the previous *in vitro* and animal models.

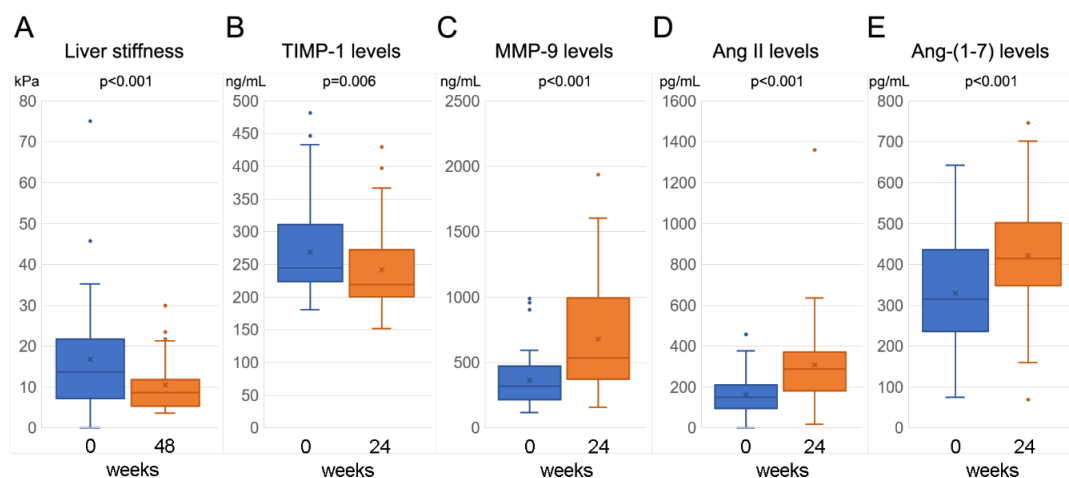


Figure 1. Box plot graphs showed changes of liver stiffness, serum TIMP-1, MMP-9, Ang II, and Ang-(1-7) levels in CHC patients at baseline and after having SVR. A, LSM at baseline (0 week) and 48 weeks. B-E, serum TIMP-1, MMP-9, Ang II and Ang-(1-7) levels at baseline (0 week) and 24 weeks, respectively.

	Week	Mean	SD	SEM	Median	Q ₁	Q ₃	p
ALT (IU/mL)	0	83.13	79.75	12.61	57.00	31.00	118.50	<0.001
	24	22.43	13.93	2.20	18.50	12.00	30.75	
LSM (kPa)	0	17.36	14.3	2.27	14.3	7.3	21.8	<0.001
	48	10.47	8.6	1.19	8.6	5.3	11.8	
TIMP-1 (ng/mL)	0	268.78	244.24	11.27	244.24	224.31	310.82	0.006
	24	241.88	219.30	10.19	219.30	200.96	272.18	
MMP-9 (ng/mL)	0	365.66	320.71	33.85	320.71	218.57	474.15	<0.001
	24	681.63	534.42	67.57	534.42	372.11	995.73	
Ang II (pg/mL)	0	162.42	110.20	17.42	148.99	94.59	209.99	<0.001
	24	309.04	220.42	34.85	286.88	181.33	372.39	
Ang-(1-7) (pg/mL)	0	329.58	140.45	22.21	315.61	236.08	435.86	<0.001
	24	422.14	135.47	21.42	414.35	348.27	502.26	

Table 1. Mean, standard deviation (SD), standard error of the mean (SEM), median, the first quartile (Q₁), the third quartile (Q₃), and p-value in the paired samples t-test of ALT, LSM, TIMP-1, MMP-9, Ang II and Ang-(1-7) levels at baseline and having SVR, respectively.

Case Record Form

**Changing of Serum Angiotensin II Level in Chronic Hepatitis C Patients
Who Achieved Sustained Virologic Response
after Direct-acting Antiviral Agent Therapy**

Patient characteristics

Age

Gender 1 Male 2 Female

Blood pressure / mmHg

Alcohol consumption 1 Yes 2 No

Hepatic encephalopathy 1 Yes 2 No

Ascites 1 Yes 2 No

Obstructive jaundice 1 Yes 2 No

Active malignancy 1 Yes 2 No Specify _____

Other known liver diseases 1 Yes 2 No Specify _____

HBV infection 1 Yes 2 No

HIV infection 1 Yes 2 No

Drugs

Spirolactone 1 Yes 2 No

Furosemide 1 Yes 2 No

HCTZ 1 Yes 2 No

ARB 1 Yes 2 No

ACEI 1 Yes 2 No

OCP 1 Yes 2 No

Liver function test

Albumin mg/dl Globulin mg/dl

Total bilirubin mg/dl Direct bilirubin mg/dl

AST U/L ALT U/L

ALP U/L

INR . Platelet count / cu.mm.
 Creatinine . mg/dl eGFR ml/min/m²
 Transient elastography . kPa CAP dB/m

Hepatitis C

Genotype
 Previous treatment 1 Yes (experienced) 2 No (naïve)
 Viral load 1 (start treatment) ,, IU/ml
 Viral load 2 (end of treatment) ,, IU/ml
 Viral load 3 (post treatment 12 weeks) ,, IU/ml
 Direct-acting antivirals
 Sofosbuvir 1 Yes 2 No
 Daclatasvir 1 Yes 2 No
 Ledipasvir 1 Yes 2 No
 Velpatasvir 1 Yes 2 No
 Ribavirin 1 Yes 2 No

Fibrogenic cytokines

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

	Start treatment	SVR12
Angiotensin II	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> pg/ml	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> pg/ml
TGF β 1	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> pg/ml	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> pg/ml
TIMP-I	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> ng/ml	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> ng/ml
MMP9	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> ng/ml	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> ng/ml

Remark

Withdraw due to Subject's decision
 Sustained virologic response is not achieved

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวณิชา ธีราทร

วันเดือนปีเกิด 19 สิงหาคม พ.ศ.2527 จังหวัดพิษณุโลก

สถานภาพ โสด

ตำแหน่งทางการศึกษาปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด

สาขาอายุรศาสตร์หน่วยโรคทางเดินอาหาร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

พ.ศ.2546 - 2552 นิสิตคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

พ.ศ.2552 - 2553 แพทย์เพิ่มพูนทักษะ โรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก

พ.ศ.2553 - 2555 แพทย์ใช้ทุน โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชนครไทย จังหวัดพิษณุโลก

พ.ศ.2555 - 2558 แพทย์ประจำบ้านภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล

พ.ศ.2558 - 2559 อายุรแพทย์ประจำโรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก

พ.ศ.2559 - ปัจจุบัน แพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาโรคทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริญญาและประกาศนียบัตร

พ.ศ.2552 แพทยศาสตรบัณฑิต

พ.ศ.2558 วุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญประกอบวิชาชีพเวชกรรมสาขาอายุรศาสตร์

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY