

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง SNP45/SNP276
ในผู้ป่วยโรคพ่อน้ำดีตีบตัน

นางสาววันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

ADIPONECTIN GENE POLYMORPHISMS AT SNP45/SNP276 IN BILIARY ATRESIA
PATIENTS

Miss Wanvisa Udomsinprasert

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง SNP45/SNP276 ในผู้ป่วยโรคพ่อน้ำดีตีบตัน
โดย	นางสาววันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อติศร ภัทราดุลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วรนุช จงศรีสวัสดิ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ศุภระวรรณ อินทรขาว)

วันวิสาข อุดมสินประเสริฐ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง SNP45/SNP276 ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน. (ADIPONECTIN GENE POLYMORPHISMS AT SNP45/SNP276 IN BILIARY ATRESIA PATIENTS)
 อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. นพ. ดร.สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ. นพ.ยง ภู่วรรณ, 128 หน้า.

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นการตีบตันของบริเวณท่อน้ำดีที่เกิดการอักเสบ ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการคั่งของน้ำดีสะสมในตับและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพังผืดสะสมในตับ ลักษณะอาการดังกล่าวจะนำไปสู่ภาวะตับแข็งได้ในที่สุด สำหรับโปรตีน adiponectin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากเนื้อเยื่อไขมัน มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกาย และการเกิดพังผืดสะสมในตับ ลักษณะดังกล่าวทำให้โปรตีน adiponectin อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G บริเวณ exon 2 และที่ตำแหน่ง +276G/T บริเวณ intron 2 ด้วยวิธี PCR-RFLP และทำการตรวจวัดระดับโปรตีน adiponectin ด้วยวิธี ELISA ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 106 ราย และกลุ่มควบคุมผู้ที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 107 ราย (สำหรับวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม) และ 40 ราย (สำหรับวิเคราะห์ระดับโปรตีน) ผลการศึกษาพบว่าลักษณะจีโนไทป์ GG และอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (GG; $P = 0.009$, G; $P = 0.004$) และผลการวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยมีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (172.75 ± 90.85 ng/ml กับ 93.91 ± 53.35 ng/ml, $P < 0.001$) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง +276G/T มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GT และ TT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (GG; 197.9 ± 86.5 ng/ml, GT; 122.14 ± 78.45 ng/ml, TT; 118.75 ± 84.47 ng/ml, $P < 0.001$) ดังนั้นผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin และการวิเคราะห์ระดับโปรตีนอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งอาจจะนำข้อมูลมาใช้ในการประกอบการอธิบายสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันร่วมกับการศึกษาปัจจัยในด้านอื่นๆ

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์... ลายมือชื่อนิสิต.....
 ปีการศึกษา2554..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5374695030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : BILIARY ATRESIA / ADIPONECTIN / SINGLE NUCLEOTIDE
POLYMORPHISM (SNP) / PCR-RFLP / ELISA

WANVISA UDOMSINPRASERT : ADIPONECTIN GENE POLYMORPHISMS AT
SNP45/SNP276 IN BILIARY ATRESIA PATIENTS. ADVISOR : ASSOC. PROF.
SITTISAK HONSAWAK, M.D. Ph.D., CO-ADVISOR : PROF. YONG
POOVORAWAN, M.D., 128 pp.

Biliary atresia (BA) is an inflammatory obliteration cholangiopathy, leading to progressive fibrosis and cirrhosis. Adiponectin, an inflammatory adipokine, is associated with liver fibrosis and inflammation, further suggesting that it may be associated with pathogenesis of BA. In this study, we examined whether two SNPs of adiponectin (+45T/G and +276G/T) were associated with the risk factors of BA. Total of 106 Thai patients with BA and 107 control subjects were included in this study. Adiponectin polymorphisms at +45T/G (rs2241766) of exon2 and +276G/T (rs1501299) of intron2 were evaluated by PCR-RFLP technique. Serum samples were assayed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The +276G/T SNP, the frequency of GG genotype ($P = 0.009$) and G allele ($P = 0.0043$) were significantly associated with an increased risk of BA. In addition, adiponectin levels were significantly higher in BA patients (172.75 ± 90.85 ng/ml) than those controls (93.91 ± 53.35 ng/ml, $P < 0.001$). The +276G/T polymorphism was associated with adiponectin levels. The serum adiponectin concentrations were higher in BA patients with the GG genotype (197.94 ± 86.45 ng/ml) compared with GT (122.14 ± 78.45 ng/ml) and TT genotype (118.75 ± 84.47 ng/ml for TT, $P < 0.001$). Adiponectin gene variation showed an association with BA, and adiponectin genotype may predict the increasing risk for BA and play a role in the susceptibility and progression of BA.

Field of Study : Medical science Student's Signature

Academic Year : 2011 Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งคอยให้ คำปรึกษา แนะนำ ช่วยหาวิธีการแก้ไขปัญหาอุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น ไม่ว่าจะเป็นปัญหาทางด้าน เรียน หรือปัญหาทางด้านการทำงาน รวมทั้งคอยให้กำลังใจผู้เขียนด้วยความเมตตา ตั้งแต่เริ่มทำ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ ที่กรุณารับ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้เมตตาต่อผู้เขียนคอยช่วยเหลือให้คำปรึกษา แนะนำ ตั้งแต่ผู้เขียนมีความคิดที่จะศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ผู้เขียนขอระลึกถึงความกรุณา ของท่านตลอดไป

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ ประธาน กรรมการวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวรรณุช จงศรีสวัสดิ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงศุภระวรรณ อินทราชว ที่กรุณารับเป็น กรรมการวิทยานิพนธ์ และได้สละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ ทั้งได้กรุณาให้คำแนะนำ และชี้แนะแนวทางจนวิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ผู้เขียนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์วิจัย ภายในศูนย์วิจัย และขอขอบคุณพี่ๆ ในห้องปฏิบัติการทุกคน และขอขอบใจเพื่อนๆ ระดับปริญญาตรี ปริญญาโทที่คอยช่วยทำงานและคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ นายกิริติ และ นางสุธาลินี อุดมสินประเสริฐ บิดาและมารดาผู้ให้กำเนิด ซึ่งท่านได้วางรากฐานชีวิต ให้โอกาสทางการศึกษา และพื้นฐานทาง ความคิดทำให้ผู้เขียนมีความเชื่อมั่นและปฏิบัติตนในสิ่งที่ถูกต้อง พร้อมทั้งให้ความรักและคอยเป็น กำลังใจให้แก่ผู้เขียนเสมอมาอันเป็นแนวทางนำไปสู่ความสำเร็จของผู้เขียน ตลอดจนสมาชิกใน ครอบครัวอุดมสินประเสริฐ ที่คอยเป็นกำลังใจให้ผู้เขียนมาโดยตลอด

คุณค่าและคุณประโยชน์ของงานวิจัยเล่มนี้ผู้เขียนขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณ บิดา มารดา ครูอาจารย์ทุกท่านที่ให้การอบรมสั่งสอนสร้างความรู้แก่ผู้เขียน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
กรอบแนวความคิดการวิจัย.....	4
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
โรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	9
การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	9
ยีน adiponectin.....	22
การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin.....	25
Single nucleotide polymorphism (SNP).....	34
การวิเคราะห์หาตำแหน่ง SNPs ด้วยเทคนิค PCR.....	35
Agarose gel electrophoresis.....	37
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
ประชากร.....	44
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	44

บทที่	หน้า
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	45
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	47
การดำเนินการวิจัย.....	48
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	49
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	57
การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin.....	59
ผลการเปรียบเทียบทางสถิติ.....	60
- ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin.....	66
- ผลการวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin.....	66
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	75
รายการอ้างอิง.....	94
ภาคผนวก.....	103
ภาคผนวก ก.....	104
ภาคผนวก ข.....	125
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	128

สารบัญญัตินำ

ตารางที่		หน้า
1	การตรวจวัดค่าทางชีวเคมีที่ใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยที่มีอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	13
2	ปัจจัยต่างๆที่เป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	22
3	ไพรเมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์.....	52
4	Reaction mixture สำหรับ PCR ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766).....	52
5	Reaction mixture สำหรับ PCR ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299).....	53
6	สภาวะและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766).....	53
7	สภาวะและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299).....	54
8	ส่วนผสมในการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme BspHI.....	55
9	ส่วนผสมในการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme BgLI.....	56
10	สารละลายที่ใช้ในการเตรียม 12% polyacrylamide gel.....	56
11	ข้อมูลลักษณะทั่วไปและอาการทางคลินิกของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	59
12	ความถี่ของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	65
13	ความถี่ของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มควบคุม.....	66
14	การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง+45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม.....	67
15	การกระจายตัวของอัลลีลของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง+45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม.....	68
16	การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง+45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุมเมื่อแบ่งตามลักษณะของเพศ.....	69
17	การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง+45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและ	

ตารางที่	ญ หน้า
	ในกลุ่มควบคุมเมื่อแบ่งตามลักษณะของเพศ..... 71
18	การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง+45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มี อาการตัวเหลืองและในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง..... 72
19	การกระจายตัวของอัลลีลของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง+45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มี อาการตัวเหลืองและในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง..... 73
20	การกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) แบบ haplotype block..... 74
21	ข้อมูลลักษณะทั่วไปและอาการทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมี ระดับเอนไซม์ ALT สูง และกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ..... 77

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่แบ่งตามตำแหน่งการตีบตันของท่อน้ำดี.....	11
2	ลักษณะการผ่าตัดแบบคาไซและลักษณะบริเวณ portal hepatic ภายหลังจาก การ transfection.....	15
3	ปัจจัยที่มีผลต่อการทำให้เกิดโรคในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	16
4	ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของยีน adiponectin.....	26
5	ลักษณะของโครงสร้างของ adiponectin.....	27
6	การรวมตัวกันของโมเลกุล adiponectin ในรูปแบบต่างๆ.....	27
7	ลักษณะโครงสร้างของ adiponectin receptors (adipoR1 และ adipoR2).....	28
8	การส่งสัญญาณของ adiponectin receptors (adipoR1 และ adipoR2).....	29
9	การส่งสัญญาณของ adiponectin ที่กระตุ้นการทำงานของ AMPK และ PPAR- α	30
10	บทบาทของ adiponectin กับการป้องกันการเกิด liver injury.....	32
11	หลักการการทำงานของ PCR ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ.....	38
12	การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis.....	41
13	การทำ serial dilution เพื่อใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน.....	57
14	ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) บริเวณ exon 2....	61
15	ลักษณะจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766).....	61
16	ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2.	62
17	ลักษณะจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2.....	63
18	แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม.....	64
19	แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม.....	64
20	กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม.....	75

ภาพที่	หน้า
21	กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลือง ผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง และกลุ่มควบคุม... 76
22	กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง ผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ และกลุ่มควบคุม..... 79
23	กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดภาวะ portal hypertension, กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่เกิดภาวะ portal hypertension, และกลุ่มควบคุม..... 80
24	กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีลักษณะจีโนไทป์ TT, TG และ GG ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766)..... 81
25	กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG, GT และ TT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs150299)..... 82
26	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับลักษณะอาการทางคลินิก..... 83

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia หรือ BA) เป็นโรคที่เกิดขึ้นในทารกแรกเกิดซึ่งพบได้น้อย มีรายงานอุบัติการณ์ในการเกิดโรคประมาณ 1:15,000 ของทารกแรกคลอด [1] ผู้ป่วยมีการคั่งของบิลิรูบินชนิด conjugated หรือ direct bilirubin ในเลือด เนื่องจากการตีบตันของท่อน้ำดีและส่งผลทำให้เกิดพังผืดสะสมในตับ (liver fibrosis) การคั่งของน้ำดีทำให้เกิดอันตรายต่อดับและนำไปสู่ภาวะตับแข็งในผู้ป่วยได้ เมื่อเกิดภาวะตับแข็งและไม่ได้รับการผ่าตัดระบายน้ำดีที่คั่งลงมาในลำไส้โดยการทำการ hepatic-portoenterostomy (Kasai operation) ผู้ป่วยจะเสียชีวิตจากตับแข็งที่อายุเฉลี่ยประมาณ 1 ปีครึ่ง และส่วนใหญ่จะเสียชีวิตเมื่ออายุประมาณ 7 ปี หากการผ่าตัด Kasai operation ไม่ประสบความสำเร็จ โดยที่อาการของโรคยังไม่ดีขึ้นจำเป็นต้องทำการรักษาโดยการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ ซึ่งพบว่าเมื่อทำการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ อัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น สำหรับลักษณะอาการที่พบในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะพบอาการตัวเหลือง บริเวณตาขาวมีสีเหลือง (jaundice) ปัสสาวะมีสีเข้ม อุจจาระมีสีซีด ท้องมานจากการที่มีตับหรือม้ามโตซึ่งอาการเหล่านี้มีสาเหตุเกิดจากการมีน้ำดีคั่งค้างสะสมในตับ [2-4]

สำหรับอุบัติการณ์ของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่รายงานไว้ในประเทศต่างๆ เช่นในประเทศฮอลแลนด์พบสัดส่วนของทารกที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันต่อทารกปกติ 5:100,000 ในประเทศฝรั่งเศสพบประมาณ 5.1:100,000, ประเทศอังกฤษพบ 6:100,000, ประเทศสหรัฐอเมริกาในรัฐเท็กซัส 6.5:100,000, เมืองวิกตอเรียประเทศออสเตรเลียพบประมาณ 7:100,000, หมู่เกาะฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกา และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิกทางฝั่งประเทศฝรั่งเศสพบประมาณ 10.6-32:100,000 และในแถบภูมิภาคเอเชียประเทศญี่ปุ่นพบ 7.4:100,000 [1] จากสถิติตัวเลขที่รายงานการเกิดโรคแสดงให้เห็นว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่พบได้น้อยและสัดส่วนในการเกิดโรคพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย แม้ว่าในปัจจุบันมีการศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคอย่างจริงจัง แต่ก็ยังไม่มีผู้ใดทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรค

จากตัวอย่างการศึกษาด้านสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันได้พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยมีการศึกษาความหลากหลายลักษณะทางพันธุกรรมของยีนต่างๆ เช่น vascular endothelial growth factor gene (VEGF), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), และ macrophage migration inhibitory factor (MIF) เป็นต้น ซึ่งยีนดังกล่าวเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เนื่องจากการอักเสบเกิดขึ้นที่ตับมีความสัมพันธ์กับ

การเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมในยีน adiponectin กับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน adiponectin เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นตัวต่อต้านการอักเสบ (anti-inflammation) และมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญไขมันในร่างกาย มีรายงานการศึกษาพบว่า adiponectin มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดพังพืดสะสมในตับ (liver fibrosis) ด้วย

มีรายงานการศึกษาที่ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766, synonymous) ในส่วนของ exon 2 และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในส่วนของ intron 2 พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของ 2 ตำแหน่งนี้เกี่ยวข้องกับภาวะ insulin resistance ความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ภาวะ metabolic syndrome และภาวะ atherosclerosis ในประชากรหลายชนชาติโดยเฉพาะในประชากรที่เป็นชาวเอเชียตะวันออก [5]

ด้วยเหตุนี้ทางผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ในส่วนของตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ที่อยู่ในบริเวณ exon 2 และ +276G/T (rs1501299) ที่อยู่ในบริเวณ intron 2 ซึ่งอาจนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการประกอบการอธิบายเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมกับการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในประชากรไทย โดยเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน
2. เพื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีน adiponectin ในเลือดของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มควบคุม และศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม
3. เพื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีน adiponectin ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยที่มีรูปแบบของยีนที่แตกต่างกันและศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของโปรตีน adiponectin กับลักษณะของจีโนไทป์ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ขอบเขตของการวิจัย

1. ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน (biliary atresia) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และยินยอมเข้าร่วมโครงการด้วยความสมัครใจตลอดระยะเวลาของการศึกษาวิจัย
2. กลุ่มควบคุม (control) เป็นอาสาสมัครเด็กปกติที่ไม่มีประวัติการป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอายุและเพศใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ข้อตกลงเบื้องต้น

กลุ่มที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบไปด้วย 2 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มที่ทำการศึกษา (case) คือ กลุ่มเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และมีอายุไม่เกิน 18 ปี
2. กลุ่มควบคุม (control) คือ กลุ่มเด็กที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ไม่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เข้ามารับวัคซีนที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และมีอายุไม่เกิน 18 ปี

ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากการศึกษาความหลากหลายของยีน adiponectin ในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เป็นประชากรไทยยังไม่เคยมีผู้ใดทำการศึกษามาก่อนทำให้ไม่ทราบความแปรปรวนของประชากรในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) คือ การศึกษาความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ภายหลังจากตัดโดย restriction enzyme เพื่อใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมหรือโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากกลายพันธุ์ (mutation) การกลายพันธุ์สามารถทำให้เกิด restriction site ใหม่ หรือทำให้ restriction site เดิมที่มีอยู่แล้วหายไป
2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) คือ วิธีการตรวจหาสารโดยอาศัยหลักการการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี โดยทำการเคลือบพื้นผิวของแผ่นเพลทด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาในสารตัวอย่าง ซึ่งถูกเติมลงไปพร้อมกับแอนติเจน ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate) โดยทั้งคู่เกิดการแย่งกันลงไป

จับกับแอนติบอดีที่เคลือบผิวเอาไว้ ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่ต้องการตรวจหา ดังนั้นถ้าตัวอย่างมีแอนติเจนมากกว่าก็จะจับกับแอนติบอดีได้มากกว่า และเมื่อเติมสับสเตรท (substrate) ก็จะได้สีที่เข้มต่างกันตามจำนวนของ แอนติเจน และแอนติบอดีคอนจูเกต

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G SNP (rs2241766) บริเวณ exon 2 และที่ตำแหน่ง +276G/T SNP (rs1501299) บริเวณ intron 2 กับการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันเพื่อที่จะได้นำข้อมูลมาใช้ในประกอบการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางพันธุกรรมกับการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรค

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเลือด โดยเจาะเลือดปริมาณประมาณ 3-5 ml ใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA
2. ปั่นเลือดเพื่อแยกเก็บซีรัม ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวบริเวณส่วนของ buffy coat ตรงรอยต่อระหว่างพลาสมาและก้อนเลือด

ขั้นตอนการสกัด DNA

การสกัดสารพันธุกรรมใช้ชุดสกัด illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- นำส่วนของเลือดที่ได้ทำการแยกพลาสมาและซีรัมออกไปแล้ว
- ทำการเติม lysis buffer ลงไปประมาณ 3 ml จากนั้นผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าได้เอาเม็ดเลือดแดงออกไปจนหมด
- เติม PBS ลงไป 200 µl ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปใส่ใน microtube ที่มี proteinase K อยู่ 20 µl และเติม lysis buffer ลงไปอีก 400 µl นำไป vortex เป็นเวลา 15 วินาที จึงตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนั้นให้ทำการ vortex เป็นครั้งคราว เมื่อครบเวลาจะเห็นสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำตาล
- นำสารละลายใส่ลงใน column ปั่น column ที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เทของเหลวในส่วนของการ collection tube ทิ้งไป

- เติม lysis buffer 500 μ l ปั่น column ที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที ต่อจากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้งไป
- เติม wash buffer 500 μ l ปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เทส่วนของเหลวทิ้งไปจากนั้นนำไปปั่นอีก 3 นาทีเพื่อให้ column แห้งสนิท
- เปลี่ยน column ไปสู่ microtube อันใหม่ จึงทำการเติม elution buffer ที่ได้ทำการอุ่นที่อุณหภูมิ 70 °C ลงไป 200 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที
- นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- ทำการเก็บส่วนของสารละลาย (genomic DNA) ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาสภาพของดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ Genomic DNA

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณและวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยนำไปวัดด้วยเครื่อง nanodrop ซึ่งมีหลักการการวัดปริมาณดีเอ็นเอคล้ายกับเครื่อง UV spectrophotometer โดยวิเคราะห์ปริมาณสารโดยใช้หลักการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วงอัลตราไวโอเล็ต และแสงที่ตาสามารถมองเห็นได้ (visible light) ช่วงความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 นาโนเมตร

1. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerize chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยอาศัยหลักการการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบภายในระยะเวลาอันสั้น สำหรับหลักการของ PCR ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอและการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่สำหรับเทคนิค PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นที่ 1 Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95° C

ขั้นที่ 2 Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60° C

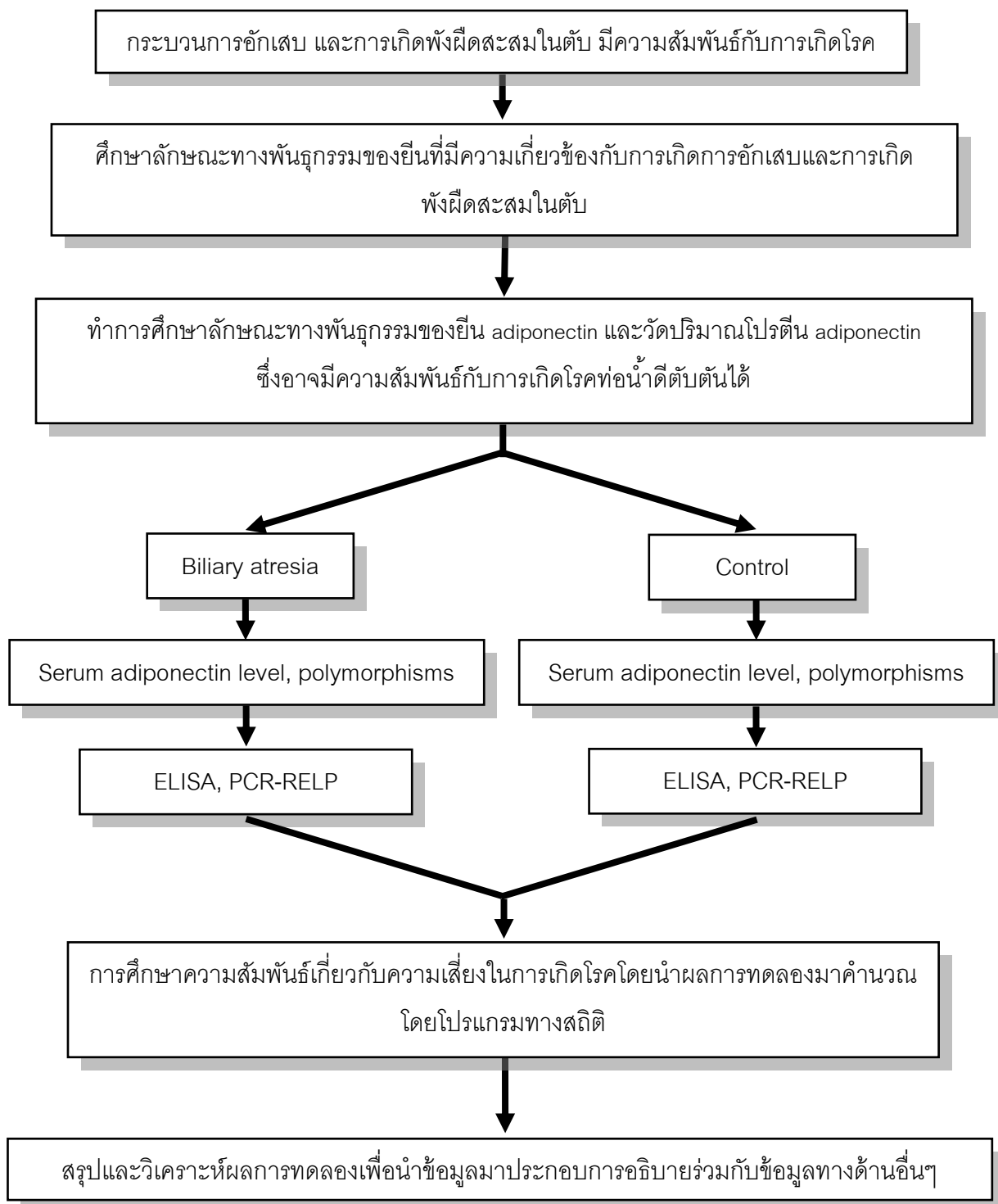
ขั้นที่ 3 Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75° C เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้ง 3 ขั้นตอน

2. ทำการวิเคราะห์ polymorphism โดยใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) บริเวณ exon 2 ใช้ restriction enzyme ชนิด BspH1 (New England Biolabs) และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2 ใช้ restriction enzyme ชนิด BgL1 (New England Biolabs) ซึ่งทั้ง 2 ตำแหน่งใช้อ้างอิงจาก Nakatani et al. [89] เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนและทำการวิเคราะห์ปัจจัยทางพันธุกรรมกับการก่อให้เกิดโรค

3. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (PCR products) และวิเคราะห์ polymorphism จากการตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธี RFLP และวิเคราะห์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้ 2-2.5% agarose gel electrophoresis และ 12% polyacrylamide gel electrophoresis ต่อจากนั้นนำ gel ที่ได้ไปย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปส่องดูลักษณะแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV

4. ตรวจวัดระดับของ adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

กรอบแนวความคิดการวิจัย



ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์หลักสูตร วท.ม. (สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ดำเนินการวิจัย รวบรวมข้อมูล สรุปและวิเคราะห์ผลการวิจัย
4. นำเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ต่อสาธารณะชนและยื่นเสนอวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์หลักสูตร วท.ม. (สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia หรือ BA) เป็นโรคที่มีการคั่งของน้ำดีในทารกแรกเกิด โดยมีการตีบตันของท่อน้ำดีในส่วนของ extrahepatic bile duct รูปแบบของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันแบ่งออกตามระยะการแสดงอาการได้ 2 แบบ คือ

1. Non-syndromic BA หรือ postnatal form พบประมาณร้อยละ 80 ของผู้ป่วย อาการเกิดขึ้นในระยะ 3 ถึง 6 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด โดยในระยะแรกเด็กมีลักษณะที่ปกติและจะถ่ายอุจจาระมีสีซีดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งอาจจะเกิดจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เป็นตัวกระตุ้นในการก่อให้เกิดอาการมากขึ้น

2. Syndromic BA หรือ fetal/embryonic form พบประมาณร้อยละ 20 ของผู้ป่วย โดยที่ผู้ป่วยจะแสดงอาการภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด เป็นผลมาจากความผิดปกติที่เกิดขึ้นมาตั้งแต่กำเนิดและอาจพบความผิดปกติอื่นๆร่วมด้วย เช่น polysplenia syndrome, cardiac หรือ intra-abdominal defects (situs inversus, pre-duodenal portal vein, absence of retro-hepatic inferior vena cava และ annular pancreas) เป็นต้น [6]

ในปัจจุบันยังไม่มีทฤษฎีใดได้รับการยืนยันว่าสามารถอธิบายสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ทำให้ไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรคนี้อย่างถูกต้อง Tan et al. [7] ได้เสนอทฤษฎี ductal plate malformation ที่เกิดขึ้นระหว่างการพัฒนาตับ และได้อธิบายการไหลของน้ำดีเมื่อท่อน้ำดีมีลักษณะผิดปกติ ลักษณะดังกล่าวเกิดจากกระบวนการต่อต้านการอักเสบซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ใช้ในการกำจัดน้ำดีมีการทำงานที่ไม่สมดุล

สำหรับการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมกับความสัมพันธ์กับการก่อโรค มีรายงานการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่พบในเด็กฝาแฝด และประมาณร้อยละ 10-20 ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะพบอาการของความผิดปกติตั้งแต่กำเนิดที่เกิดจาก interrupted inferior vena cava, pre-duodenal portal vein, malrotation, cardiac anomalies, situs inversus และ polysplenia (BA splenia malformation syndrome) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน CFC1 เป็นสาเหตุในการเกิดโรคในผู้ป่วยที่มีอาการแบบ syndromic BA โดยมีปัจจัยที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัยทางพันธุกรรมช่วยส่งเสริมให้เกิดลักษณะของโรคนี้ขึ้นด้วย สำหรับปัจจัยอื่นของการเกิดโรค เช่น ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการพัฒนาหลอดเลือดนำไปสู่ภาวะ

ขาดเลือดไปหล่อเลี้ยงเพื่อใช้ในการสร้างและพัฒนาระบบท่อน้ำดีและเมตาบอลิซึมของกรดน้ำดี (bile acid metabolism) ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นส่วนหนึ่งของการเกิดโรคทั้งสิ้น [7]

ลักษณะทางพยาธิวิทยา

ในระดับจุลภาคของท่อน้ำดีนอกตับที่เกิดการตีบตันโดยสมบูรณ์จากกลไกการอักเสบและการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (cicatricial granulation tissue) เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อจากขั้วตับ จะพบทั้ง inflammatory cell infiltration และ fibrosis ประกอบกับมีโครงสร้างคล้ายท่อเล็กๆ ซึ่งเชื่อว่าเปลี่ยนแปลงมาจากท่อน้ำดีหลัก ท่อเล็กๆบริเวณขั้วตับเหล่านี้เป็นช่องทางที่ยังสามารถระบายน้ำดีจากท่อน้ำดีในตับมายังบริเวณ porta hepatis ได้

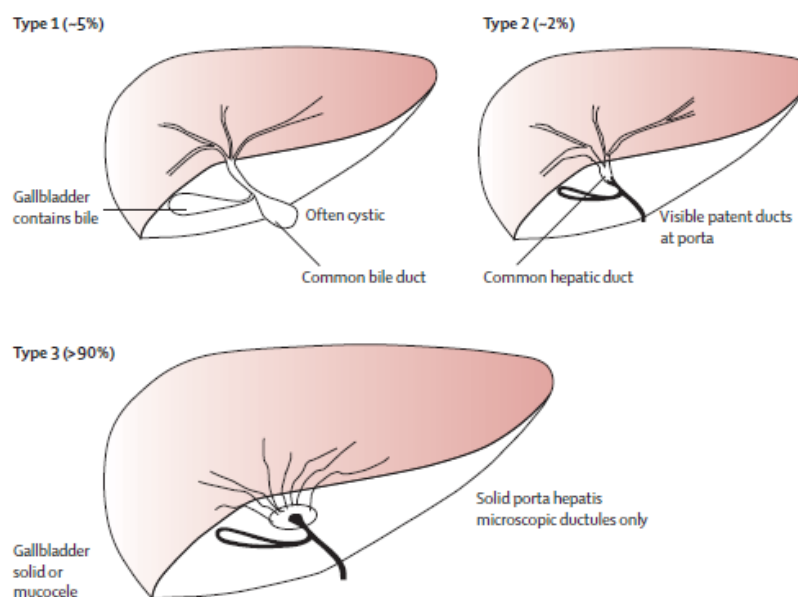
เนื้อตับในเด็กที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจะมีลักษณะ ตับโต แข็งและมีสีคล้ำเขียว nodular cirrhosis เกิดในระยะต่อมา ในระดับจุลภาคในระยะแรกโครงสร้างของ portal tracts ยังคงปกติ มีเพียง bile pigment แทรกในเซลล์ตับและท่อน้ำดีเล็กๆ (bile canaliculi) ซึ่งต่อมากจะกว้างออกและเพิ่มจำนวนขึ้น หากการตีบตันไม่ได้รับการรักษา โครงสร้างของ portal tracts จะถูกทำลายและเกิดตับแข็งในที่สุด จุลพยาธิสภาพในระยะที่เกิดตับแข็งแล้วพบการตายของเซลล์ตับ และพบ giant cell transformation รวมทั้งพบ mononuclear cells แทรก พยาธิสภาพในระยะท้ายเหล่านี้พบใน neonatal hepatitis ทำให้ไม่สามารถแยกโรคได้จากการตัดชิ้นเนื้อตับมาตรวจ [7]

พยาธิวิทยาของ extrahepatic biliary system มีความหลากหลายมากในกลุ่มผู้ป่วยแต่สามารถจำแนกโดยอาศัยตำแหน่งการตีบตันของบริเวณท่อน้ำดีเป็นเกณฑ์พื้นฐานที่ใช้ในการจำแนกทำให้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

ชนิดที่ 1 Common bile duct atresia เป็นชนิดที่มีการตีบตันบริเวณ common duct ในขณะที่ proximal ducts ปกติ ซึ่งเป็นการตีบตันเฉพาะส่วนปลายของท่อน้ำดี

ชนิดที่ 2 Common hepatic duct atresia เป็นชนิดที่มีการตีบตันของ hepatic duct และพบ cystic structures ในบริเวณ portal hepatis ซึ่งเป็นการตีบตันเฉพาะส่วนต้นของท่อน้ำดี

ชนิดที่ 3 Common bile duct รวม right และ left hepatic duct atresia ซึ่งพบได้มากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยที่มีการตีบตันบริเวณ right hepatic ducts และ left hepatic ducts ไปจนถึง portal hepatis เป็นการตีบตันตลอดบริเวณท่อน้ำดีในส่วน extrahepatic bile duct [7]



รูปภาพที่ 1 ลักษณะการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่แบ่งตามตำแหน่งการตีบตันของท่อน้ำดี [12]

ลักษณะอาการทางคลินิก

ผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันจะมีอาการตัวเหลืองตาเหลือง อุจจาระมีสีซีด ตับและม้ามโต (hepatosplenomegaly) มากกว่าครึ่งในเด็กที่เป็นโรคนี้จะมีอุจจาระสีปกติในช่วง 2-3 วันแรกคลอด จากนั้นจะพบอาการอุจจาระซีดร่วมกับอาการตัวเหลืองที่เรียกว่าภาวะดีซ่าน (jaundice) คือ ผู้ป่วยจะมีตัวเหลืองและบริเวณตาขาวมีสีเหลือง อาการตัวเหลืองตาเหลืองที่พบในเด็กเกิดใหม่ถือว่าเป็นเรื่องปกติ และเด็กสามารถหายเหลืองได้ภายใน 2 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด แต่ถ้าสาเหตุของอาการตัวเหลืองตาเหลืองเกิดจากโรคตับอาการเหล่านี้จะไม่สามารถหายได้เอง หรือหายได้เองแต่ใช้เวลานานกว่า 2 สัปดาห์ในผู้ป่วยโรคตับบางชนิด ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทั้งหมดที่มีภาวะดีซ่านแบบเรื้อรังจะมีปัสสาวะสีเข้ม ซึ่งลักษณะที่ผิดปกติเช่นนี้ส่งผลทำให้กระบวนการดูดซึมอาหารผิดปกติโดยเฉพาะความผิดปกติในการดูดซึมสารอาหารประเภทที่ละลายในไขมัน ลักษณะอาการดังกล่าวจะมีการแสดงออกในผู้ป่วยอย่างช้าๆ นอกจากนี้ผู้ป่วยบางรายจะมีอาการโลหิตจาง (anemia) ทุพโภชนาการ (malnutrition) ภาวะความดันในหลอดเลือดดำพอร์ทัลสูง (portal hypertension) ท้องมาน (ascites) ตับม้ามโต (hepatosplenomegaly) และหลอดเลือดโป่งพองในหลอดอาหาร (oesophageal varices) เกิดขึ้นร่วมด้วย [7]

อุบัติการณ์ของการเกิดโรค

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่พบได้น้อยโดยจะพบในอัตราส่วนประมาณ 1:10,000-20,000 ของเด็กแรกเกิดมีชีพ มีตัวเลขรายงานอุบัติการณ์ในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ดังนี้ ในประเทศเนเธอร์แลนด์ [6] มีรายงานสัดส่วนของการเกิดโรคต่อเด็กปกติ 5:100,000 ในประเทศฝรั่งเศส [8] มีรายงาน 5.1:100,000 ประเทศสหรัฐอเมริกาบริเวณรัฐเทกซัส [9] พบประมาณ 6.5:100,000 ประเทศออสเตรเลียบริเวณรัฐวิกตอเรีย [10] รายงานไว้ประมาณ 7:100,000 และในประเทศญี่ปุ่น [11] มีรายงานประมาณ 7.4:100,000 สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีตัวเลขรายงานอุบัติการณ์ของการเกิดโรคนี้ จากการศึกษาแบบ time distribution และ space distribution ของโรคท่อน้ำดีตีบตันพบว่าโรคนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกช่วงเวลาและฤดูกาล แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีข้อจำกัดเนื่องจากการทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่จำกัด [9-10] ซึ่งยังไม่สามารถที่จะนำข้อมูลมาใช้อธิบายได้

จากตัวเลขที่รายงานอุบัติการณ์ของการเกิดโรคชี้ให้เห็นว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันสามารถเกิดได้ในทุกเชื้อชาติ และความแตกต่างระหว่างเพศชายและเพศหญิงอาจส่งผลกระทบต่อ การก่อให้เกิดโรคเนื่องจากมีรายงานการเกิดโรคในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย สำหรับช่วงอายุที่จะ ก่อให้เกิดโรคนั้นส่วนใหญ่พบว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันจะเกิดเฉพาะในช่วงแรกเกิด ในลักษณะที่ เรียกว่า fetal/perinatal form ซึ่งจะเกิดภายใน 2 สัปดาห์แรก และในลักษณะ postnatal form จะ เกิดภายใน 2-8 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด

นอกจากนี้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบว่าผู้ป่วยจะมีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้นภายหลังจากการได้รับการผ่าตัดแบบคาไซประมาณร้อยละ 45-60 ภายใน ระยะ 5 ปี และร้อยละ 25-35 ภายในระยะ 10 ปี ซึ่งผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซ อาจจะพบอาการข้างเคียง เช่น ภาวะ cholangitis ซึ่งพบประมาณร้อยละ 50 และภาวะ portal hypertension พบมากกว่าร้อยละ 60 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซ สำหรับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซแล้วไม่ประสบผลสำเร็จ น้ำดีไม่สามารถที่ จะไหลลงสู่ลำไส้เล็กได้จะส่งผลกระทบต่อตับของผู้ป่วยซึ่งอาจพัฒนานำไปสู่ภาวะตับแข็งภายในช่วงปี แรกของชีวิต ผู้ป่วยที่มีอาการตับแข็งจะมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับได้ (hepatocellular carcinoma) และสำหรับวิธีการที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดประสิทธิภาพที่ดีที่สุด คือ การรักษาโดยการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ (liver transplant)

การวินิจฉัยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาสาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลืองและตาเหลืองในผู้ป่วย โดยทั่วไปจะใช้วิธีการที่เรียกว่า serum fractionated bilirubin assay โดยค่าที่นำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการวิเคราะห์คือ ค่าของ total bilirubin ที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 mg/dl ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว สำหรับการตรวจวิเคราะห์การทำงานของตับ (liver function test, LFT) จะพบระดับ bilirubin สูงกว่าปกติ โดยมีลักษณะแบบที่เรียกว่า direct hyperbilirubinemia นอกจากนี้จะพบระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) อาจสูงได้เล็กน้อย ในผู้ป่วยบางราย ส่วนระดับของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) และเอนไซม์ gamma-glutamyl transferase (GGT) จะพบสูงกว่าปกติ อย่างไรก็ตามการตรวจหน้าที่ของตับอาจจะไม่สามารถแยกโรคท่อน้ำดีตีบตันออกจากภาวะ severe neonatal hepatitis ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งหมดไม่สามารถที่จะบ่งชี้การเป็นโรคได้อย่างถูกต้องชัดเจน การตรวจวินิจฉัยที่ดีที่สุดคือการทำ intraoperation cholangiography (IOC) [7]

ตารางที่ 1 การตรวจวัดค่าทาง biochemical ในการคัดกรองผู้ป่วยที่มีอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน [12]

	Typical concentration at presentation	Normal range
Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	>100	<20
Alkaline Phosphatase (IU/L)	>600	<500
Gamma-glutamyl transferase (IU/L)	>100	20-40
Aspartate aminotransferase (U/L)	80-200	15-40
Alanine aminotransferase (U/L)	80-200	10-55
Albumin (g/L)	Normal at presentation	37-56
Prothrombin time (s)	Normal at presentation	9-13

การตรวจสอบทางด้านรังสีวิทยา การทดสอบทางอัลตราซาวนด์ (ultrasonography) เป็นการตรวจวินิจฉัยที่มีความรวดเร็วสามารถแสดงให้เห็นการปรากฏหรือไม่ปรากฏของถุงน้ำดีซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการบ่งชี้ภาวะของโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ นอกจากนี้ยังสามารถบอกการขาดหายไปหรือการหดตัวของถุงน้ำดี การขาดหายไปของ biliary ducts และการ

เพิ่ม echogenicity ที่เกิดขึ้นในตับ การตรวจด้วยวิธี ultrasonography สามารถที่จะใช้ในการบ่งชี้รูปแบบของโรค polysplenia (preduodenal portal vein, interrupted inferior vena cava (IVC)) การทำ ultrasonography เป็นการตรวจที่ใช้บ่อยที่สุดในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่เป็น cholestatic jaundice ซึ่งสามารถพบ cystic structure ในผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีโป่งพอง (choledochal cyst) หรือโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิดที่ 1 และการพบว่าถุงน้ำดีมีขนาดเล็กหลังจากการรับประทานนมลักษณะดังกล่าวบ่งบอกว่าผู้ป่วยไม่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน สำหรับลักษณะจำเพาะของโรคท่อน้ำดีตีบตันคือ พบก้อนสามเหลี่ยม (triangular cord) บริเวณขั้วตับ อย่างไรก็ตามมีข้อบ่งชี้ที่บ่งชี้คือการไม่พบลักษณะ intrahepatic bile duct dilatation ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ยังไม่ได้รับการผ่าตัดรักษา ผลการทดสอบทาง ultrasonography ร่วมกับอาการทางคลินิกและการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจะเป็นการบ่งบอกภาวะของโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ถูกต้องและมีความแม่นยำขึ้น [13]

การทำ Hepatobiliary scintigraphy ด้วย technetium-labelled isotope ร่วมกับอนุพันธ์ของ iminodiacetic acid (IDA) สารนี้เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดจะถูกจับโดย hepatocyte และขับถ่ายออกสู่ทางเดินน้ำดีและลำไส้เล็กส่วน duodenum วิธีนี้มีความแม่นยำค่อนข้างสูงสามารถวิเคราะห์ได้ว่า isotope ผ่านลงมาในลำไส้เล็กหรือไม่ ถ้าสาร isotope ผ่านลงมาในลำไส้ได้ก็มั่นใจได้ว่าผู้ป่วยที่ตัวเหลืองนั้นไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่ถ้าไม่พบสาร isotope ลงมาในลำไส้เล็กก็ยังไม่สามารถแยกโรค neonatal hepatitis ออกไปได้ เนื่องจากบางครั้งในภาวะที่หน้าที่ตับเสียไปมาก เช่น ในภาวะ severe neonatal hepatitis เซลล์ตับไม่สามารถกำจัดสาร isotope ลงมาในลำไส้เล็กได้มากพอที่จะถูกตรวจวัดได้ [13]

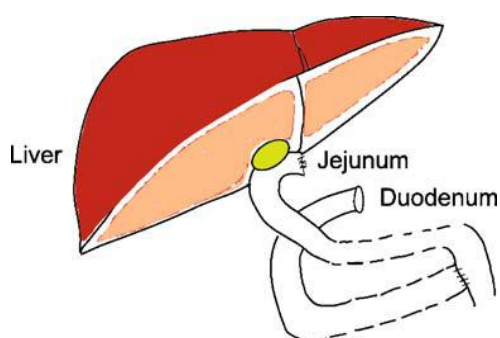
การทำ Intra-operative cholangiography (IOC) เป็นวิธีมาตรฐานในการยืนยันการวินิจฉัย ในกรณีที่การตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นข้างต้นไม่สามารถแยกโรค neonatal hepatitis ออกไปได้ การทำ IOC เป็นการผ่าตัดแบบ mini-exploratory laparotomy เพื่อฉีดสารทึบรังสีเข้าทางถุงน้ำดี ควรทำ coagulogram เพื่อประเมินสภาพของตับและการแข็งตัวของเลือดก่อนการผ่าตัด สำหรับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิดที่ 3 ซึ่งเป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุดประมาณร้อยละ 90 นั้นถุงน้ำดีมักจะมีขนาดเล็กจนไม่สามารถฉีดสารทึบรังสีได้แต่ในบางรายก็อาจเห็นถุงน้ำดีในภาพเอกซเรย์ ซึ่งไม่มีทางติดต่อกับทางเดินน้ำดีที่ตีบตัน ถ้าพบว่าผู้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจากการทำ IOC ศัลยแพทย์ก็อาจพิจารณาขยายแผลผ่าตัดเพื่อทำการผ่าตัดรักษาโรคทางเดินน้ำดีตีบตันต่อไปได้เลย

นอกจากนี้ยังมีการตรวจพิเศษอย่างอื่นอีกแต่ไม่ยังไม่เป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลาย เช่น การทำ serum lipoprotein-X, duodenal fluid aspiration, liver biopsy, endoscopic

retrograde cholangio-pancreaticography (ERCP) และ magnetic resonance cholangiopancreaticography (MRCP) [13]

การรักษาโรคท่อน้ำดีตีบตัน

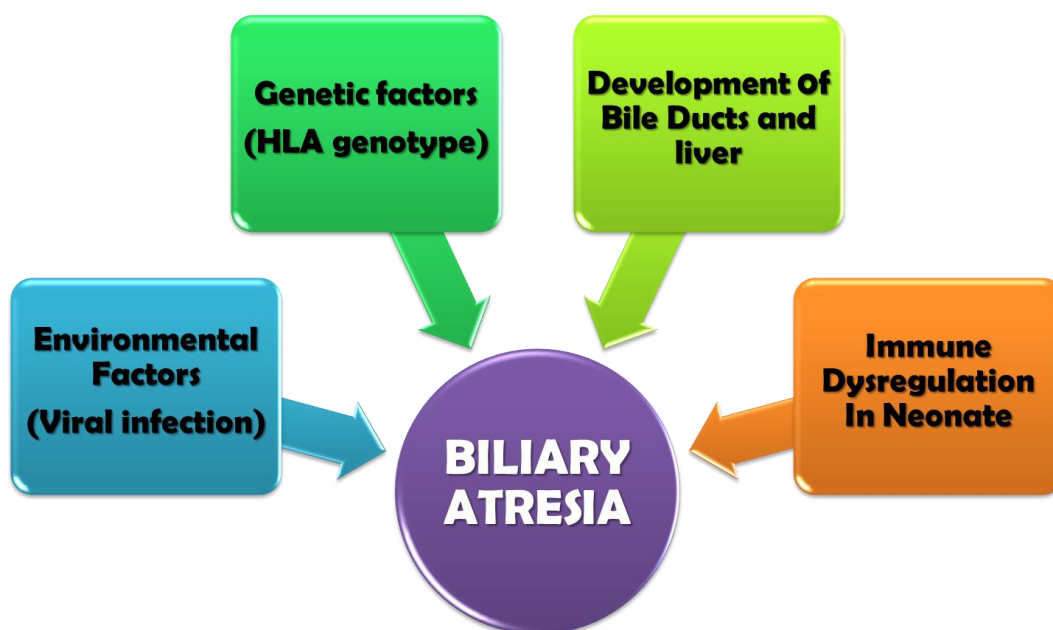
ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้องอาจทำให้เกิดภาวะตับวาย (liver failure) ภายใน 1-2 ปี การจัดการเพื่อรักษาผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันในปัจจุบันมี 2 ขั้นตอนด้วยกัน ในช่วงแรกผู้ป่วยจะได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซ ซึ่งจะเป็นการผ่าตัดและต่อลำไส้เข้ากับท่อน้ำดีเล็กที่ขั้วตับ (portoenterostomy, Kasai's operation) การผ่าตัดแบบคาไซได้เกิดขึ้นในช่วงปลายปี ค.ศ. 1959 โดยนายแพทย์ Morio Kasai ศัลยแพทย์ชาวญี่ปุ่น เมื่อเขาได้ทำการตรวจทาง microscopic ที่ท่อน้ำดีของเด็กทารกที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันทำให้เขาพบว่ามียูที่บริเวณ portal hepatis เป็นจำนวนมาก การเปิดรูเหล่านี้โดยการผ่าตัดเอาส่วนของ extrahepatic biliary ที่เกิดการตีบตันออกจะส่งผลให้มีการระบายน้ำดีให้ซึมออกมาได้ การผ่าตัดนี้จะส่งผลดีต่อผู้ป่วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งหากผู้ป่วยได้รับการรักษาภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด การผ่าตัดแบบคาไซนี้ปัจจุบันได้รับการยอมรับว่าเป็นการผ่าตัดที่ใช้เป็นมาตรฐานในการรักษาอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน อย่างไรก็ตามการผ่าตัดแบบคาไซเป็นการผ่าตัดเพื่อแก้ไขปัญหาท่อน้ำดีตีบตันในเด็ก แต่วิธีการนี้ไม่ใช่การรักษาเพื่อแก้ไขปัญหาท่อน้ำดีตีบตันในระยะยาว ดังนั้นการรักษาในขั้นตอนที่ 2 คือ การผ่าตัดปลูกถ่ายตับสำหรับใช้ในกรณีที่การรักษาแบบการผ่าตัดคาไซไม่ประสบผลสำเร็จ นอกจากนี้การผ่าตัดปลูกถ่ายตับเป็นวิธีการที่ใช้แก้ปัญหาการคั่งของน้ำดีที่เกิดร่วมกับการเกิดภาวะตับแข็ง สำหรับการผ่าตัดปลูกถ่ายตับนั้นมีปัญหาด้านค่าใช้จ่ายที่สูงและมีหน่วยบริการที่ค่อนข้างจำกัดทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากต้องเสียชีวิตเนื่องจากภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากภาวะตับแข็ง เช่น ภาวะเลือดออกจากรูเลือดชอดบริเวณหลอดอาหาร (esophageal varices) หรือ ตับวายจากการติดเชื้อ



รูปภาพที่ 2 ลักษณะการผ่าตัดแบบคาไซ (ด้านซ้าย) [1] ลักษณะบริเวณ portal hepatis ภายหลังจากการ transfection (ด้านขวา) [12]

สาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ในปัจจุบันสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันยังไม่สามารถที่จะอธิบายให้เกิดความกระจ่างได้ จากการศึกษาอย่างต่อเนื่องเชื่อว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเกิดจากปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกกรรมกันรวมไปถึงปัจจัยก่อนคลอดและหลังคลอดที่เป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดโรค โดยปัจจัยเหล่านี้จะเกิดขึ้นอย่างจำเพาะเจาะจงในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม คือระหว่างช่วงก่อนคลอดจนถึงอายุได้ 3 เดือนนับตั้งแต่แรกคลอด [14] ดังแสดงในรูปภาพที่ 3



รูปภาพที่ 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำให้เกิดโรคในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน [14]

รายงานการศึกษาบางชิ้นว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันไม่จัดเป็นโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม จากการศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง identical twins แบบ discordant พบว่ามีเพียง 1 ใน 2 ราย ในกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน (discordant) และการเกิดซ้ำของโรคท่อน้ำดีตีบตันในครอบครัวเดียวกันมีโอกาสเกิดขึ้นน้อยมาก [15-16] สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เป็นแฝดจำนวน 8 ราย พบว่าผู้ป่วยทุกรายที่เป็นแฝดจะเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันเพียง 1 ราย (discordant) โดยที่แฝดอีกคนมีลักษณะที่ปกติ ในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา มีแฝด 1 คู่ ที่มีลักษณะ dizygotic twin และแฝดจำนวน 6 คู่ พบว่ามีหมู่เลือด ABO หมู่เดียวกัน และแฝด 2 คู่ ในกลุ่มนี้พบว่ามีหมู่เลือด minor ที่เหมือนกัน (Dec, MM และ Le a-b-) สำหรับแฝดทารกคู่สุดท้ายได้พิสูจน์โดยใช้วิธี short tandem repeat (STR) ในพ่อ

แม่และแฝด พบว่าแฝดทั้ง 2 รายนี้ น่าจะเป็น monozygotic twin (โอกาสเกิดมากกว่าร้อยละ 99.99) ผลการศึกษาดังกล่าวสนับสนุนแนวคิดที่ว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่เกิดขึ้นหลังคลอดมากกว่าที่จะเป็นโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยตรง [17] แต่ถึงอย่างไรก็ตามปัจจัยทางพันธุกรรมก็อาจจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยเกิดร่วมกับปัจจัยในด้านอื่นๆ

ทฤษฎีเกี่ยวกับสาเหตุการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในปัจจุบันมี 6 ทฤษฎี ที่อธิบายปัจจัยของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน มีรายละเอียดดังนี้

Viral infection จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะเกิดจากการติดเชื้อหรือได้รับการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน infection agent [18] นอกจากนี้จากการศึกษาโดยได้ทำการทดลองฉีด virus เข้าไปในหนูที่เพิ่งเกิดใหม่เพื่อให้เกิดการติดเชื้อพบว่าหนูสร้าง lesion ที่คล้ายคลึงกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน [19] ในปี ค.ศ. 1974 Benjamin Landing [20] นักพยาธิวิทยาโรคเด็กได้เสนอแนวคิดที่ว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันจัดเป็นโรค idiopathic neonatal hepatitis และโรค choledochal cyst ซึ่งเป็นโรคที่มีผลจากการได้รับการบาดเจ็บที่บริเวณ hepatobiliary tree ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ Benjamin Landing ได้เสนอและคิดค้นคำว่า infantile obstructive cholangiopathies แต่อย่างไรก็ตามสิ่งที่ Benjamin Landing พบว่าสาเหตุของโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะเกี่ยวข้องกับโรคไวรัสตับอักเสบ แต่จากการศึกษาต่อมาพบว่าไวรัสตับอักเสบทั้งชนิด เอ บี และซี ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ทำให้ในปัจจุบันการศึกษาค้นหาสาเหตุของการเกิดโรคจึงมุ่งศึกษาที่ไวรัสชนิดอื่น

ในช่วงระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา cytomegalovirus (CMV) จัดเป็นไวรัสชนิดหนึ่งที่มีความสนใจ เนื่องจากนักวิจัยส่วนใหญ่เชื่อว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส CMV มีรายการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันส่วนใหญ่จะมีการติดเชื้อไวรัส CMV เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนกับเด็กที่มีสุขภาพดีไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน [30] นอกจากนี้ยังพบการศึกษา CMV antibody ในมารดาของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศสวีเดน และในประเทศแคนาดาที่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัส CMV ในตับของผู้ป่วยจำนวนครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่สามารถที่จะแสดงให้เห็นว่ามีไวรัส CMV อยู่ในบริเวณ bile duct atresia ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน [22] สำหรับบทบาทของไวรัส CMV กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันยังคงต้องได้รับการศึกษาต่อไป

นอกเหนือจากเชื้อ CMV แล้วเชื้อไวรัสที่ได้รับความสนใจอีก 2 ชนิด คือ เชื้อ reovirus และเชื้อ rotavirus สาเหตุที่เชื้อ reovirus ได้รับความสนใจเนื่องจากพบว่าเมื่อมีการติดเชื้อ reovirus จะทำให้เกิดการอักเสบบริเวณ intrahepatic bile duct และ extrahepatic bile

duct รวมไปถึงการติดเชื้อบริเวณอวัยวะระดับซึ่งลักษณะการอักเสบดังกล่าวคล้ายกับอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน [23] และรอย lesion ที่เกิดขึ้นจะยังคงแสดงให้เห็นอยู่ภายหลังจากการได้รับเชื้อ แม้ว่าจะไม่สามารถตรวจพบ antigen ของเชื้อ reovirus แล้วก็ตาม นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองตรวจพบ antigen ของเชื้อ reovirus ที่บริเวณ bile duct remnants ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน [24-25] และตรวจพบ antigen ของเชื้อ reovirus ในลูกลิง rhesus เช่นเดียวกัน [26] และจากการศึกษาของ Steele et al. [27] ที่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เพื่อดูการแสดงของ mRNA ของเชื้อ reovirus ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มตัวอย่างที่ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 14 ราย และทำการเปรียบเทียบการแสดงของ mRNA กับกลุ่มควบคุมจำนวน 16 ราย ด้วยวิธี nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลจากการศึกษาพบว่าไม่มีการแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ reovirus ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าผลการศึกษาที่แตกต่างนี้อาจจะมีสาเหตุเกิดจากวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อ ขั้นตอนในการสกัดอาร์เอ็นเอ และการเลือกใช้ PCR-primer ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนของเชื้อ reovirus ที่แตกต่างกัน และถ้าเชื้อ reovirus มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ในการศึกษาเชื้อไวรัสชนิดนี้จะต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีและมีความเหมาะสม รวมทั้งต้องมีเกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการศึกษาและจำนวนที่ใช้ในการศึกษาจะต้องมีปริมาณที่มากพอ

การศึกษาของ Riepenhoff-Talty et al. [28] ได้ทดลองนำเชื้อ rotavirus group A ฉีดเข้าไปในหนูเพื่อทำให้เกิดการติดเชื้อ ผลการทดลองพบการตีบตันของ extrahepatic bile duct ในหนูและลักษณะของเนื้อเยื่อของหนูคล้ายกับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ต่อจากนั้น Riepenhoff-Talty et al. ได้นำเอาเนื้อเยื่อบริเวณ hepatobiliary จากผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมาวิเคราะห์หาเชื้อ rotavirus group C ด้วยวิธี RT-PCR ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 10 ราย จากผู้ป่วยทั้งหมด 18 ราย พบการแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ rotavirus group C ซึ่งจะไม่พบการแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ rotavirus group C ในกลุ่มควบคุม [29]

นอกจากนี้ยังได้พบรายงานการศึกษาของ Drut et al [30] ที่ได้ทำการศึกษาเชื้อ human papilloma virus (HPV) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 18 ราย พบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการติดเชื้อ HPV จำนวน 16 ราย สำหรับในกลุ่มควบคุมไม่พบการติดเชื้อ HPV ซึ่งผลการศึกษาที่พบมีความแตกต่างจากการศึกษาของ Domiati Saad et al. [31] ที่ได้ทำการศึกษการติดเชื้อ HPV ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชาวอเมริกันจำนวน 19 ราย พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยไม่พบการติดเชื้อ HPV

Immune injury Schreiber และ Kleinman [32] ได้อธิบายว่าหากมีการติดเชื้อไวรัสหรือได้รับสารพิษที่บริเวณ biliary epithelium จะมีผลทำให้เกิดการแสดงออกของแอนติเจนที่

บริเวณ bile duct epithelium ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากปฏิกิริยาของ macrophage ที่ตอบสนองต่อการทำงานของ T lymphocyte เป็นสาเหตุที่ทำให้บริเวณ epithelial ได้รับความเสียหาย การที่พบระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ innate immunity และ acquired immunity ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันตั้งแต่แรกคลอดที่ใช้ในการตอบสนองต่อแอนติเจนบริเวณ bile duct epithelium ทำให้สามารถที่จะอธิบายได้ว่าเหตุใดโรคท่อน้ำดีตีบตันจึงเกิดภายใน 3 เดือนแรกของทารกแรกเกิด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง immune regulatory protein ที่ควบคุมเกี่ยวกับ susceptibility ของระบบภูมิคุ้มกันในโรคท่อน้ำดีตีบตันและในโรคตับที่มีสาเหตุเกี่ยวข้องกับการระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรค autoimmune hepatitis, primary sclerosing cholangitis และ primary biliary cirrhosis พบว่าโรคเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับ specific HLA antigen [33]

จากการศึกษาของ Silviara et al. [34] ได้พบว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในผู้ป่วยที่เป็นชาวยุโรปมีความสัมพันธ์กับ HLA-B12 haplotype A9-B5 และ haplotype A28-B35 โดยพบในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันประมาณร้อยละ 49 และในกลุ่มควบคุมประมาณร้อยละ 23 สำหรับผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เป็นชาวญี่ปุ่นพบความสัมพันธ์ในลักษณะ haplotype A33, B44 และ DR6 [35] แต่เมื่อทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นชาวสเปนไม่พบความสัมพันธ์ของระบบ HLA กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน [36] อย่างไรก็ตามการศึกษาด้านของระบบภูมิคุ้มกัน MHC molecule 1 และ MHC molecule 2 ยังเป็นการศึกษาที่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากมียีนที่เกี่ยวข้องกับ HLA มากกว่า 100 ยีนในระบบจีโนมของมนุษย์ เป็นไปได้ว่าอาจจะพบความสัมพันธ์ของ HLA ตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

Autoimmunity โรคท่อน้ำดีตีบตันอาจจะเป็นผลมาจากกระบวนการ autoimmune mediated process มีรายงานการศึกษาของ Vasiliauskas et al. [37] ที่ได้ทำการทดสอบ autoantibodies ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 11 ราย ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 10 ราย จะตรวจพบ antibody ชนิด IgG, IgA และ IgM ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันสูงกว่าในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ป่วยเด็กและผู้ใหญ่ที่ป่วยเป็นโรคตับชนิดอื่น ถัดมา Burch et al. [38] ได้ทำการศึกษา autoantibodies ในมารดาของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพื่อทำการทดสอบสมมติฐานที่คาดว่า การถ่ายทอด autoantibodies จากแม่ไปสู่ลูก อาจจะเกี่ยวข้องกับการที่ตับและ bile duct ได้รับความเสียหาย ผลจากการศึกษาพบว่าระดับ titer ของ anti-Rho antibodies ในมารดาของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีระดับที่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมสำหรับ Rho protein เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด actin organization, gene expression และ cell cycle progression และสามารถพบระดับ titer ของ anti-Rho antibodies ต่ำในมารดาของผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรคตับชนิดอื่นด้วยเช่นกัน ผลจากการศึกษาสรุปได้ว่าการถ่ายทอดระบบภูมิ

คุมกันจากมารดาสู่ทารกที่เกี่ยวข้องกับระบบ immune-mediated bile duct injury อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่อย่างไรก็ตามข้อสรุปนี้ก็ยังไม่ได้รับการยืนยันแน่ชัด

สิ่งที่น่าสนใจเมื่อปัจจัยเสี่ยงในเรื่องของ autoimmunity มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ซึ่งทำให้สามารถทำนายความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคในแต่ละบุคคลได้โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ autoimmune disorder ได้ โดยมีรายการการศึกษาของ Bernal et al. [39] ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีน transforming growth factor beta (TGF- β) พบว่าลักษณะ polymorphism ในยีน TGF- β มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการเกิดโรค primary sclerosing cholangitis ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาใน 2 ปีถัดมาของ Mitchell et al. [40] ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TGF- β ในกลุ่มผู้ป่วยโรค primary sclerosing cholangitis ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Bernal et al. นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Donaldson et al. [41] พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน interleukin-1 family เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วย primary biliary cirrhosis และจากการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมบริเวณ promotor ของยีน TGF- β , IL-1 (IL1B และ IL1RN) และ IL-10 โดยใช้ดีเอ็นเอของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชาวอังกฤษจำนวน 101 ราย และทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจำนวน 96 ราย ผลการศึกษาพบว่าลักษณะจีโนไทป์, อัลลีล และ haplotype block ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม [42]

ผลจากการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TGF- β และ interleukin family อาจจะไม่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยทาง autoimmune ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทำให้นักวิจัยเชื่อว่าน่าจะมี immunoregulatory gene ตัวอื่นที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสาเหตุของการเกิด biliary tract injury

Vascular etiology สมมติฐานนี้เกิดจากการทดลองของ Pickett et al. [43] จากแนวความคิดของ Pickett ที่เชื่อว่าระบบ intrahepatic bile duct และ extrahepatic bile duct ซึ่งได้รับเลือดจากระบบหมุนเวียนเลือดของ hepatic artery ดังนั้นถ้าหากระบบ hepatic artery ได้รับความเสียหายอาจจะส่งผลทำให้เกิด hepatic arterial ischemia ได้ จากแนวคิดดังกล่าว Pickett et al. จึงได้ทำการทดลองในแกะโดยทำการผูก hepatic vessels ของแกะในระยะ fetus เป็นผลทำให้แกะมีการคั่งของน้ำดี ผลที่ได้สอดคล้องกับการสังเกตลักษณะบริเวณ extrahepatic biliary tree ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบว่าผู้ป่วยมีความผิดปกติของแขนงหลอดเลือด hepatic artery จากการสังเกตดังกล่าว Pickett et al. ได้อธิบายว่าความผิดปกติของหลอดเลือด

เลือดมีผลทำให้เกิด lesion ขึ้นในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่กระบวนการเกิด lesion ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน

Defective morphogenesis เป็นความผิดปกติของ biliary tree ที่เกิดจากกระบวนการ morphogenesis โดยจะพบความผิดปกติดังกล่าวในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันประเภท fetal form และจากการศึกษาการกลายพันธุ์ในยีนของหนูพบความผิดปกติของ visceral organ symmetry ในโรค polysplenia syndrome และโรคท่อน้ำดีตีบตัน เนื่องจากเกิดการ recessive insertional mutation บริเวณ proximal ในโครโมโซมคู่ที่ 4 และเกิดการกลายพันธุ์แบบ complete deletion ในยีน INV ในหนูทดลองมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของ hepatobiliary system จากสาเหตุดังกล่าวทำให้ Schon et al. [44] ได้ทำการวิเคราะห์ยีน INV ในมนุษย์ผลการศึกษาพบว่าไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน INV ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน INV ไม่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

สำหรับการศึกษาของ Bamford et al. [45] ที่ได้ทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด situs defect พบว่ายีน CFC1 ซึ่งจะถอดรหัสเป็นโปรตีน CRYPTIC เกิดการกลายพันธุ์ลักษณะ heterozygous mutations ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีลักษณะอาการของโรค polysplenia syndrome เกิดร่วมด้วย ในเวลาถัดมา Jacquemin et al. [46] ได้ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน CFC1 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดจำนวน 2 ราย ซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยที่เป็น laterality defect และผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ผลการวิเคราะห์พบว่ามี การกลายพันธุ์ของยีน CFC1 ลักษณะ heterozygous gene mutation โดยได้รับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากมารดาที่มีสุขภาพดี จากลักษณะดังกล่าว Jacquemin จึงได้ข้อสรุปว่ายีน CFC1 มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรค แต่ถึงอย่างไรสาเหตุของการเกิดโรคประกอบด้วยหลายปัจจัยทั้งจากสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางพันธุกรรมที่ช่วยส่งเสริมทำให้เกิดโรค

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ Kohsaka et al. [56] ที่ได้ทำการศึกษาบทบาทของยีน JAGGED1 ที่แสดงออกต่อ ductal plate epithelia และ HNF6 สำหรับ ยีน JAGGED1 จัดเป็น nuclear transcription factor ที่แสดงออกในช่วงการพัฒนา extrahepatic bile duct และ gall bladder ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 9 ราย จากทั้งหมด 102 ราย มีการกลายพันธุ์ของยีน JAGGED1 ในลักษณะ missense mutations ซึ่งพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวจะมีอาการที่แยกว่าผู้ป่วยที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว การทดสอบถัดมาของ Clotman et al. [48] เขาได้ทำการ knockout ยีน Hnf6 ในหนูพบว่าหนูจะเกิดความผิดปกติของ hepatic artery

Toxin exposure จากการศึกษาของ Herper et al. [47] ที่ได้ทำการสังเกตการเกิด outbreak ของโรคท่อน้ำดีตีบตันในแกะพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันจะเกี่ยวข้องกับสารพิษหรือเชื้อราที่สัตว์เหล่านี้ได้รับจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งสารพิษหรือเชื้อต่างๆจะมีผลทำให้ชั้นของ bile duct epithelia ที่อยู่ในชั้น submucosa ได้รับบาดเจ็บแล้วส่งผลทำให้เกิดการทำลายบริเวณ extrahepatic bile ducts

สำหรับทฤษฎีที่อธิบายสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันสามารถสรุปรายละเอียดดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปัจจัยต่างๆที่เป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

Theory of biliary atresia
Virus infections : reovirus, rotavirus, retrovirus, cytomegalovirus, human papilloma virus
Immune injury : immune dysregulation
Autoimmune mechanism : innate immunity, acquired immunity, and HLA antigen
Vascular etiology : lesion/ateriopathy
Defective morphogenesis
<u>Inherited mutations</u>
Laterality genes (presumed), associated with polysplenia and asplenia syndromes (CFC-1 gene)
Ductal plate malformation (HNF-6 gene)
Jagged-1 gene
<u>Somatic mutation</u>
<u>Modifier genes</u>
Toxin exposure : environmental factor and toxin

การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

การศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุได้ว่าปัจจัยใดเป็นสิ่งที่กระตุ้นทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรค เนื่องจากโรคท่อน้ำดีตีบตันประกอบด้วยปัจจัยหลายอย่างทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอกหรือปัจจัยที่เกิดจากลักษณะทางพันธุกรรม จากงานการศึกษาที่ผ่านมาได้พบว่ามีข้อมูลการทดลองจำนวนมากที่ทำการวิเคราะห์หาปัจจัยทางพันธุกรรมกับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

กระบวนการอักเสบเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการตีบตันของท่อน้ำดีและการที่ท่อน้ำดีเกิดการตีบตันนั้นจะมีผลทำให้ท่อน้ำดีมีการคั่งสะสมในตับและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพังผืดสะสมในตับ (liver fibrosis) นำไปไปสู่การเกิดภาวะตับแข็ง (cirrhosis) ซึ่งเป็นอาการแทรกซ้อนที่ตามมาภายหลังของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยจึงพยายามทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในยีนที่มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการอักเสบกับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

จากตัวอย่างการศึกษาของ Arikan et al. [50] ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน MIF สำหรับยีน macrophage migration inhibitory factor (MIF) มีคุณสมบัติในการเป็น pleiotrophic lymphocyte และ macrophage cytokine ที่มีบทบาทสำคัญในระบบ innate immunity ซึ่งจะพบการแสดงออกของยีน MIF เพิ่มขึ้นในโรคที่มีสาเหตุเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ด้วยเหตุนี้ Arikan et al. จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน MIF ที่บริเวณ 173G/C ซึ่งอยู่ในส่วนของ promoter โดยทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 18 ราย เพื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรค chronic liver disease จำนวน 37 ราย และในกลุ่มควบคุมจำนวน 103 ราย ผลจากการศึกษาพบว่าอัลลีล C อาจมีความสัมพันธ์กับการป้องกันการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน เนื่องจากไม่พบลักษณะจีโนไทป์ CC ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน เนื่องจากอัลลีล C อาจมีผลไปเพิ่มการแสดงออกของยีน MIF ในการกระตุ้น protein 4 ที่อยู่ในส่วนของ promoter นอกจากนี้ อัลลีล C อาจจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับภาวะ steroid resistance ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะ idiopathic nephrotic syndrome ถึงแม้ว่าในการศึกษาคั้งนี้ Arikan et al. ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัลลีล C ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับในกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน MIF กับโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการทำงานของ steroid hormone ภายหลังจากที่ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซ

ในระยะเวลา 2 ปีถัดมา Arikan et al. [51] ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน ICAM-1 กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน สำหรับยีน ICAM-1 จัดเป็น adhesion molecules ที่มีความสำคัญต่อการกระตุ้น T-cell โดยที่ ICAM-1 จะจับกับ LFA-1 เพื่อช่วยเสริมให้การจับกันระหว่าง CD2 บนผิว T-cell กับ LFA-3 บนผิว APC ได้แน่นขึ้น lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการอักเสบเนื่องจาก monoclonal antibody ต่อ LFA-1 สามารถยับยั้งการกระตุ้นเซลล์ได้ทั้ง naive และ activated T-cell เป็นต้น ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของโมเลกุล ICAM-1 อาจจะมี ความสัมพันธ์กับการความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน เนื่องจาก ICAM-1 สามารถกระตุ้น

ระบบภูมิคุ้มกันและกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคท่อน้ำดีตีบตัน ด้วยเหตุนี้ Arikan et al. จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมยีน ICAM-1 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 19 ราย และผู้ป่วยโรค chronic liver disease จำนวน 38 ราย สำหรับในกลุ่มควบคุมคือ ผู้ที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงจำนวน 123 ราย ผลจากการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน ICAM-1 ที่บริเวณ G242R ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะพบการกระจายตัวของอัลลีล A มีความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรค chronic liver disease และในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในทางตรงข้ามการกระจายตัวของอัลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีความถี่ที่ต่ำกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรค chronic liver disease และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากข้อมูลดังกล่าว Arikan et al. จึงสรุปว่าอัลลีล A ของยีน ICAM-1 มีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่อย่างไรก็ตามสาเหตุของการเกิดโรคก็ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากปัจจัยทางด้านพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวไม่สามารถสรุปได้ว่าสาเหตุของโรคเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว

ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 Lee et al. [52] ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน vascular endothelium growth factor (VEGF) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 45 ราย, สมาชิกในครอบครัวของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 40 ครอบครัว และกลุ่มควบคุมจำนวน 160 ราย สำหรับยีน VEGF เป็นยีนที่มีบทบาทในการกระตุ้นกระบวนการเกิด vasculogenesis และ angiogenesis นอกจากนี้ยังพบว่ายีน VEGF มีผลต่อการเพิ่มการ migration และการแบ่งตัวของ endothelial cell ด้วย ผลการวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ CC และอัลลีล C ที่ตำแหน่ง +936 มีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และพบการกระจายของจีโนไทป์ CC และอัลลีล C ที่ตำแหน่ง +936 ในกลุ่มสมาชิกครอบครัวของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการศึกษาครั้งนี้ Lee et al. จึงได้อธิบายว่าลักษณะทางพันธุกรรมในยีน VEGF ที่บริเวณ +936 ลักษณะจีโนไทป์ CC และอัลลีล C จะมีผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน และลักษณะดังกล่าวอาจจะมีการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมทางสายเลือดด้วย

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่ามีงานวิจัยมากมายที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมของยีนต่างๆกับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน การอักเสบที่เกิดขึ้นในตับมีผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน เพราะฉะนั้นด้วยเหตุนี้จึงเชื่อว่าสาเหตุส่วนหนึ่งในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะมีความสัมพันธ์กับการอักเสบที่เกิดขึ้นที่ตับ เนื่องจาก

กระบวนการดังกล่าวจะส่งผลทำให้ไปขัดขวางการไหลของน้ำดีทำให้เกิดการคั่งของน้ำดีและก่อให้เกิดพังผืดสะสมในตับ จากเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ถึงแม้ว่าโปรตีน adiponectin จะเป็นโมเลกุลที่บทบาทเกี่ยวกับการควบคุมระดับฮอร์โมน insulin และการเผาผลาญไขมันในร่างกายแต่ก็มีรายงานการศึกษาพบว่า adiponectin มีบทบาทที่สัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบและการเกิดพังผืดสะสมในตับด้วย

Adiponectin

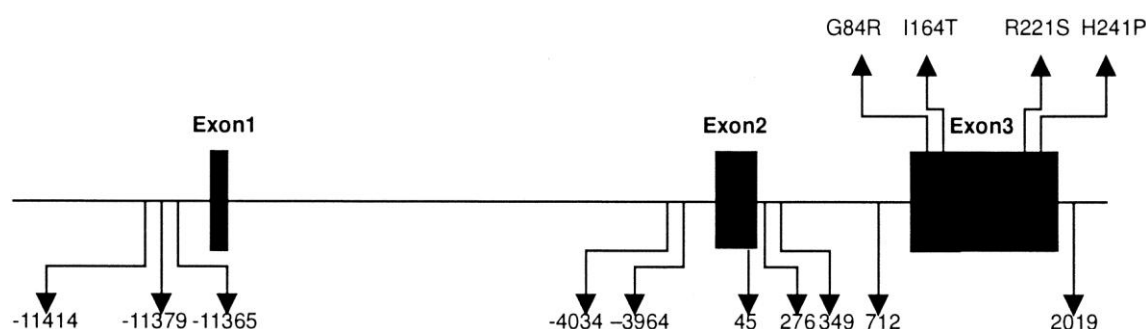
โปรตีน adiponectin เป็นสารที่หลั่งออกมาจากเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) จัดอยู่ในกลุ่ม adipocytokines ทำหน้าที่เสมือนเป็นฮอร์โมนชนิดหนึ่ง adiponectin มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับกระบวนการเผาผลาญไขมันในร่างกาย นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมและปรับการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินให้มีความเหมาะสมซึ่งจะตอบสนองต่อภาวะ insulin sensitivity ได้เป็นอย่างดี โปรตีน adiponectin มีบทบาทในการต่อต้านปฏิกิริยาการอักเสบ (anti-inflammation) ที่เกิดขึ้น, ต่อด้านภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว (anti- atherosclerosis) และมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะพังผืดสะสมในตับด้วย [53]

สำหรับการค้นพบยีน adiponectin ในมนุษย์นั้นได้ทำการทดลองโดยการโคลนยีนจาก adipose tissue ต่อจากนั้นจะทำการศึกษาลำดับเบสใน adipose tissue ซึ่งบริเวณที่จะพบความถี่ของลำดับเบสในยีนนั้นจะต้องทำการศึกษาในขั้นตอนของกระบวนการ transcription ก่อนที่จะที่ยีนจะเกิดกระบวนการ translation ออกมาเป็นโปรตีน และโปรตีนที่ถูกแยกออกมาจากซีรัมจะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการไปจับกับ gelatin จึงได้ตั้งชื่อว่า gelatin-binding protein of 28 kDa (GBP28) ภายหลังจากการค้นพบยีน adiponectin ในปีค.ศ. 1995 ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับยีน adiponectin ออกมาให้ทำการศึกษาเป็นจำนวนมาก ผลจากรายงานการศึกษาพบว่า adiponectin มีความสัมพันธ์กับโรคอ้วนโดยพบว่าความอ้วนจะส่งผลให้ระดับของ adiponectin ลดต่ำลงและเป็นปัจจัยเสี่ยงในการนำไปสู่โรคเบาหวานประเภทที่ 2 (Type 2 diabetic) และโรคหลอดเลือดและหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease, CAD) และในปี ค.ศ. 1999 ได้มีการศึกษากระบวนการต่อต้านภาวะหลอดเลือดหัวใจแข็งตัว (antiatherosclerotic) จากการศึกษาบทบาทของ adiponectin แสดงให้เห็นว่า adiponectin จะไปยับยั้งการเกาะติดของโมเลกุล monocyte ที่ aortic endothelial cell และจะไปหยุดกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ macrophage ในการสร้าง foam cell ต่อมาก็ได้มีการค้นพบความผิดปกติของ vascular ในหนูที่มีภาวะพร่อง adiponectin โดยลักษณะดังกล่าวจะมีผลต่อการแบ่งตัวของ vascular smooth

muscle cells ทำให้หลอดเลือดแดงเกิดความผิดปกติ เวลาถัดมาในปีค.ศ. 2001 ได้มีการศึกษาในผู้ป่วยโรคอ้วนพบว่าระดับของโปรตีน adiponectin ในเลือดที่ลดลงนั้นมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคอ้วน (obese) และภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน (insulin resistance) ซึ่งจะนำไปสู่โรคเบาหวานประเภทที่ 2 (type 2 diabetic, T2D) เป็นที่น่าสังเกตว่าสมมติฐานหลักที่สนับสนุนว่าระดับ adiponectin ในเลือดที่ต่ำลงนั้นจะมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อความไวของอินซูลิน (insulin sensitivity) ซึ่งการแสดงออกของ adiponectin ในหนูที่ได้รับการ knock out ยีน adiponectin จะเกี่ยวข้องกับระบบเมตาบอลิซึมผลการศึกษาสอดคล้องกับสมมติฐานดังกล่าว [53]

การแสดงออกของ adiponectin ถูกควบคุมโดยสารหลายชนิด เช่น insulin, corticoids, catecholamines, adhesive molecules, cytokine, adipocytokines, estrogens, androgens, prolactin, IGF-1, และ PPAR-gamma เป็นต้น [54]

Adiponectin ถูกถอดรหัสออกมาจากยีน APM1 หรือ ACDC หรือ ADIPOQ โดยตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ตำแหน่ง 3q27 ซึ่งจะประกอบไปด้วย 3 exons ที่บริเวณ exon 1 และบริเวณ exon 2 อยู่ในตำแหน่งที่ 76 และ 222 bp ตามลำดับ และที่ตำแหน่งตรงกลางระหว่าง 2 exon นี้จะเป็นส่วนของ intron 1 ขนาดประมาณ 10.30 kb สำหรับบริเวณ exon 3 มีขนาดประมาณ 4.28 kb เมื่อเริ่มเกิดกระบวนการ translation จะเริ่มจากบริเวณ exon 2 ไปจนถึงปลายด้านที่สิ้นสุดของบริเวณ exon 3 [55]

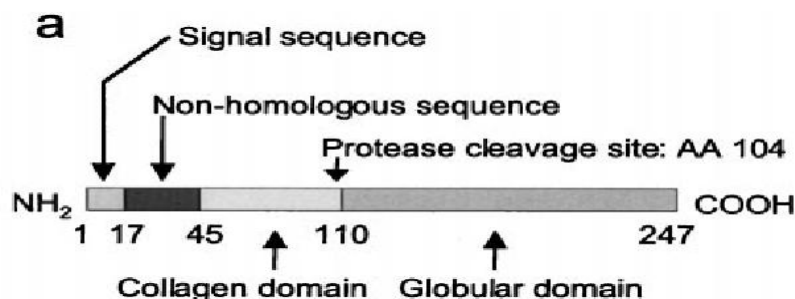


รูปภาพที่ 4 ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของยีน adiponectin [55]

โครงสร้างระดับโมเลกุลของ adiponectin

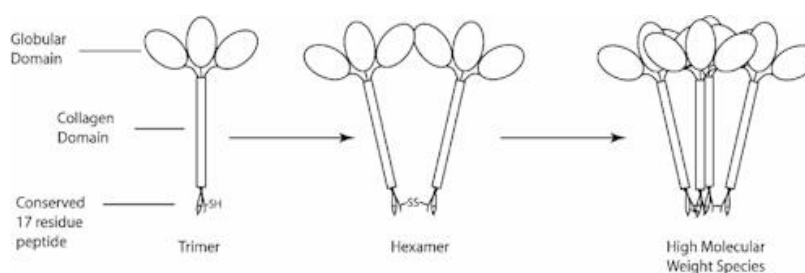
Adiponectin เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 30 kDa มีลำดับเบสอยู่บนยีน APM1 ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวน 247 amino acid [57] โมเลกุล adiponectin ประกอบด้วย 4 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 เป็นลำดับกรดอะมิโนที่รับสัญญาณอยู่ด้าน N-terminal, ส่วน

ที่ 2 เป็น hypervariable region สั้น ๆ, ส่วนที่ 3 เป็น collagenous domain และส่วนสุดท้ายเป็น globular domain อยู่ทางด้าน C-terminal [58] ดังแสดงในรูปภาพที่ 5



รูปภาพที่ 5 ลักษณะของโครงสร้างของ adiponectin [58]

ลักษณะโครงสร้างของ adiponectin จะมีรูปร่างคล้ายกับ complement 1q และ collagen VIII และ collagen X แต่เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างในรูปแบบ 3 มิติ พบว่ามีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของ tumor necrosis factor- α (TNF- α) โดยอยู่ในรูปของ homomultimer โครงสร้างพื้นฐานของ adiponectin จะอยู่ในรูป homotrimer ประกอบด้วย subunit ขนาด 30 kDa จำนวน 3 subunit โดยรูปร่าง trimer จะมีขนาดพอดีกับร่อง disulfide bond ที่อยู่ในส่วน collagen ของ monomer เมื่อ monomer แต่ละอันรวมตัวกันจะกลายเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้นเหมือนช่อดอกไม้ เรียกว่า low-molecular weight (LMW) ซึ่งก็คือโครงสร้างที่เรียกว่า hexamer มีขนาด 180 kDa ถ้า monomer จำนวน 16 – 18 monomer มารวมกันจะมีลักษณะโครงสร้างที่เรียกว่า high molecular weight (HMW) มีขนาดมากกว่า 400 kDa [58] ดังแสดงในรูปภาพที่ 6



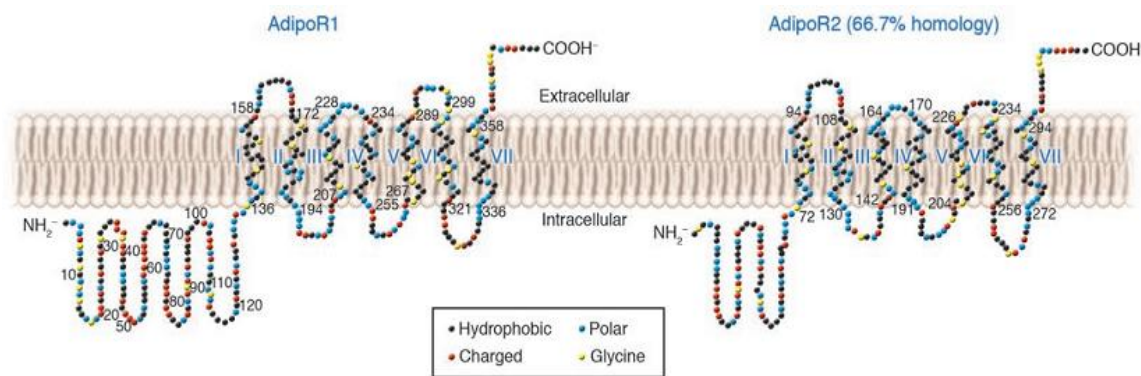
รูปภาพที่ 6 การรวมตัวกันของโมเลกุล adiponectin ในรูปแบบต่าง ๆ [58]

Adiponectin และ adiponectin receptor

การทำงานของ adiponectin จะต้องเกิดจากการจับกันระหว่างโมเลกุลของ adiponectin กับ adiponectin receptor เพื่อกระตุ้นให้เกิดตอบสนองต่อกระบวนการต่างๆ

ภายในเซลล์เป้าหมาย สำหรับการศึกษเกี่ยวกับ adiponectin receptor พบว่ามีโครงสร้างอยู่ 2 แบบ คือ adipoR1 และ adipoR2 โดยที่ adipoR2 จะมีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ AdipoR1 คือประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณร้อยละ 67 เช่นเดียวกัน สำหรับ adipoR1 อยู่บนโครโมโซม 1p36.13-q41 จะพบว่าในกล้ามเนื้อลายจะมีการแสดงออกของ adipoR1 สูงในอวัยวะอื่นๆ สำหรับ adipoR2 อยู่บนโครโมโซม 12p13 และพบการแสดงออกของ adipoR2 ส่วนใหญ่ในระดับ จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่า adiponectin receptor นั้นจะมีแสดงออกใน β -cell ของตับอ่อนซึ่งมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อภาวะ insulin sensitivity การควบคุมการแสดงออกของ adiponectin receptor พบว่าอาจจะถูกควบคุมโดยกรดไขมันในร่างกาย นอกจากนั้นยังพบว่า growth hormone มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ adipoR2 ในเซลล์ 3T3-L1 adipocyte ด้วย

Adiponectin receptors ทั้ง adipoR1 และ adipoR2 จะอยู่ในรูปของ integral membrane protein โดยที่ปลายด้าน N-terminal จะอยู่ในส่วนของ internal membrane และปลายด้าน C-terminal จะอยู่ในส่วนของ external membrane ดังแสดงในรูปภาพที่ 7 ซึ่งมีลักษณะตรงข้ามกับถ่ายภาพโมเลกุลของ G-protein coupled receptors ที่ได้มีรายงานไว้ว่าทั้ง adipoR1 และ adipoR2 จะมีลักษณะโครงสร้างแบบ homomultimers และ heteromultimers

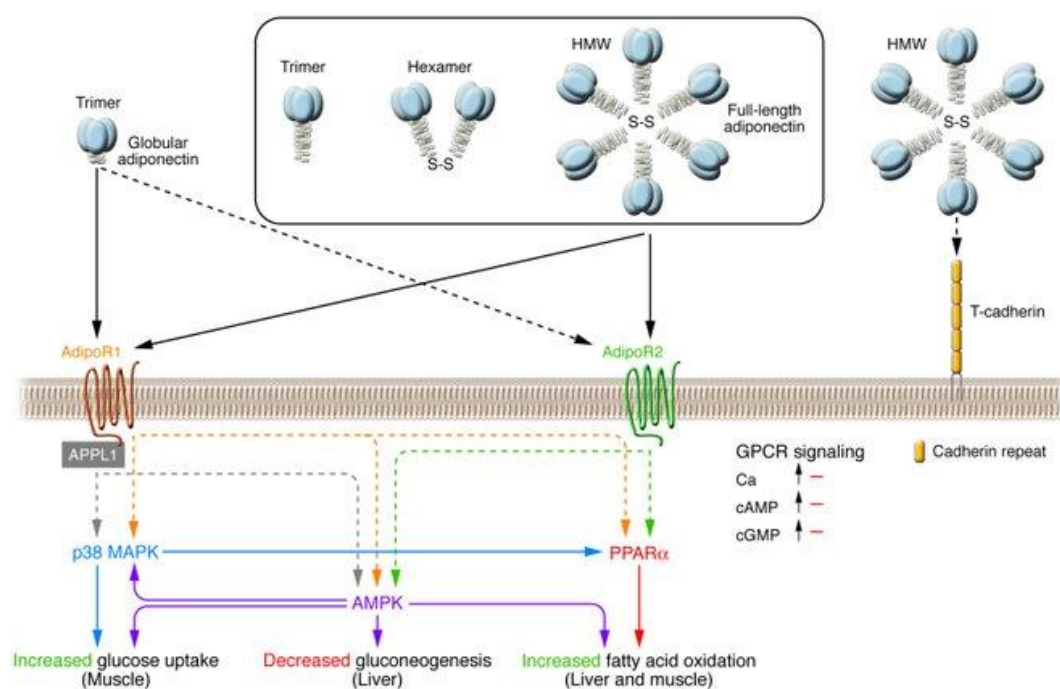


รูปภาพที่ 7 ลักษณะโครงสร้างของ adiponectin receptors (adipoR1 และ adipoR2) [59]

ต่อจากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย scatchard plot พบว่า adipoR1 เป็น receptor ที่มีความจำเพาะกับ globular adiponectin และ adipoR2 ก็จะเป็น receptor ที่มีความจำเพาะสำหรับ full-length adiponectin ข้อสรุปดังกล่าวเกิดจากการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของ adipoR1 ด้วย small interfering RNA (siRNA) ซึ่งพบว่า adipoR1 มีผลไปกระตุ้น

กระบวนการ fatty-acid oxidation เมื่อจับกับ globular adiponectin และ adipoR2 จะมีผลไปกระตุ้นกระบวนการ fatty-acid oxidation เมื่อจับกับ full-length adiponectin

เมื่อ adiponectin จับกับ adiponectin receptors ทั้ง adipoR1 และ adipoR2 จะมีผลไปกระตุ้นการทำงานของ AMPK, กระตุ้นการทำงานของ PPAR- α ligand, กระตุ้นกระบวนการ fatty-acid oxidation ในตับและกล้ามเนื้อลาย, กระตุ้นกระบวนการ glucose uptake ในกล้ามเนื้อลาย นอกจากนี้ยังมีผลไปยังกระบวนการ gluconeogenesis ในตับ ดังแสดงในรูปภาพที่ 8



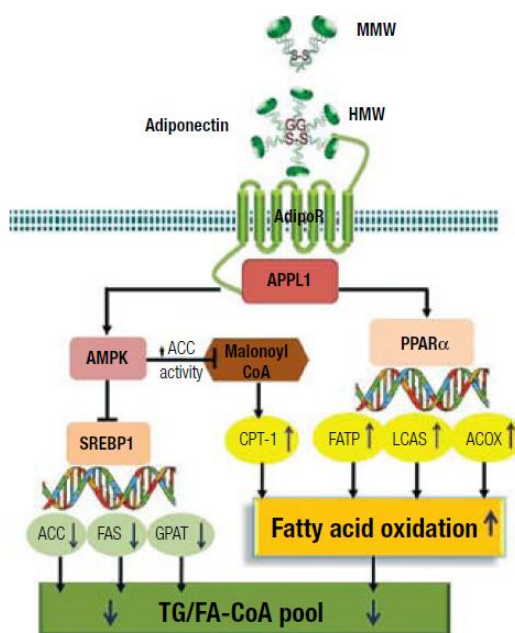
รูปภาพที่ 8 การส่งสัญญาณของ adiponectin receptors (adipoR1 และ adipoR2) [60]

กลไกการแสดงออกทางชีวเคมีของ adiponectin

Adiponectin กระตุ้น adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK): การทำงานของ adiponectin สามารถเพิ่มกระบวนการสลายของกรดไขมัน และลดกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยการกระตุ้นผ่าน AMP-activated protein kinase (AMPK) เมื่อ AMPK ถูกกระตุ้นจะมีผลไปกระตุ้นกระบวนการ phosphorylation ของ acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) เมื่อ ACC ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจะไปลดการสร้าง malonyl-CoA มีผลยับยั้ง

allosteric inhibitor ของ carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1) และไปเพิ่มการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายกรดไขมัน เป็นต้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะมีผลไปเพิ่มกระบวนการสลายกรดไขมัน ทำให้ระดับของ triglyceride ที่สะสมในกล้ามเนื้อและในตับลดน้อยลง [61]

Adiponectin กระตุ้น PPAR- α : peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR- α) เป็น transcription factor ที่ควบคุมขั้นตอนการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสลายกรดไขมัน เช่น FATP, acyl-CoA oxidase (ACOX) และ long chain acyl-CoA synthetase (LCAS) เป็นต้น เมื่อ PPAR- α ที่ถูกกระตุ้นโดย adiponectin จะมีผลไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันและไปเพิ่มกระบวนการสลายกรดไขมันได้ นอกจากนั้นการกระตุ้น PPAR- α จะสามารถป้องกันการเกิดภาวะไขมันสะสมในตับ (hepatic steatosis) ได้อีกด้วย [61]



รูปภาพที่ 9 การส่งสัญญาณของ adiponectin ที่กระตุ้นการทำงานของ AMPK และ PPAR- α [61]

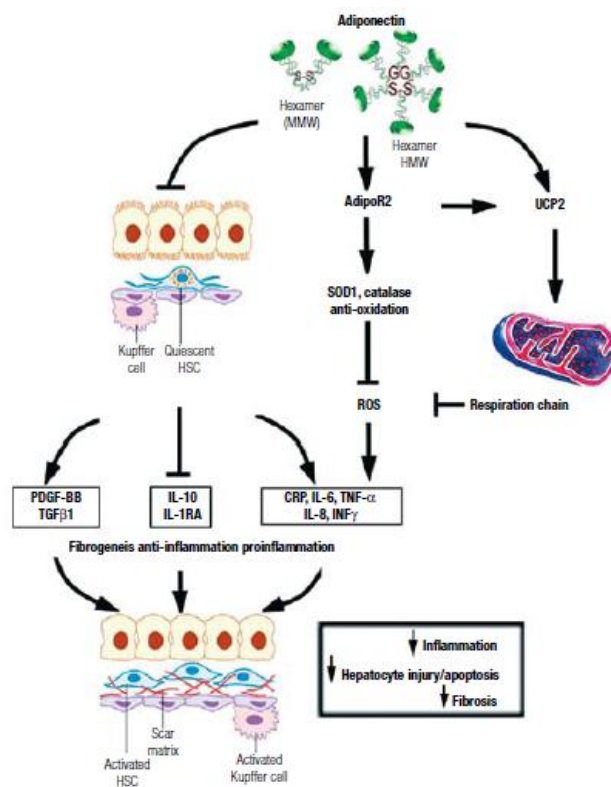
Adiponectin กับบทบาท anti-inflammation : เนื่องจาก adiponectin มีผลไปยับยั้งการทำงานของ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) โดยไปยับยั้งกระบวนการ I κ B phosphorylation ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ nuclear factor- κ B pathway สำหรับการอักเสบของ endothelial cell จะตอบสนองผ่าน cAMP-protein kinase A และ NF- κ B pathway การสะสม

ของ cAMP และถูกยับยั้งโดย adenylyl cyclase และ protein kinase A (PKA) inhibitors กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นโดยมี TNF- α เป็นตัวกลางในการกระตุ้น นอกจากนี้ adiponectin จะไปลดการเกาะติดของโมเลกุลภายในเซลล์ของ molecule-1 และการเกาะติดของ E-selectin โดยมีผลไปยับยั้งการทำงานของ TNF- α ด้วยการไปยับยั้งกระบวนการ I κ B phosphorylation ซึ่งเกี่ยวข้องกับ nuclear factor- κ B โดยที่ adiponectin จะไปยับยั้งการเกาะติดของ monocyte ใน endothelial cell [62]

นอกจากนี้ Adiponectin จะไปลดการแสดงออกของ scavenger receptor class A-1 ของ macrophage ผลก็คือทำให้ไปลดการนำ oxidized LDL เข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง สำหรับบทบาทของ adiponectin กับ anti-inflammation ยังเกี่ยวข้องกับ Toll-like receptor-4 (TLR-4) signaling pathway ใน macrophage ซึ่งมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของ Toll-like receptor-4 (TLR-4) แต่กลไกการทำงานยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน adiponectin สามารถยับยั้งการสร้าง cytokine ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ เช่น TNF- α , interleukin-6 (IL-6) เป็นต้น ทั้ง TNF- α และ IL-6 เป็น cytokine ที่หลั่งมาจาก hepatic stellate cell (HSC) โดยเกิดจากการกระตุ้นของ lipopolysaccharide (LPS) ร่วมกับการทำงานของ interleukin-10 (IL-10) กระบวนการเกิด transformation ของ HSC ใน myofibroblasts เป็นกุญแจสำคัญในขั้นตอนการเริ่มต้นกระบวนการสร้างพังผืดระหว่างที่ตับได้รับความเสียหาย การกระตุ้นของ HSC จะมีผลทำให้ไปเพิ่มการสะสมของเซลล์ใน extracellular matrix ซึ่งการแสดงออกของ adiponectin receptor ทั้ง adipoR1 และ adipoR2 ใน extracellular matrix ก็จะมีเพิ่มขึ้นด้วย จากกระบวนการดังกล่าวส่งผลทำให้เกิดการอักเสบเกิดขึ้นที่ตับและทำให้เกิดการสร้างพังผืดสะสมในตับ [61]

บทบาทของ adiponectin ที่มีผลต่อ mitochondria : จากการศึกษาของ Zhou et al. [63] พบว่าในหนูที่มีภาวะพร่อง adiponectin จะมีการสะสมของไขมันเพิ่มมากขึ้นภายใต้สภาวะที่ปกติ สิ่งที่พบชี้ให้เห็นว่าการเกิดภาวะไขมันสะสมในตับ (hepatic steatotic) อาจจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนใน mitochondria ที่ทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ adiponectin มีบทบาทในการช่วยซ่อมแซมระบบการทำงานของ mitochondria respiratory chain (MRC) สำหรับโมเลกุลใน MRC จะมีบทบาทโดยตรงในการควบคุมระบบ intracellular ROS activities, ป้องกันการสะสมของไขมัน และยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ในตับ การลดลงของ MRC จะมีผลไปเพิ่มการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ซึ่งจัดเป็นอนุมูลอิสระที่สำคัญต่อร่างกายมีบทบาทในการทำลายโมเลกุลและโครงสร้างของเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกับโมเลกุล ROS ปฏิกริยาที่สำคัญคือ ปฏิกริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับสายของกรดไขมันที่อยู่ผนังเซลล์ โดยเฉพาะผนังของ mitochondria ที่เป็นตำแหน่งที่เกิดการหายใจ

ระดับเซลล์ ส่งผลทำให้สายโมเลกุลของกรดไขมันที่ผนังเซลล์ถูกทำลายหรือผิดรูปวางไป นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ steatohepatitis, necrosis, inflammation และ liver fibrosis การเพิ่มกระบวนการสังเคราะห์ mitochondrial ROS formation ในผู้ป่วย steatohepatitis มีผลทำให้เกิดการทำลาย mitochondria DNA (mtDNA) และ respiratory chain polypeptides โดยไปกระตุ้น nuclear factor kappa-B (NF- κ B) และไปเพิ่มการสร้าง TGF- β ในตับ [64] จากการศึกษาของ Negre-Salvayre et al. [65] ที่ได้ทำการวิเคราะห์บทบาทของ adiponectin ใน mitochondria ที่มีผลต่อการทำงานของโมเลกุล uncoupling protein 2 (UCP2) ในหนูที่อยู่ในภาวะขาดโมเลกุล UCP2 ผลการศึกษาพบว่าการกระตุ้นของ adiponectin จะส่งผลทำให้การทำงานของ MRC จะลดน้อยลงและพบการแสดงออกของโมเลกุล UCP2 จึงสรุปได้ว่าการแสดงออกของโมเลกุล UCP2 ที่เพิ่มขึ้นอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของ adiponectin ใน mitochondria ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปภาพที่ 10 บทบาทของ adiponectin กับการป้องกันการเกิด liver injury [61]

การศึกษาดังกล่าวของ Bai et al. [66] พบว่าโมเลกุล UCP2 มีบทบาทในการยับยั้งการสร้าง pro-inflammatory cytokines ทั้งใน macrophage และ kupffer cells จากกระบวนการดังกล่าวทำให้ทราบว่าโมเลกุล UCP2 เป็นโมเลกุลที่มีประโยชน์ในการรักษา fatty

liver diseases โดยจะมีการทำงานร่วมกับ adiponectin ที่จะช่วยในการต่อต้านการเกิดพยาธิสภาพของโรคได้ สำหรับรายละเอียดของกลไกการทำงานของ adiponectin กับการกระตุ้น UCP2 นั้นยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน

Adiponectin Hypothesis

สำหรับสมมติฐานของ adiponectin กับระดับของ adiponectin ที่ลดลงนั้นเกิดได้จากปัจจัยหลายประการ ไม่ว่าจะเป็นปัจจัยทางพันธุกรรมจากรูปแบบของยีน adiponectin ที่ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (single nucleotide polymorphisms, SNPs) และปัจจัยที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นสาเหตุในการกระตุ้นทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น อาหารที่มีไขมันสูง เป็นต้น สำหรับการแสดงออกของ adiponectin ที่ลดลงนั้นเป็นผลมาจากการส่งสัญญาณของ adiponectin receptors ที่ลดลงเนื่องจากมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเข้ามาเกี่ยวข้อง จากสมมติฐานของ adiponectin ที่ว่าระดับของ adiponectin ที่ลดลงอาจมีสาเหตุเกิดจากปัจจัยทางด้านพันธุกรรม เช่น ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2 และการลดลงของระดับ adiponectin อาจเกี่ยวข้องกับการดำเนินชีวิตที่ส่งผลทำให้เกิดโรคต่างๆได้ [58] ในการศึกษาบทบาทหน้าที่, ลักษณะทางพันธุกรรม และระดับของ adiponectin ที่ลดลง อาจจะนำข้อมูลมาใช้ในการอธิบายกลไกการเกิดโรคที่มีสัมพันธ์กับ adiponectin เช่น การเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2, การเกิดโรค atherosclerosis, และการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน รวมไปถึงบทบาทในการเป็น anti-inflammation และ anti-fibrotic ด้วย

Adiponectin gene

Adiponectin gene ตั้งอยู่บนโครโมโซม 3q27 จากตัวอย่างการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าที่ตำแหน่ง +276 G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2 มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับระดับของโปรตีน adiponectin ในพลาสมาที่ก่อให้เกิดภาวะ insulin resistance และการตอบสนองต่อความไวของโรคเบาหวานประเภทที่ 2 จากการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG จะมีปริมาณของโปรตีน adiponectin ในพลาสมาต่ำกว่าผู้ที่มีลักษณะจีโนไทป์ TT และในกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีความเสี่ยงในการเป็นโรคเบาหวานประเภทที่ 2 เพิ่มขึ้น ซึ่งค่า odd ratio ที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 2 เท่า และจากการศึกษาทดลองในหลายชนชาติได้พบความสัมพันธ์ของ adiponectin กับการเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ซึ่งผลการศึกษามีความคล้ายคลึงกัน ตัวอย่างเช่น การศึกษาในชาวเยอรมันและชาวอเมริกันพบว่าที่

ตำแหน่ง +276 G/T (rs1501299) และ +45T/G (rs2241766) มีความสัมพันธ์กับโรคอ้วนและภาวะ insulin resistance สำหรับการศึกษานี้ในชาวฝรั่งเศสที่ตำแหน่ง SNP-11377 และ SNP-11391 ที่อยู่ในบริเวณ promoter ของยีน adiponectin พบว่ามีความสัมพันธ์กับภาวะ hypoadiponectinemia และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ผลการศึกษาเหล่านี้ได้สนับสนุนสมมติฐานที่ว่ายีน adiponectin มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรค [58]

จากรายงานการศึกษาทั้งหมดที่ได้กล่าวมาในข้างต้นนั้นชี้ให้เห็นว่าการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการเกิดพังผืดในตับ [61] อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้สนใจที่จะศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45 T/G (rs2241766) บริเวณ exon 2 และ +276 G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการประกอบการอธิบายสาเหตุทางพันธุกรรมกับความเสี่ยงในการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin

จากการศึกษาของ Tokushige et al. [67] ที่ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ในผู้ป่วยโรค non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นประชากรชาวญี่ปุ่น โรค NAFLD หรือโรคไขมันพอกตับเป็นโรคที่มีไขมันโดยเฉพาะ triglyceride อยู่ในเซลล์ตับโดยที่ไม่ได้ดื่มสุรา เนื่องจากการดื่มสุรานานก่อให้เกิดการสะสมของเซลล์ไขมันในตับ ในการศึกษาครั้งนี้ Tokushige et al. ได้ทำการศึกษายีน adiponectin บริเวณ exon 2 ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และบริเวณ intron 2 ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรค NAFLD จำนวน 119 ราย และในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นโรค NAFLD จำนวน 115 ราย ผลการศึกษาพบว่าที่ตำแหน่ง +276 G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรค NAFLD มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ GG ความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุม แต่เมื่อนำของทั้ง 2 กลุ่มมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อนำมาวิเคราะห์โดยการวิเคราะห์แยกประเภทของเพศจะพบว่าที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG ที่พบในเพศหญิงมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค NAFLD ในเพศหญิงกับในกลุ่มควบคุมเพศหญิง เช่นเดียวกันกับที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ได้ทำการวิเคราะห์โดยแบ่งกลุ่มตามระดับความรุนแรงของกลุ่มผู้ป่วยที่เกิดภาวะ fibrosis ในระดับความรุนแรงแตกต่างกัน พบว่าที่ตำแหน่ง +45 T/G (rs2241766) ลักษณะจีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิด

fibrosis ในระดับรุนแรงมากกว่าผู้ป่วยที่มีภาวะ fibrosis ในระดับที่รุนแรงน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยทำการวิเคราะห์ร่วมกับความแตกต่างทางเพศ อายุ ค่าดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) ค่า HOMA-IR และระดับของโปรตีน adiponectin ร่วมด้วย ทำให้บอกได้ว่าลักษณะจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง +45 T>G (rs2241766) เป็นปัจจัยหนึ่งของการทำให้เกิด liver fibrosis ในระดับที่รุนแรง อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคนั้นอาจจะไม่ได้เป็นเพียงปัจจัยเดียวที่จะสามารถก่อให้เกิดโรคขึ้นได้ ในการเกิดพยาธิสภาพประกอบด้วยหลายปัจจัยทั้งจากลักษณะทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดอาการของโรค

นอกจากนั้นแล้วยังมีการศึกษาของ Musso et al. [68] ที่ได้ทำการศึกษายีน adiponectin ในผู้ป่วยที่เป็นโรค nonalcoholic steatohepatitis (NASH) สำหรับโรค NASH มีลักษณะการดำเนินไปของโรคและสาเหตุของการเกิดโรคคล้ายกับโรค NAFLD แต่มีข้อแตกต่างกันตรงที่โรค NASH จะมีอาการของตับอักเสบเกิดร่วมด้วย ซึ่งการเกิดตับอักเสบสามารถพัฒนาและอาจนำไปสู่ภาวะตับแข็งได้ ในการศึกษาของ Musso et al. ได้ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) เช่นเดียวกัน ผลจากการศึกษาพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค NASH มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) พบการกระจายตัวจีโนไทป์ GG มีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการศึกษาดังกล่าว Musso et al. ได้สรุปว่าลักษณะจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และลักษณะจีโนไทป์ GT/TT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) จะพบมากในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการที่รุนแรงมากกว่าลักษณะจีโนไทป์แบบอื่นๆ ถึงอย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้ก็ยังไม่สามารถใช้อธิบายถึงสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค แต่สามารถนำข้อมูลมาช่วยสนับสนุนว่าปัจจัยทางพันธุกรรมอาจจะเป็นสาเหตุส่วนหนึ่งในการก่อโรคได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลมาใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคในอนาคตได้ เช่นเดียวกัน

Single nucleotide polymorphism (SNP)

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) คือ ความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละบุคคลมีลำดับเบสต่างกันเพียงตำแหน่งเดียว ณ ตำแหน่งเดียวกันของยีนบนโครโมโซม เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยโดยมีการประมาณว่าจะพบ SNP ในทุกๆหนึ่งพันเบส แต่จำนวน SNP ทั้งหมดยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัด คาดว่า

น่าจะอยู่ในช่วง 3–4 ล้านเบสตลอดจีโนมมนุษย์ SNP เป็นความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง โดย 2 ใน 3 ของ SNP ที่พบจะเป็นการเปลี่ยนจากเบสไซโตซีน (cytosine C หรือ C) ไปเป็นเบสไทมีน (thymine หรือ T) ความแตกต่างของลำดับเบสที่พบแม้เพียง 1 ตำแหน่งนี้อาจส่งผลถึงการแสดงออกของยีน ปริมาณและการทำงานของโปรตีนหรืออาจไม่ส่งผลกระทบต่อใด ๆ เลย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ SNP บนสายดีเอ็นเอ

SNP haplotype คือ สนิปอัลลีล (SNP alleles) หลายๆตำแหน่งที่อยู่ใกล้กันบนโครโมโซมเดียวกันลักษณะของ SNP haplotype ในจีโนมของมนุษย์จะกระจายอยู่ทั่วไปเป็นกลุ่มเรียกว่า haplotype block คือ SNP alleles ที่อยู่ใกล้กันมีแนวโน้มที่จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันทั้งหมดเป็นชุดโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มประชากรที่ไม่มีการอพยพเคลื่อนย้าย หรือแต่งงานข้ามเชื้อชาติ ซึ่งมีโอกาสสูงที่ SNP จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันเป็นชุดปรากฏการณ์ที่ SNP alleles หลายตำแหน่งถูกพบอยู่ด้วยกันในประชากรบ่อยกว่าที่จะพบโดยบังเอิญ แสดงถึงการถูกถ่ายทอดไปพร้อมๆกัน เรียกว่า SNP เหล่านี้มี linkage disequilibrium (LD) ต่อกันและกันหรืออีกนัยหนึ่งคือ SNP เป็นลักษณะอย่างหนึ่งในกลุ่มประชากร

เมื่อพิจารณาตำแหน่งการเกิด SNP ในยีนจะทำให้สามารถแบ่ง SNP ได้เป็น 2 ประเภทคือ SNP ที่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (non-coding SNP) และที่เกิดขึ้นในส่วนที่มีการถอดรหัส (coding SNP)

1. SNP ที่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (non-coding SNP) ได้แก่

1.1 Regulatory SNP (rSNP) เป็น SNP ที่มีผลในการควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งบ่อยครั้งเกิดที่บริเวณ promoter region ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในการสร้างโปรตีนให้มากขึ้นหรือลดลง

1.2 SNP ที่เกิดบริเวณรอยต่อระหว่าง exon และ intron ที่เรียกว่า splicing site ทำให้การตัดต่อ RNA ผิดไปจากเดิมส่งผลให้จำนวนกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ผิดไป

1.3 Intronic SNP (iSNP) เป็น SNP ที่เกิดบริเวณส่วนของ intron จึงมักไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

2. SNP ที่เกิดขึ้นในส่วนที่มีการถอดรหัส (coding SNP) ได้แก่

2.1 Non-synonymous SNP คือ SNP ที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบส 3 ตัวที่ใช้ในการแปลรหัสกรดอะมิโน (triplet codon) จึงก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน

2.2 Synonymous SNP คือ SNP ที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบส 3 ตัวที่ใช้ในการแปลรหัสกรดอะมิโนแล้วไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน

ปัจจุบันมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP กับลักษณะทางคลินิกมากมาย การศึกษาลักษณะนี้จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ SNP หลายตำแหน่งที่อยู่ใกล้กัน ซึ่งการใช้ SNP haplotype สามารถลดจำนวน SNP ที่ต้องวิเคราะห์ลงได้ เนื่องจากปรากฏการณ์ linkage disequilibrium (LD) ที่เกิดกับ SNP ทุกตำแหน่งบน haplotype ถ้าทราบเพียง SNP ในบางตำแหน่งบน haplotype นั้นก็สามารถทำนาย SNP ที่ควรจะเป็นในทุกตำแหน่งได้ [69]

การวิเคราะห์หาตำแหน่ง SNPs ด้วยเทคนิค PCR

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง และสามารถกำหนดปริมาณได้เองโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบภายในระยะเวลาอันสั้น จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA, การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis), การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

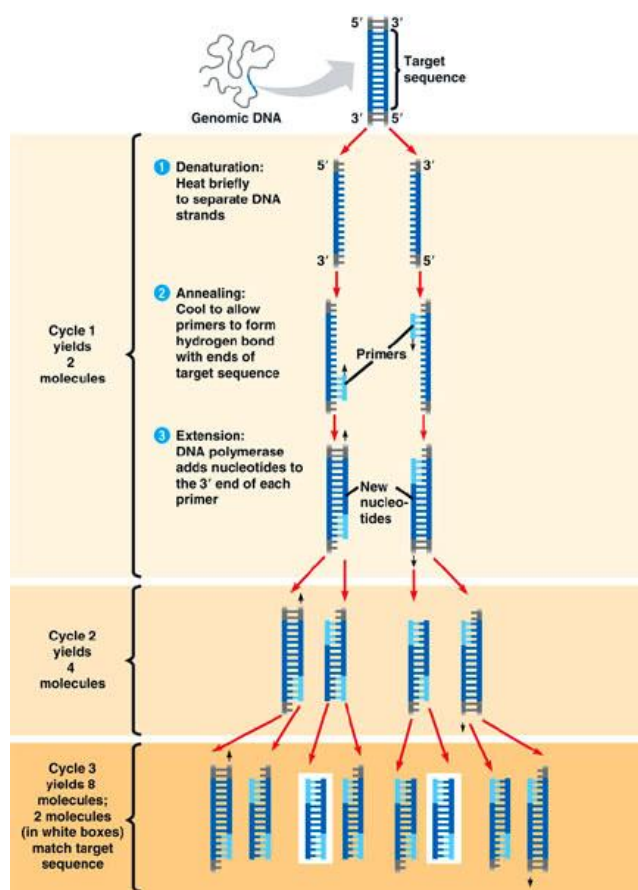
สำหรับหลักการของ PCR ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอ และการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสแต่เทคนิค PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นที่ 1 Denaturing เป็นการแยกสาย DNA ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95° C

ขั้นที่ 2 Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 37-60°C

ขั้นที่ 3 Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดย

อาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75°C เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน [70] หลักการทำงานของ PCR ดังแสดงในรูปภาพที่ 11



รูปภาพที่ 11 หลักการทำงานของ PCR ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลองจึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่สารเคมีที่ต้องใช้ในปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

1. Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อกันของดีเอ็นเอใหม่เข้ากับไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ โดยปกติจะมีความยาวประมาณ 15-30 nucleotides มี GC content ประมาณ 50% หรือมากกว่า การออกแบบ primer ต้องออกแบบ 2 primers โดยที่ primer หนึ่งออกแบบจากบริเวณปลาย 5' ของดีเอ็นเอเป้าหมายและอีก primer หนึ่งที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้าง primer จำเพาะ วิธีการเก็บ primer ให้ใช้งานได้ยาวนานที่สุด เมื่อ primer ถูกส่งมาจะอยู่ในรูปแบบ lyophilized primer สามารถเก็บไว้ที่ -20°C ประมาณ 1 ปี แต่เมื่อทำการละลาย primer ขึ้นมาใช้ด้วย TE buffer แล้ว primer นั้นสามารถเก็บไว้ใช้ได้ประมาณ 6 เดือน ที่อุณหภูมิ -20°C หรืออุณหภูมิ 4°C ถ้าละลาย primer ด้วยการเติมน้ำกลั่นนั้นสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C หรืออุณหภูมิ 4°C ได้น้อยกว่า 6 เดือน ดังนั้นการเก็บ primer ให้ใช้งานได้ยาวนานนั้นควรเก็บใน TE buffer เพราะค่า pH ของน้ำนั้นเปลี่ยนแปลงเป็นกรดได้ง่ายซึ่งค่า pH ดังกล่าวจะสามารถ hydrolyze primer ทำให้ primer ที่ละลายด้วยน้ำกลั่นเก็บไว้ใช้งานได้ไม่นาน

3. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุโมลแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย แมกนีเซียมมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ และช่วยให้เกิดการจับกันของ primer กับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างจำเพาะได้ซึ่งจะทำให้ได้ PCR product ที่มีความจำเพาะขึ้น

4. Template คือ ดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณหรือเป็นตัวอย่างของดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอที่จำเพาะ

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็ก ปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler สามารถปรับอุณหภูมิได้ตามโปรแกรมที่กำหนดจะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอดเมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก [70]

ปัญหาและวิธีการแก้ไขปัญหาของการทำปฏิกิริยา PCR

- เมื่อมีการปนเปื้อนของแถบดีเอ็นเออื่นนั้นอาจเกิดจากการจับกันอย่างไม่จำเพาะระหว่าง non-specific ของดีเอ็นเอแม่แบบกับ primer ซึ่งอาจต้องทำการเพิ่มอุณหภูมิและ

เวลาช่วง annealing ให้สูงขึ้นในช่วงการทำ PCR รอบแรกๆ จากนั้นจึงลดอุณหภูมิลงหรือเปลี่ยนมาใช้ hot-start enzyme

- เกิด primer-dimer อาจแก้ไขโดยออกแบบ primer ให้ไม่สามารถเข้าคู่กับลำดับทางปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบ
- ปรับแมกนีเซียมให้ไม่สูงเกินไป
- อาจเกิดจากการปนเปื้อนดีเอ็นเออื่นระหว่างการทำให้ PCR ซึ่งอาจเปลี่ยนมาใช้ aerosol-resistant tip หรือ UDG
- ดีเอ็นเอแม่แบบอาจเพิ่มปริมาณได้ยากอาจเปลี่ยนเป็นเทคนิค PCR แบบ nested PCR หรือ touchdown PCR
- บางครั้งมีการเติม UDG ลงไปก่อนการทำ PCR นั้นเติมสาร Uracil DNA Glycosylase (UDG) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ดึงเบส uracil จากสายดีเอ็นเอโดยการตัด N-glycosidic bond ที่เชื่อมระหว่าง uracil กับ sugar-phosphate backbone ทำให้สายดีเอ็นเอไม่มีเบส uracil เรียกว่าสายดีเอ็นเอนั้นว่า apyrimidic DNA ซึ่งดีเอ็นเอที่เป็น apyrimidic DNA จะถูกทำลายเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นพร้อมกับสภาวะที่ pH เป็นด่าง (ประมาณ pH 8.3) ดังนั้นในการทำ PCR เมื่อเปลี่ยนระบบจากที่ใช้เบส dTTP มาเป็น dUTP จะทำให้ PCR product ที่เกิดขึ้นมีเบส uracil แทนที่ thymidine เรียกว่า dU-PCR product ถ้า dU-PCR product เหล่านี้ปนเปื้อนไปในการทำ PCR ครั้งต่อไป เอนไซม์ UDG จะสามารถทำลาย dU-PCR product ที่ปนเปื้อนได้ซึ่งเป็นวิธีการกำจัดการปนเปื้อนก่อนการทำ PCR หนทางหนึ่ง [71]

การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

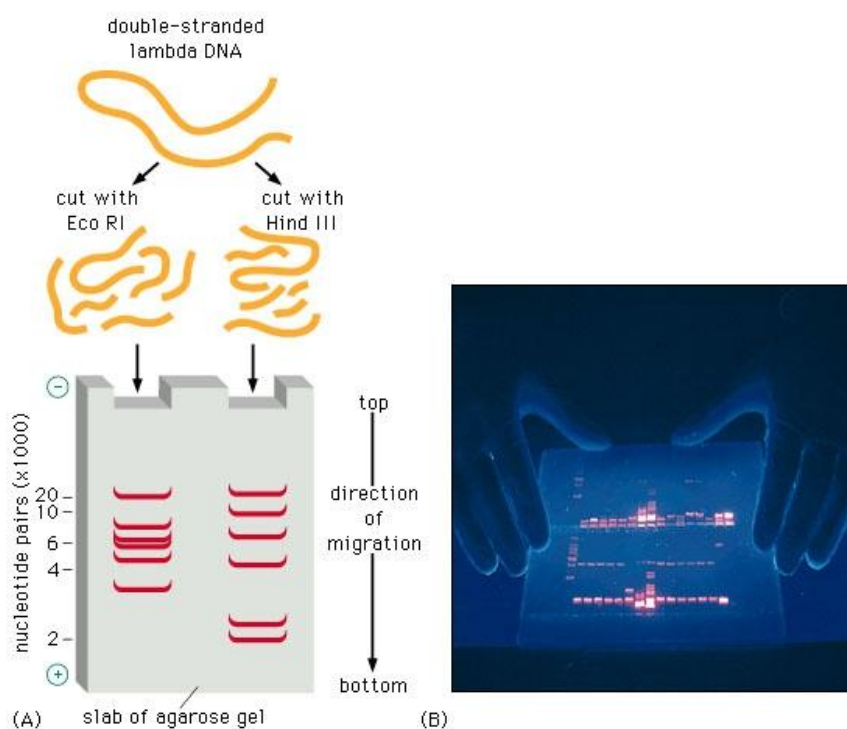
ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอุลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV)

สำหรับวิธี electrophoresis จะได้ออกมาเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอและนำไปเทียบกับ DNA marker ก็จะทำให้รู้ว่าขนาดของดีเอ็นเอ และยังสามารถดูว่ามีการแตกของเส้น DNA หรือไม่ (fragmentation) ถ้ามีการแตกของเส้นดีเอ็นเอก็จะมีขนาด เล็กกลง หรือแถบของดีเอ็นเอที่ได้ อาจไม่คมชัด สำหรับการเกิด smear ซึ่งหมายถึงมีดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกันเกาะกันเป็นปื้น

ทั้งหมดเกิดจากคุณภาพของดีเอ็นเอไม่ดี สำหรับดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีคือควรได้ดีเอ็นเอที่มีลักษณะคมชัด

Agarose gel Electrophoresis

Agarose gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้เพราะดีเอ็นเอมีประจุลบจากหมู่ฟอสเฟต สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีมวลมากก็จะมีจำนวนประจุลบมากขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อพิจารณาสัดส่วนของประจุต่อมวลของดีเอ็นเอแล้วจะเป็นค่าคงที่ หลักการของ agarose gel electrophoresis แยกดีเอ็นเอออกจากกันได้โดยอาศัยแรงเสียดทานการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอแรงเสียดทานนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่างและขนาดของดีเอ็นเอโดยที่ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างอัดแน่นอย่าง supercoiled DNA จะมีแรงเสียดทานน้อย จึงเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า circular DNA และดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นแท่งดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเหมือนกันอย่างชิ้นดีเอ็นเอรูปแท่งนั้น ดังนั้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีแรงเสียดทานการเคลื่อนที่มากกว่า [72]



http://www.student.chula.ac.th/~49371019/agarose_gel_electrophoresis.htm

รูปภาพที่ 12 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่าน gel ของดีเอ็นเอ

ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ โมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก

รูปร่างของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีลักษณะขดเป็นเกลียวจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง

ความเข้มข้นของสารตัวกลาง แผ่น gel ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อยทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าแผ่น gel ที่มีความเข้มข้นต่ำ

ส่วนประกอบของ electrophoresis buffer สารละลาย buffer ที่ใช้ควรมี pH ที่เหมาะสมประมาณ 7.5-8.0

ความต่างศักย์ไฟฟ้า ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการแยกขนาดดีเอ็นเอควรต่ำกว่า 5 V/cm

Loading dye มักใช้เป็น 5-10% glycerol หรือ sucrose จะทำให้ดีเอ็นเอไม่ฟุ้งกระจาย สำหรับสีที่ใช้ส่วนใหญ่นิยมใช้ 0.025% bromphenol blue

สารละลายที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอ สารละลายที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอคือ ethidium bromide ที่มีความเข้มข้น 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสามารถทำให้แถบของดีเอ็นเอเรืองแสงภายใต้แสง UV

การย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide

การย้อมดีเอ็นเอใน agarose gel เดิมนิยมใช้ ethidium bromide ซึ่งสามารถแทรกตัวเข้าไปจับอยู่ระหว่างชั้นของคูเบสในสายของดีเอ็นเอเกลียวคู่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะเห็นดีเอ็นเอเป็นแถบสีส้มแดง (fluorescent radiation) อยู่ในเนื้อ gel เนื่องจาก ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็งปัจจุบันจึงมีการพัฒนาสีย้อมชนิดอื่น ๆ ที่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพมากขึ้น

ในปัจจุบันจึงนิยมย้อมด้วย AgNO_3 แต่กระบวนการย้อมสีค่อนข้างซับซ้อนใช้เวลาและต้องการความชำนาญมากกว่าการย้อมสีด้วย ethidium bromide โดยดีเอ็นเอจะถูกเชื่อมโยงข้าม (crosslink) กับเนื้อ gel ด้วยกรดแอสติกแล้วจึงย้อมด้วย AgNO_3 โดยดีเอ็นเอจะจับกับ Ag^+ แล้วจึงทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ด้วย formaldehyde ในสภาพที่เป็นต่างเกิดเป็นโลหะ Ag ขึ้น และดีเอ็นเอจะย้อมติดสีน้ำตาลเข้มมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยทั่วไป polyacrylamide gel จะสามารถแยกขนาดที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้ดีกว่า agarose gel โดยสามารถแยกขึ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันน้อยถึง 1 นิวคลีโอไทด์ได้ และการย้อมด้วย AgNO_3 ยังมีสภาพไวมากกว่าการย้อมด้วย ethidium bromide ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

ปริมาณน้อย ๆ ได้ และในปัจจุบันยังมีการใช้ระบบ capillary แทนการใช้แผ่น gel เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกขนาดของดีเอ็นเอ การทำงานของ capillary gel electrophoresis system จะคล้ายคลึงกับ electrophoresis ทั่วไป แต่ต่างกันเพียงแค่ว่าดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านหลอด capillary ขนาดเพียงไม่กี่ไมโครเมตรที่มี gel และ electrolyte อยู่ทำให้สามารถแยกโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยออกจากกันในระยะทางและเวลาน้อยกว่าการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย high resolution agarose gel และ polyacrylamide gel ในระบบ capillary gel electrophoresis การย้อมสีดีเอ็นเอและการตรวจวัดการติดสีจะทำในตัวเครื่องและจะให้ข้อมูลออกมาเป็น electropherogram หรือภาพ digital เหมือน gel ทั่วไปก็ได้ [73]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

1.1 กลุ่มที่ทำการศึกษา คือกลุ่มเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และมีอายุไม่เกิน 18 ปี

เกณฑ์ที่ใช้ในเลือกผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

- ผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกหลังได้รับการวินิจฉัยแน่นอนว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและได้รับการผ่าตัด Kasai operation (hepatic-portojejunosotomy)
- การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ตรวจการทำงานของตับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยใช้ระดับ total bilirubin (TB) เป็นเกณฑ์แบ่งผู้ป่วยออกเป็นสองกลุ่มคือ non jaundice (TB < 2.0 mg/dl) และ persistent jaundice (TB ≥ 2.0 mg/dl)

1.2 กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มเด็กที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ไม่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เข้ารับวัคซีนที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และมีอายุไม่เกิน 18 ปี

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้กลุ่มประชากรถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มและเป็นอิสระต่อกัน และจากการศึกษานำร่อง (pilot study) ในการกระจายตัวของยีนที่สนใจ จึงนำมาสู่การคำนวณหาจำนวนของกลุ่มตัวอย่างจากการประมาณค่าเฉลี่ย โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{โดย } n = \frac{(Z_{\alpha/2})^2}{4e^2}$$

$$(\alpha = 0.05, Z_{\alpha/2} = 1.96)$$

กำหนด n = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

Z = ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

e = relative acceptable error ซึ่งยอมรับที่ค่าความผิดพลาดไม่เกิน

$$\text{ดังนั้น } n = \frac{(1.96)^2}{4(0.10)^2} = \frac{96.04}{0.16} = 600.25$$

ดังนั้นขนาดตัวอย่างในกลุ่มที่ใช้ในการศึกษาจำนวนอย่างน้อย 97 ราย จึงจะประมาณค่าร้อยละโดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 10 แต่เพื่อความแน่นอนและถูกต้องของข้อมูลและป้องกันการสูญหายของตัวอย่าง เนื่องจากการเก็บตัวอย่างจะทำให้ก็ต่อเมื่อผู้ป่วยมาเข้ารับการรักษาเท่านั้น จึงต้องทำการเก็บตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่สามารถเก็บได้ คือจำนวน 100 ราย และตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมจำนวน 100 ราย โดยที่อายุและเพศใกล้เคียงกัน (age and sex-match) โดยอ้างอิงจากการศึกษาวิจัยนำร่อง (pilot study) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวิจัย โดยใช้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 30 ราย โดยนำข้อมูลมาวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของยีนก่อนการศึกษาในผู้ป่วยกลุ่มใหญ่ต่อไป

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือ (Materials)

- Autoclave (Hydroclave Harvey, USA)
- Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
- Balance (Sartorius)
- Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- Centrifuge, refrigerated centrifuge (Eppendorf, USA)
- Centrifuge, microcentrifuge high speed (Eppendorf, USA)
- Combs (BIO-RAD, Hercules, California, USA)
- Cuvette 80-100 μ l
- Cylinder : 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- Digital Timer
- DNA Thermal cycler (Thermo Hybaid, USA)
- Electrophoresis chamber set (BIO-RAD, USA)
- ELISA microplate reader (Bio-RAD model 3550, USA)
- Flask : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- Freezer -80°C (Forma Scientific, USA)
- Gel Doc 1000 (BIO-RAD, USA)
- Mitsubishi video copy processor (BIO-RAD, USA)

- Mixing block (BIOER,USA)
- Multi-block heater (Techne DRI Block, USA)
- Multi-channel pipette: P (Socorex, Switzerland)
- pH meter (Eutech Cybernataics)
- Pipette aid (Tecnomara, Switzerland)
- Pipette rack (Autopack, USA)
- Power supply model 250 (BIO-RAD, USA)
- Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- Refrigerator (Sanyo, Japan)
- Spectrophotometer (BIO-RAD, USA)
- Stirring-magnetic bar
- Test tube racks
- Thermometer (IR Thermometer, USA)
- Vortex mixer (Scientific Industry, USA)
- Water purification equipment (Water pro Ps, Labconco USA)
- Water bath, Thermostat shaking (Memmert, Germany)
- Rolimeter™ (Aircast, USA)

วัสดุอุปกรณ์ (Equipments)

- Aluminum foil (Rainbow metal company, USA)
- Barrier Tip: 200 μ l (BioScience, USA)
- Clotted blood and EDTA tube (Vacuettee, Austria)
- Disposable gloves
- Glass pipette : 1 ml, 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany)
- Kimwibe paper
- Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (BIO-RAD, USA)
- Needle, sterile (Nipro)
- Parafilm (American National Can, USA)
- Petri dish
- Pipette tip : 10 μ l, 200 μ l, 1,000 μ l (AxyGen, USA)

- Plastic wrap
- Polypropylene conical tube, sterile : 15 ml, 50 ml (Elkay, USA)
- PCR markers (Bio-Rad, USA)
- Sanitary tissue paper (Celox, Thailand)
- Sterile pasture pipette (Samco Scientific Corporation, USA)
- Syringe disposable (Nipro, Japan)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (Reagent)

1. สารเคมีทั่วไป (General reagent)
 - Agarose molecular grade (Sigma, USA)
 - Boric acid (USB, Hong Kong)
 - Bromphenal blue (Pharmacia, Hong Kong)
 - Diethyl pyrocarbonate (Sigma, USA)
 - Ethanol 70%
 - Ethidium bromide (Sigma, USA)
 - Hydrochloric acid (Sigma, USA)
 - Sucrose (USB, Hong Kong)
 - Tris (USB, Hong Kong)
2. สารเคมีสำหรับสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)
 - 1X PBS buffer pH 7.2
 - RBC lysis buffer
 - Absolute ethanol
 - Elution buffer
 - Lysis solution
 - Proteinase K
 - Wash buffer
3. สารเคมีสำหรับการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)
 - 10 μ M primer forward (Bio Basic Inc, Thailand)
 - 10 μ M primer reverse (Bio Basic Inc, Thailand)
 - 10X PCR buffer (Fermentus, USA)

- 1X TAE buffer
 - 2 mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Fermentus, USA)
 - 25 mM MgCl₂ (Fermentus, USA)
 - PCR marker (Bio-Rad, USA)
 - Taq polymerase enzyme (Fermentus, USA)
4. สารเคมีสำหรับการทำการ PCR-RFLP
- 10X NEBuffer 3 (New England BioLabs, UK)
 - 10X NEBuffer 4 (New England BioLabs, UK)
 - BglI (New England BioLabs, UK)
 - BspHI (New England BioLabs, UK)
 - Nuclease-free water
5. สารเคมีสำหรับ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
- Horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody (R&D, USA)
 - Recombinant human adiponectin (R&D, USA)
 - Stop solution (R&D, USA)
 - Substrate solution (R&D, USA)
 - Wash buffer (R&D, USA)
6. สารเคมีสำหรับการเตรียม polyacrylamide gel
- 0.5X TBE buffer
 - 10% Ammoniumpersulfate
 - 30% polyacrylamide
 - 5X TBE buffer
 - TEMED

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ในการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองผู้วิจัยได้ทำการเก็บข้อมูลโดยการจดลงสมุดบันทึก และลงข้อมูลต่างๆในคอมพิวเตอร์ โดยได้จัดทำตารางการเก็บข้อมูลแยกรายละเอียดของแต่ละบุคคลโดยบันทึกรูปแบบของสารพันธุกรรมที่ได้ลงใน case record form และบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม Microsoft excel

Case Record Form 1: สำหรับบันทึกระดับโปรตีน adiponectin และลักษณะจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299)

รหัส	อายุ (ปี)	Adiponectin (ng/ml)	+45T/G			+276G/T		
			TT	TG	GG	GG	GT	TT

Case Record Form 2: สำหรับบันทึกผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

รหัส	อายุ	Total protein	Alb	TB	DB	AST	ALT	ALP	γ -GGT

การดำเนินการวิจัย

ประชากรศึกษา (Population)

การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทั้งหมดที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน รวมถึงกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเด็กสุขภาพดีไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันซึ่งได้รับคำแนะนำถึงวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และลงลายมือชื่อยินยอมให้ทำการศึกษาเป็นลายลักษณ์อักษร

ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ใช้ในการศึกษานี้จำนวน 106 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยเพศชายจำนวน 44 ราย และเพศหญิงจำนวน 62 ราย มีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 12.9 ± 2.4 ปี ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและเข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทุกรายจะต้องผ่านการรักษาโดยการผ่าตัดคาไซ (Kasai operation) และมาติดตามการรักษาเป็นประจำที่คลินิกหน่วยโรคระบบทางเดินอาหาร ภาควิชา

กุมารเวชศาสตร์ แผนกผู้ป่วยนอกตึก ภปร. ชั้น 9 ทุกวันพุธ เวลา 9.00-12.00 น. สำหรับกลุ่มควบคุมจำนวน 107 ราย ประกอบด้วยเพศชายจำนวน 42 ราย และเพศหญิงจำนวน 65 ราย โดยจะทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มนี้ นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมภายในในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยอาศัยระดับ total bilirubin (TB) เป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลือง (Jaundice) มีระดับของ TB มากกว่าหรือเท่ากับ 2 mg/dl และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง (No jaundice) มีระดับของ TB น้อยกว่า 2 mg/dl ในการศึกษาไม่ได้นำกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ (liver transplantation) โดยไม่ได้ทำการผ่าตัดแบบคาไซ หรือเป็นผู้ป่วยที่ทำการผ่าตัดแบบคาไซแล้วไม่ประสบผลสำเร็จเป็น end stage biliary atresia คือการทำงานของตับล้มเหลวรบกวนการรักษาด้วยวิธีผ่าตัดเปลี่ยนปลูกถ่ายตับ รวมถึงผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคอื่นๆ แสดงอาการไข้ หรือมีการอักเสบของท่อน้ำดี หรือมีความผิดปกติเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดเมื่อทำการเจาะเลือด (ยกเว้นอาการที่เกิดจากภาวะแทรกซ้อนเมื่อได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ)

การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection)

การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและเด็กที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง ไม่มีประวัติป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยทำการเจาะเก็บเลือดจาก peripheral venous blood ด้วยหลอดมีสารกันเลือดแข็งตัว EDTA และ clotted blood tube ปริมาตร 3-5 ml จากนั้นทำการปั่นแยกส่วนของพลาสมาในหลอด EDTA และส่วนของซีรัมในหลอด clotted blood tube โดยการตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดแยกส่วนของพลาสมาหรือซีรัมซึ่งจะอยู่ส่วนบนของหลอดนำไปใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 ° C เพื่อนำไปใช้ในการวัดระดับโปรตีน adiponectin และสำหรับในส่วนของเม็ดเลือดที่อยู่ในหลอด EDTA จะนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อทำการทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือด (DNA extraction)

การสกัดสารพันธุกรรมใช้ชุดสกัด illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, USA) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำส่วนของ whole blood ที่ทำการแยกพลาสมาออกไปแล้ว

2. ทำการเติม lysis buffer ลงไปประมาณ 3 ml จากนั้นผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าได้กำจัดเม็ดเลือดแดงออกไปจนหมด

3. เติม PBS ลงไป 200 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปใส่ใน microtube ที่มี proteinase K อยู่ 20 μ l และเติม lysis buffer ลงไปอีก 400 μ l นำไป vortex เป็นเวลา 15 วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนั้นให้ทำการ vortex เป็นครั้งคราว เมื่อครบเวลาจะเห็นสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีน้ำตาล

4. นำสารละลายใส่ลงใน column ปั่น column ที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เทของเหลวในส่วนของ collection tube ทิ้งไป

5. เติม lysis buffer 500 μ l ปั่น column ที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนของเหลวทิ้งไป

6. เติม wash buffer 500 μ l ปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เทส่วนของเหลวทิ้งไป จากนั้นนำไปปั่นอีก 3 นาที เพื่อให้ column แห้งสนิท

7. ย้าย column ไปสู่ micro tube อันใหม่ จึงทำการเติม elution buffer ที่ได้ทำการอุ่นที่อุณหภูมิ 70 °C ลงไป 200 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

8. นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทำการเก็บส่วนของสารละลายที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาสภาพของดีเอ็นเอเอาไว้ จากนั้นจึงแบ่งสารละลายบางส่วนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm เพื่อหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ } (\mu\text{g} / 200\mu\text{l}) &= \text{ค่า OD ที่ } 260 \text{ nm} \times 50 \times \text{dilution factor} \\ \text{ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ} &= \text{ค่า OD ที่ } 260 \text{ nm} / \text{ค่า OD ที่ } 280 \text{ nm} \end{aligned}$$

การเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค PCR

ก่อนการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในขั้นแรกจะต้องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) สำหรับ forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในการทำ PCR ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) บริเวณ exon 2 และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2 ซึ่งใช้อ้างอิงจาก Nakatani et al. [89] ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ไพร์เมอร์และขนาดของผลิตภัณฑ์

Primer adiponectin	Sequence	Primer length (bp)	Tm (°C)	Size product (bp)
+45T/G (rs2241766) บริเวณ exon 2				
Forward primer	5'-TCCTTTGTAGGTCCCAACT-3'	19	55.4	503
Reverse primer	5'-GCAGCAAAGCCAAAGTCTTG-3'	20	57.8	
+276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2				
Forward primer	5'-ACACTGATATAAACGCCATGAA-3'	22	54.5	168
Reverse primer	5'-GCAGCAAAGCCAAAGTCTTG-3'	20	57.8	

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการผสม master mix สำหรับ PCR ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ดังแสดงในตารางที่ 4 และตารางที่ 5 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 Reaction mixture สำหรับ PCR ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766)

สารละลาย	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x amplification buffer	5	1x
2 mM dNTPs Mix	1	200 µM
25 mM MgCl ₂	6	3 mM
10 µM primer forward (+45T/G)	2	20 pmol
10 µM primer reverse	2	20 pmol
0.5U/µl Taq DNA polymerase	3	1.5 U/reaction
DAN template	*	0.5 µg
Sterile distilled water	*	-
Total volume	50	

* ปริมาตรแปรผันตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยรวมกันแล้วได้ 31 µl

ตารางที่ 5 Reaction mixture สำหรับ PCR ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299)

สารละลาย	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x amplification buffer	5	1x
2 mM dNTPs Mix	1	200 µM
25 mM MgCl ₂	6	3 mM
10 µM primer forward (+276T/G)	2	20 pmol
10 µM primer reverse	2	20 pmol
0.5U/µl Taq DNA polymerase	4	2.0 U/reaction
DAN template	*	0.5 µg
Sterile distilled water	*	-
Total volume	50	

* ปริมาตรแปรผันตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยรวมกันแล้วได้ 30 µl

2. นำส่วนผสมเข้าเครื่อง thermal cycle PCR ตั้งโปรแกรมเครื่อง thermal cycler สำหรับ PCR ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ดังตารางที่ 6 และ ตารางที่ 7 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 สภาวะและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766)

Step	Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
Initial PCR activation step	95	10	1
3-step cycling			
- Denaturing	95	0.3	
- Annealing	56	0.3	40
- Extension	72	1	
Final extension	72	7	1

ตารางที่ 7 สภาวะและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299)

Step	Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
Initial PCR activation step	95	10	1
3-step cycling			
- Denaturing	95	0.3	
- Annealing	48	1	40
- Extension	72	1	
Final extension	72	7	1

3. ตรวจสอบ PCR product โดยใช้ agarose gel electrophoresis

3.1 นำ PCR product ที่ได้ไปผสมกับ loading dye

3.2 นำไป run ใน 2.0% agarose gel electrophoresis เป็นเวลานาน ประมาณ 60 นาที

3.3 นำ gel ไปย้อม ethidium bromide ประมาณ 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำประมาณ 15 นาที

3.4 นำ gel ที่ย้อมเรียบร้อยแล้วนั้นไปส่องด้วยแสง UV จากเครื่อง ultraviolet transilluminator (Gel DOC) และขนาดของ PCR product จะทราบจาก marker 100 bp ladder

การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมด้วยวิธี PCR-RFLP

PCR-RFLP ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766)

1. นำ PCR product มาตัดด้วย restriction enzyme BspH I (10 U/μl, NEB, USA) โดยเติมสารต่างๆ ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ดังตารางที่ 8

2. นำส่วนผสมทั้งหมดไป incubate ใน incubator หรือ waterbath 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3. วิเคราะห์ PCR product ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โดยใช้ 2.5% agarose gel electrophoresis

3.1 นำ PCR product ที่ได้ไปผสมกับ loading dye

3.2 นำไป run ใน 2.5% agarose gel electrophoresis เป็นเวลานาน ประมาณ 60-120 นาที

3.3 นำ gel ไปย้อม ethidium bromide ประมาณ 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำประมาณ 15 นาที

3.4 นำ gel ที่ย้อมเรียบร้อยแล้วนั้นไปส่องด้วยแสง UV จากเครื่อง ultraviolet transilluminator (Gel DOC) และขนาดของ DNA product จะทราบจาก marker 100 bp ladder

ตารางที่ 8 ส่วนผสมในการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme BspHI

สารละลาย	ปริมาตร (µl)
PCR product	7
1x NEB buffer 4	1
BspHI (10 U/µl)	1
Sterile distilled water	1
Total	10

PCR-RFLP ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299)

1. นำ DNA product มาตัดด้วย restriction enzyme BgLI (10 U/µl, NEB, USA) โดยเติมสารต่าง ๆ ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ดังตารางที่ 6

2. นำส่วนผสมทั้งหมดไป incubate ใน incubator หรือ waterbath 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3. วิเคราะห์ PCR product ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์โดยใช้ 12% polyacrylamide gel electrophoresis สารที่ใช้ในการเตรียมดังแสดงในตารางที่ 9

3.1 หยอด sample 10 µl ที่ผสมกับ loading dye 2 µl ลงในหลุมของ 12% polyacrylamide gel แบบแนวตั้ง

3.2 นำไป run ใน 12% polyacrylamide gel electrophoresis เป็นเวลานานประมาณ 120-180 นาที

3.3 นำ gel ไปย้อม ethidium bromide ประมาณ 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำประมาณ 15 นาที

3.4 นำ gel ที่ย้อมเรียบร้อยแล้วนั้นไปส่องด้วยแสง UV จากเครื่อง ultraviolet transilluminator (Gel DOC) และขนาดของ PCR product จะทราบจาก marker 25 bp ladder

ตารางที่ 9 ส่วนผสมในการตัด PCR product ด้วย restriction enzyme BgLI

สารละลาย	ปริมาตร (µl)
PCR product	7
1x NEB buffer 3	1
BgLI (10 U/µl)	1
Sterile distilled water	1
Total	10

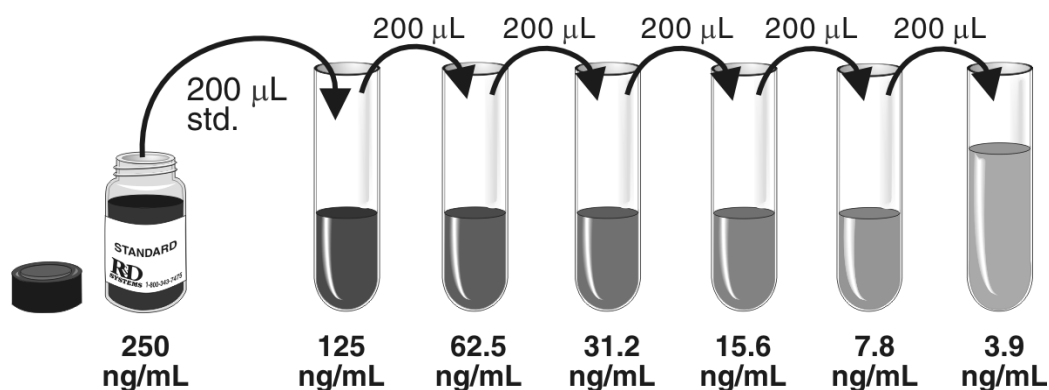
ตารางที่ 10 สารละลายที่ใช้ในการเตรียม 12% polyacrylamide gel

สารละลาย	ปริมาณที่ใช้
30% polyacrylamide	4 ml
5X TBE buffer	2 ml
Deionized water	3.93 ml
10% ammonium persulfate	70 µl
TEMED	3.5 µl

การตรวจวัดปริมาณโปรตีน adiponectin ด้วยวิธี ELISA

การวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA; R&D, USA) มีขั้นตอนดังนี้

1. เติมสารละลาย adiponectin diluent buffer ปริมาตร 100 µl ลงใน microplate ทุกหลุม
2. เติมสารละลาย adiponectin standard ที่ผ่านการทำ serial dilution ตามความเข้มข้นจากมากไปน้อย ดังแสดงในรูปภาพที่ 13 และเติมซีรัมของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ที่ผ่านการ dilute ในอัตราส่วน 1:100 ในสารละลาย diluent ปริมาตร 50 µl ลงใน microplate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง



(<http://www.rndsystems.com/pdf/drp300.pdf.html>)

รูปภาพที่ 13 การทำ serial dilution เพื่อใช้ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน

3. เติมน้ำล้างและเติมน้ำล้าง wash buffer หลุมละ 400 μ l ลงใน microplate เมื่อเติมครบทุกหลุมก็เติมน้ำล้างทิ้ง โดยเติมน้ำล้างออกให้หมดและซับลงในกระดาษที่สะอาด ทำการล้างทั้งหมด 4 ครั้ง ครั้งสุดท้ายจะต้องเติมน้ำล้างออกให้หมดพยายามอย่าให้มีสารละลายเหลือติดอยู่ที่หลุม เนื่องจากอาจจะทำให้ไปรบกวนผลการตรวจวัดได้
4. เติมน้ำล้าง adiponectin conjugate ลงใน microplate หลุมละ 200 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
5. เติมน้ำล้างออกและทำการล้างด้วยน้ำล้าง wash buffer จำนวน 4 ครั้ง ทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 3
6. เติมน้ำล้าง substrate ลงใน microplate หลุมละ 200 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในขั้นตอนนี้จะต้องทำการเติมน้ำล้าง substrate ในที่ไม่มีแสง เนื่องจากสารละลาย substrate เป็นสารที่ไวต่อแสง
7. เติมน้ำล้าง sulfuric acid ซึ่งเป็น stop solution ลงใน microplate ปริมาตร 50 μ l ทุกหลุมสังเกตการเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง ทำการ mix สารละลายใน microplate ให้เข้ากัน
8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader
9. นำค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่วัดได้มาคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน adiponectin โดยเทียบจากสมการของกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลาย standard ที่ค่าต่างๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะจีโนไทป์ของยีน adiponectin ระหว่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS statistical package version 17.0 โดยเลือกใช้การทดสอบทางสถิติ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P -value < 0.05) และหาความเสี่ยงในการทำให้เกิดโรคโดยใช้ค่าสถิติ odd ratio (OR)
2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมแบบ haplotypes block กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยเลือกใช้การทดสอบทางสถิติ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P -value < 0.05)
3. วิเคราะห์ลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างอาการทางคลินิกกับลักษณะจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่พบในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยใช้การทดสอบทางสถิติ One-way ANOVA และ Student's unpaired t -test
4. วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยหลักสมดุลของ Hardy-Weinberg equilibrium ด้วย Markov chain random-walk algorithm
5. วิเคราะห์ความแตกต่างของระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมโดยใช้การทดสอบทางสถิติ Student's unpaired t -test
6. วิเคราะห์ความแตกต่างของระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีลักษณะจีโนไทป์ที่แตกต่างกันด้วยการทดสอบทางสถิติ Bofferoni post hoc One-way ANOVA test

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมกับการก่อเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 106 ราย โดยได้ทำการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม อาศัยค่าของบิลิรูบิน (total bilirubin, TB) เป็นเกณฑ์ในการจำแนก คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลือง (jaundice, TB \geq 2 mg/dl) จำนวน 67 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง (no jaundice, TB < 2 mg/dl) จำนวน 39 ราย สำหรับข้อมูลลักษณะทั่วไปและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่บ่งชี้ลักษณะอาการทางคลินิก ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS statistical package version 17.0 ด้วยการทดสอบทางสถิติ Student unpaired *t*-test มีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 11

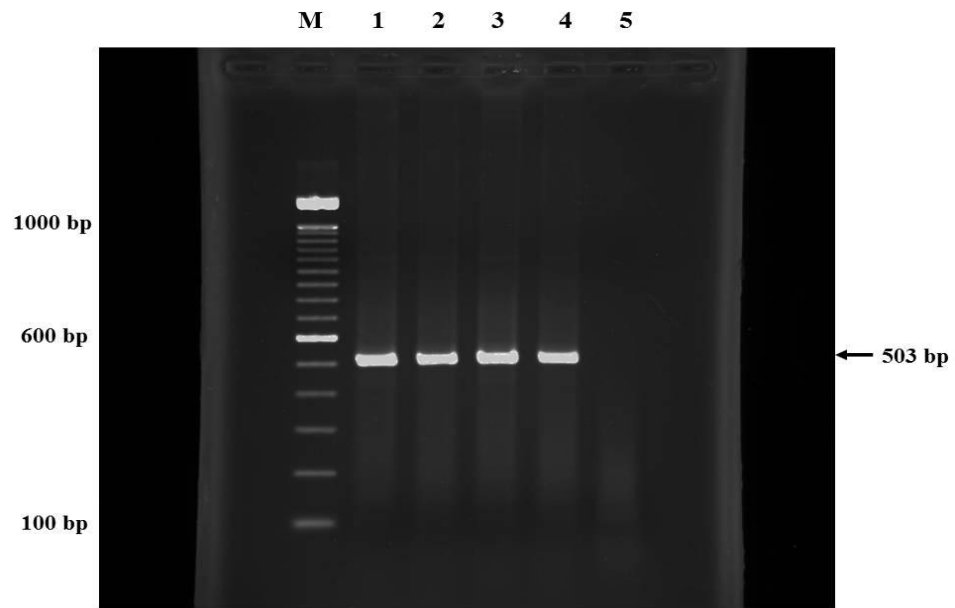
ตารางที่ 11 ข้อมูลลักษณะทั่วไปและอาการทางคลินิกของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

	All patients	BA group		<i>P</i> value
		Jaundice	No jaundice	
N (M/F)	106 (44/62)	39 (16/23)	67 (28/39)	
Age (years)	5.8 \pm 4.7	5.9 \pm 5.7	5.7 \pm 3.4	
AST (IU/L)	137.2 \pm 103.5	213.7 \pm 106.9	92.7 \pm 70.7	< 0.001
ALT (IU/L)	121.9 \pm 96.4	159.4 \pm 101.4	100.0 \pm 86.8	0.009
ALP (IU/L)	468.3 \pm 275.0	586.7 \pm 274.9	400.9 \pm 253.3	0.01
γ -GGT (IU/L)	286.5 \pm 323.9	424.3 \pm 407.6	184.9 \pm 195.4	0.011
TB (mg/dl)	4.5 \pm 7.2	11.1 \pm 8.4	0.7 \pm 0.4	< 0.001
DB (mg/dl)	3.7 \pm 6.4	8.9 \pm 7.0	0.6 \pm 3.3	< 0.001
Protein (g/dl)	6.9 \pm 0.7	6.7 \pm 0.8	7.2 \pm 0.6	NS
Albumin (g/dl)	4.2 \pm 0.7	3.8 \pm 0.8	4.5 \pm 0.4	< 0.001

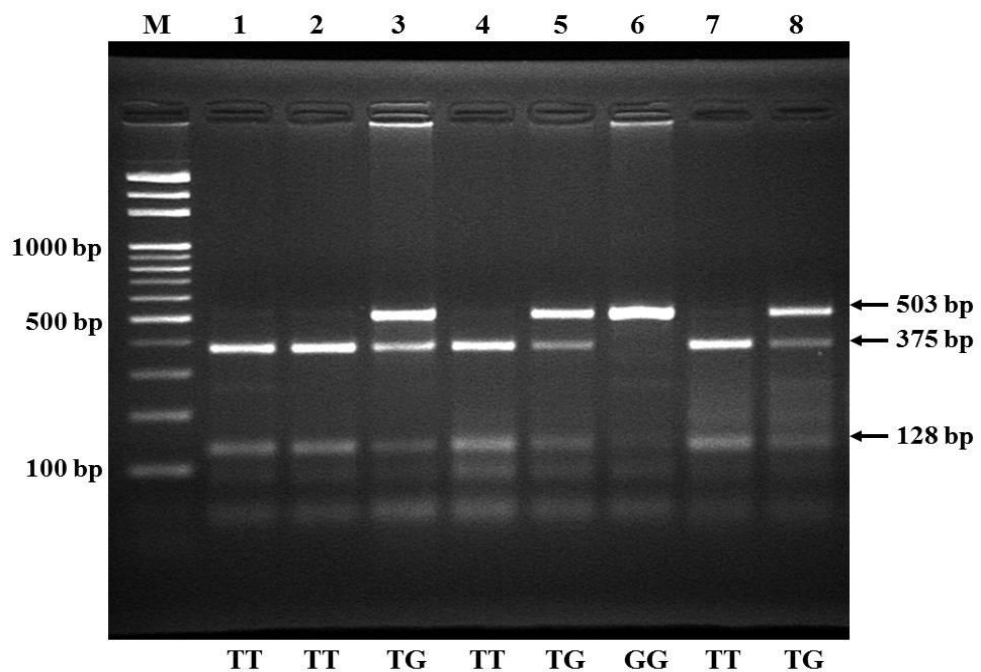
จากตารางที่ 11 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 106 ราย ในจำนวนนี้เป็นเพศชายจำนวน 44 ราย และเพศหญิงจำนวน 62 ราย มีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 8.0 ± 5.4 ปี เมื่อทำการวิเคราะห์ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อบ่งชี้ลักษณะอาการทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีลักษณะอาการตัวเหลืองจำนวน 39 ราย กับในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลืองจำนวน 67 ราย พบว่าระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST), เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), เอนไซม์ gamma-glutamyl transferase (γ -GGT), ค่า total bilirubin (TB), และค่า direct bilirubin (DB) ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองสูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (AST; 213.7 ± 106.9 IU/L กับ 92.7 ± 70.7 IU/L, $P < 0.001$, ALT; 159.4 ± 101.4 IU/L กับ 100.0 ± 86.8 IU/L, $P = 0.009$, ALP; 586.7 ± 274.9 IU/L กับ 400.9 ± 253.3 IU/L, $P = 0.01$, γ -GGT; 424.3 ± 407.6 IU/L กับ 184.9 ± 195.4 IU/L, $P = 0.011$, TB; 11.1 ± 8.4 mg/dl กับ 0.7 ± 0.4 mg/dl, $P < 0.001$, และ DB; 8.9 ± 7.0 mg/dl กับ 0.6 ± 3.3 mg/dl, $P < 0.001$) สำหรับระดับโปรตีน albumin ในผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองพบต่ำกว่าในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (3.8 ± 0.8 g/dl กับ 4.5 ± 0.4 g/dl, $P < 0.001$)

การวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin

ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมด้วยเทคนิค PCR-RFLP สำหรับ PCR product ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) มีขนาด 503 bp ดังแสดงในรูปภาพที่ 14 เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ BspHI จะพบลักษณะจีโนไทป์ 3 รูปแบบ ได้แก่ GG homozygous ซึ่งจะพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 ชิ้นที่มีขนาด 503 bp, TG heterozygous จะพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้นที่มีขนาด 503 bp, 375 bp, และ 128 bp ตามลำดับ และ TT homozygous จะพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นที่มีขนาด 375 bp, และ 128 bp ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในรูปภาพที่ 15

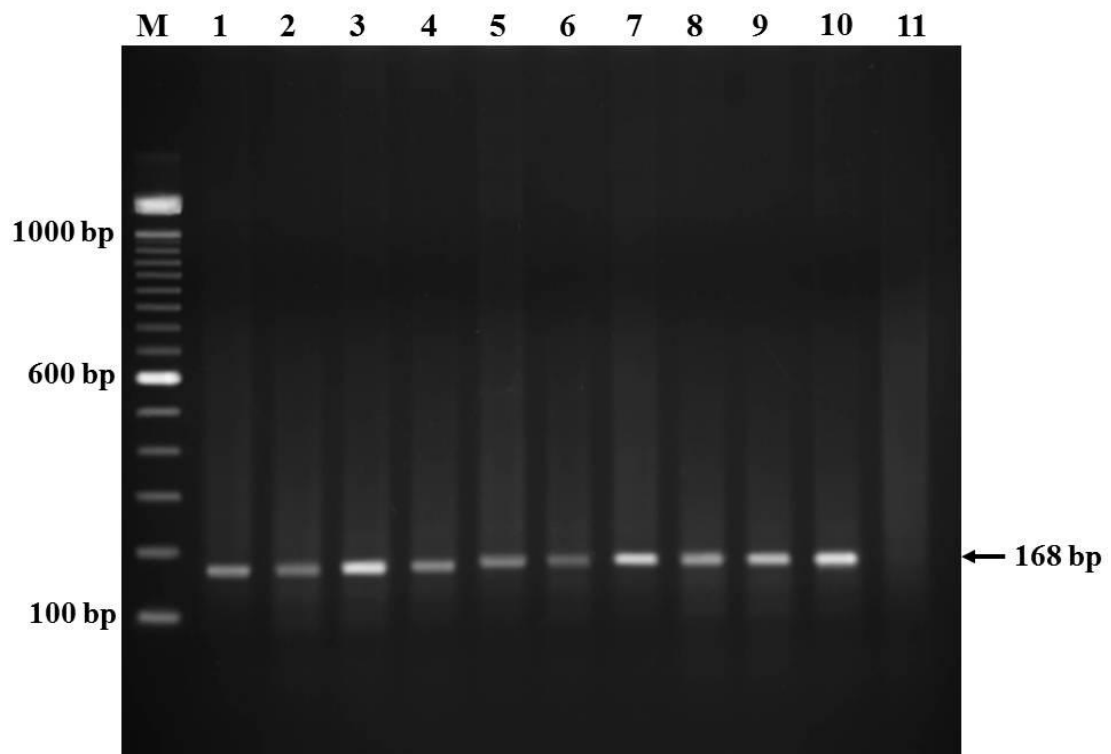


รูปภาพที่ 14 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) บริเวณ exon 2 (แถวที่ M : DNA ladder ขนาด 100 bp, แถวที่ 1-4 : PCR product, แถวที่ 5 : Negative control)

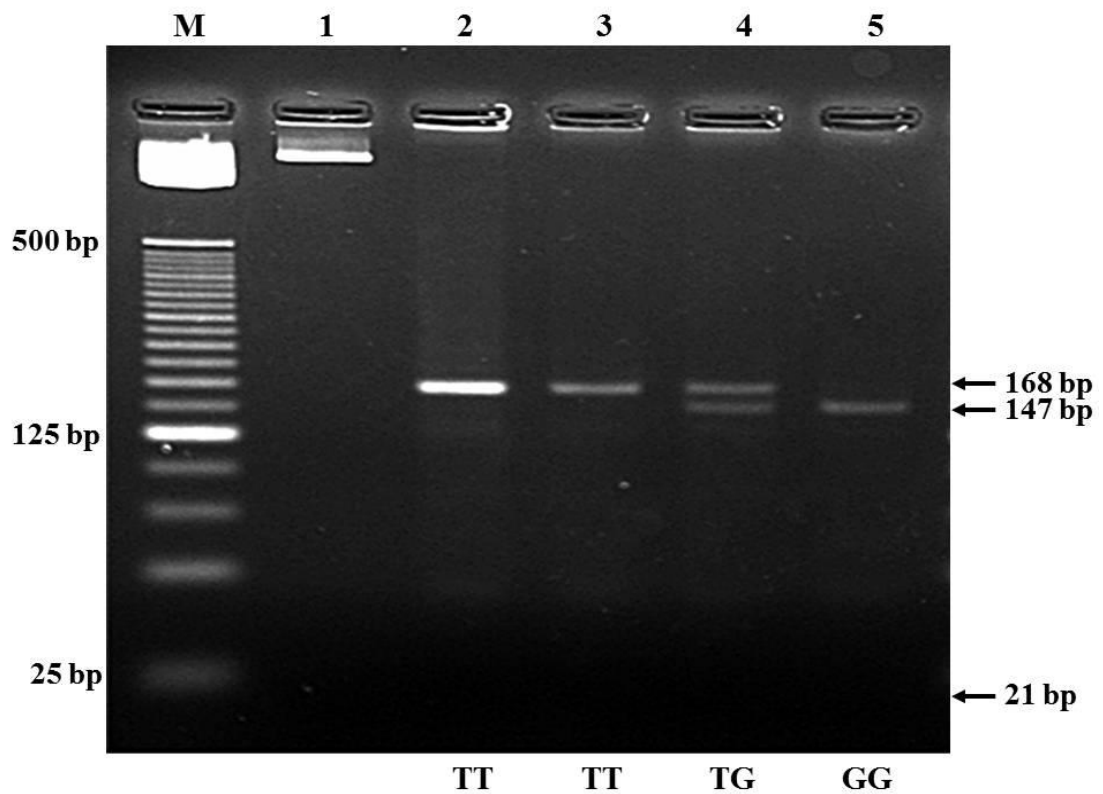


รูปภาพที่ 15 ลักษณะจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) (แถวที่ M : DNA ladder ขนาด 100 bp, แถวที่ 6 : GG genotype (homozygous), แถวที่ 3,5,8 : TG genotype (heterozygous), แถวที่ 1,2,4,7 : TT genotype (homozygous))

สำหรับ PCR product ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีขนาด 168 bp ดังแสดงในรูปภาพที่ 16 เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ BglI จะพบลักษณะจีโนไทป์ 3 รูปแบบ ได้แก่ TT homozygous จะพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 1 ชิ้นที่มีขนาด 168 bp, TG heterozygous จะพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้นที่มีขนาด 168 bp, 147 bp, และ 21 bp ตามลำดับ และ GG homozygous จะพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นที่มีขนาด 147 bp, และ 21 bp ตามลำดับ ที่แสดงไว้ในรูปภาพที่ 17

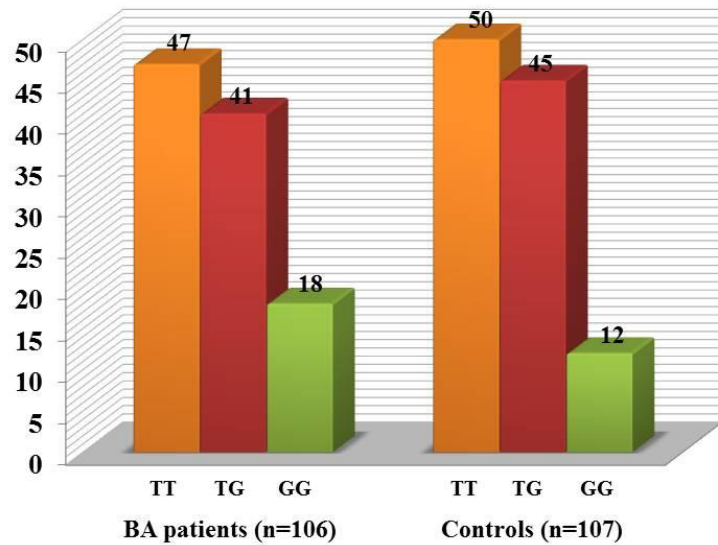


รูปภาพที่ 16 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2 (แถวที่ M : DNA ladder ขนาด 100 bp, แถวที่ 1-10 : PCR product, แถวที่ 11 : Negative control)



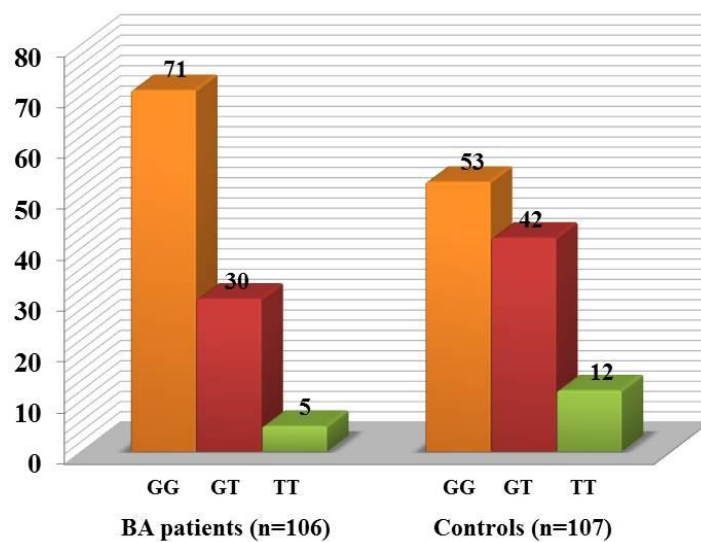
รูปภาพที่ 17 ลักษณะจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2 (แถวที่ M : DNA ladder ขนาด 25 bp, แถวที่ 2,3 : TT genotype (homozygous), แถวที่ 4 : GT genotype (heterozygous), แถวที่ 5 : GG genotype (homozygous))

จากกลุ่มตัวอย่างที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 106 ราย พบลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) โดยมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT จำนวน 47 ราย (ร้อยละ 44.3), จีโนไทป์ TG จำนวน 41 ราย (ร้อยละ 38.7) และจีโนไทป์ GG จำนวน 18 ราย (ร้อยละ 17) สำหรับในกลุ่มควบคุมจำนวน 107 ราย มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT จำนวน 50 ราย (ร้อยละ 46.7), จีโนไทป์ TG จำนวน 45 ราย (ร้อยละ 42.1) และจีโนไทป์ GG จำนวน 12 ราย (ร้อยละ 11.2) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปภาพที่ 18



รูปภาพที่ 18 แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม

สำหรับที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ GG จำนวน 71 ราย คิดเป็นร้อยละ 67, จีโนไทป์ GT จำนวน 30 คิดเป็นร้อยละ 28.3 และจีโนไทป์ TT จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.7 กลุ่มควบคุมพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ GG จำนวน 53 ราย คิดเป็นร้อยละ 49.5, จีโนไทป์ GT จำนวน 42 ราย คิดเป็นร้อยละ 39.3 และจีโนไทป์ TT จำนวน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.2 ดังแสดงในรูปภาพที่ 19



รูปภาพที่ 19 แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม

นอกจากนี้ความถี่ของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 106 ราย จะพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) แบบจีโนไทป์ TT/GG จำนวน 26 ราย (ร้อยละ 55.3), TT/GT จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 36.2), TT/TT จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 8.5), TG/GG จำนวน 31 ราย (ร้อยละ 75.6), TG/GT จำนวน 9 ราย (ร้อยละ 22.0), TG/TT จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 2.4), GG/GG จำนวน 14 ราย (ร้อยละ 77.8), GG/GT จำนวน 4 ราย (ร้อยละ 22.2) และไม่พบลักษณะจีโนไทป์ GG/TT ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ความถี่ของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

+45T/G (rs2241766)	+276G/T (rs1501299)			Total
	GG genotype	GT genotype	TT genotype	
TT genotype	TT/GG 26 (55.3%)	TT/GT 17 (36.2%)	TT/TT 4 (8.5%)	47 (44.3%)
TG genotype	TG/GG 31 (75.6%)	TG/GT 9 (22.0%)	TG/TT 1 (2.4%)	41 (38.7%)
GG genotype	GG/GG 14 (77.8%)	GG/GT 4 (22.2%)	GG/TT 0 (0.0%)	18 (17.0%)
Total	71 (67.0%)	30 (28.3%)	5 (4.7%)	106 (100%)

สำหรับในกลุ่มควบคุมจำนวน 107 ราย จะพบความถี่ของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) โดยที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT/GG จำนวน 21 ราย (ร้อยละ 19.6), TT/GT จำนวน 26 ราย (ร้อยละ 24.3), TT/TT จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 2.8), TG/GG จำนวน 26 ราย (ร้อยละ 24.3), TG/GT จำนวน 13 ราย (ร้อยละ 12.1), TG/TT จำนวน 6 ราย (ร้อยละ 5.6), GG/GG จำนวน 6 ราย (ร้อยละ 5.6), GG/GT จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 2.8) และลักษณะจีโนไทป์ GG/TT จำนวน 3 ราย (ร้อยละ 2.8) รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ความถี่ของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มควบคุม

+45T/G (rs2241766)	+276G/T (rs1501299)			Total
	GG genotype	GT genotype	TT genotype	
TT genotype	TT/GG 21 (19.6%)	TT/GT 26 (24.3%)	TT/TT 3 (2.8%)	50 (46.7%)
TG genotype	TG/GG 26 (24.3%)	TG/GT 13 (12.1%)	TG/TT 6 (5.6%)	45 (42.1%)
GG genotype	GG/GG 6 (5.6%)	GG/GT 3 (2.8%)	GG/TT 3 (2.8%)	12 (11.2%)
Total	53 (49.5%)	42 (39.3%)	12 (11.2%)	107 (100%)

ผลการเปรียบเทียบทางสถิติ

1. ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin

เมื่อนำข้อมูลจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับในกลุ่มควบคุมมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างในการกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลระหว่างในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ EpiInfo version 6.0 โดยเลือกใช้ค่าสถิติ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P value < 0.05)

ตารางที่ 14 การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง+45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม

	Genotype frequency			Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	TT	TG	GG			
+45T/G (rs2241766) genotypes						
BA patients (n=106)	47 (44.3%)	41 (38.7%)	18 (17.0%)	0.91	0.51-1.61	0.728
Controls (n=107)	50 (46.7%)	45 (42.1%)	12 (11.2%)	1		
	Genotype frequency			Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	GG	GT	TT			
+276G/T (rs1501299) genotypes						
BA patients (n=106)	71 (67.0%)	30 (28.3%)	5 (4.7%)	2.07	1.14-3.74	0.009*
Controls (n=107)	53 (49.5%)	42 (39.3%)	12 (11.2%)	1		

จากตารางที่ 14 แสดงการกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) โดยมีความถี่ของจีโนไทป์ TT ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมและเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าข้อมูลในกลุ่มผู้ป่วยและในกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 44.3 และร้อยละ 46.7, $P = 0.728$, odd ratio = 0.91) และสำหรับการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบความถี่ของจีโนไทป์ GG สูงกว่าในกลุ่มควบคุมและเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 67.0 และร้อยละ 49.5, $P = 0.009$, odd ratio = 2.07)

ตารางที่ 15 การกระจายตัวของอัลลีลของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม

	Allele frequency		Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	T allele	G allele			
+45T/G (rs2241766) genotypes					
BA patients (2n=212)	135 (63.7%)	77 (36.3%)	1.20	0.79-1.83	0.375
Controls (2n=214)	145 (67.8%)	69 (32.3%)	1		
	Allele frequency		Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	G allele	T allele			
+276G/T (rs1501299) genotypes					
BA patients (2n=212)	172* (81.1%)	40 (18.9%)	1.92	1.19-3.08	0.004*
Controls (2n=214)	148 (69.2%)	66 (30.8%)	1		

จากตารางที่ 15 แสดงการกระจายตัวของอัลลีลของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะมีการกระจายตัวของอัลลีลที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) โดยมีความถี่ของอัลลีล T ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมและเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าข้อมูลในกลุ่มผู้ป่วยและในกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 63.7 และร้อยละ 67.8, $P = 0.375$, odd ratio = 1.20) และสำหรับการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบความถี่ของอัลลีล G สูงกว่าในกลุ่มควบคุมและเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 81.1 และร้อยละ 69.2, $P = 0.004$, odd ratio = 1.92)

นอกจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของความถี่จีโนไทป์และอัลลีลระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม คณะผู้วิจัยได้แบ่งกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมโดยอาศัยลักษณะของเพศออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศชายจำนวน 44 ราย, กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศหญิงจำนวน 62 ราย, กลุ่มควบคุมเพศชายจำนวน 42 ราย และกลุ่มควบคุมเพศหญิงจำนวน 65 รายตามลำดับ เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อศึกษาความแตกต่างของความถี่จีโนไทป์และอัลลีลระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศชายกับกลุ่มควบคุมเพศชายและกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศหญิงกับกลุ่มควบคุมเพศหญิง

ตารางที่ 16 การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุมเมื่อแบ่งตามลักษณะของเพศ

	Genotype frequency			Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	TT	TG	GG			
+45T/G (rs2241766) genotypes						
Male BA patients (n=44)	20 (45.5%)	16 (35.4%)	8 (18.2%)	0.83	0.33-2.12	0.673
Male controls (n=42)	21 (50.0%)	15 (35.7%)	6 (43.3%)	1		
Female BA patients (n=62)	27 (43.5%)	25 (40.3%)	10 (16.1%)	0.96	0.45-2.05	0.904
Female controls (n=65)	29 (44.6%)	29 (44.6%)	7 (10.7%)	1		
	Genotype frequency			Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	GG	GT	TT			
+276G/T (rs1501299) genotypes						
Male BA patients (n=44)	23 (54.8%)	13 (30.9%)	6 (14.3%)	1.23	0.57-2.68	0.566
Male controls (n=42)	53 (49.5%)	42 (39.3%)	12 (11.2%)	1		
Female BA patients (n=62)	45* (72.6%)	14 (22.6%)	3 (4.8%)	3.09	1.38-6.95	0.003*
Female controls (n=65)	30 (46.2%)	29** (44.6%)	6 (9.2%)	2.76	1.20-6.43	0.008**

จากตารางที่ 16 แสดงการกระจายของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศชายพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) โดยมีความถี่ของจีโนไทป์ TT ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมเพศชาย เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าข้อมูลในกลุ่มผู้ป่วยเพศ

ชายและในกลุ่มควบคุมเพศชายไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 45.5 และร้อยละ 50.0, $P = 0.673$, odd ratio = 0.83) และในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) มีความถี่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมเพศหญิงเมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 43.5 และร้อยละ 44.6, $P = 0.904$, odd ratio = 0.96) สำหรับการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศชายพบความถี่ของจีโนไทป์ GG สูงกว่าในกลุ่มควบคุมเพศชายและเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 54.8 และร้อยละ 49.5, $P = 0.566$, odd ratio = 1.23) และในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมเพศหญิง เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 72.6 และร้อยละ 46.2, $P = 0.003$, odd ratio = 3.09) นอกจากนี้ยังพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ GT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงมีความถี่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมเพศหญิงเมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 22.6 และร้อยละ 44.6, $P = 0.008$, odd ratio = 2.76)

ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของอัลลีลของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุมเมื่อแบ่งตามลักษณะของเพศ พบว่าการกระจายตัวของอัลลีล T ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศชายมีความถี่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมเพศชาย เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 63.3 และร้อยละ 67.9, $P = 0.560$, odd ratio = 0.83) และในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงพบการกระจายของอัลลีล T ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) มีความถี่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมเพศหญิงเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 63.7 และร้อยละ 66.9, $P = 0.590$, odd ratio = 0.87) สำหรับการกระจายตัวของอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ผลการวิเคราะห์พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศชายมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมเพศชาย เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 77.3 และร้อยละ 70.2, $P = 0.294$, odd ratio = 1.44) และในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงพบการกระจายตัวของอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมเพศหญิงเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 83.9 และร้อยละ 68.5, $P = 0.004$, odd ratio = 2.40) ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุมเมื่อแบ่งตามลักษณะของเพศ

	Allele frequency		Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	T allele	G allele			
+45T/G (rs2241766) genotypes					
Male BA patients (2n=88)	56 (63.3%)	32 (36.4%)	0.83	0.79-1.83	0.560
Male controls (2n=84)	57 (67.9%)	27 (32.1%)	1		
Female BA patients (2n=124)	79 (63.7%)	45 (36.3%)	0.87	0.50-1.50	0.590
Female controls (2n=130)	87 (66.9%)	43 (33.1%)	1		
	Allele frequency		Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	G allele	T allele			
+276G/T (rs1501299) genotypes					
Male BA patients (2n=88)	68 (77.3%)	20 (22.7%)	1.44	0.69-3.02	0.294
Male controls (2n=84)	59 (70.2%)	25 (29.8%)	1		
Female BA patients (2n=124)	104 (83.9%)	20 (16.1%)	2.40	1.26-4.59	0.004*
Female controls (2n=130)	89 (68.5%)	41 (31.5%)	1		

ผลการศึกษาดังกล่าวเป็นการวิเคราะห์การกระจายของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันซึ่งได้แบ่งกลุ่มผู้ป่วยโดยอาศัยค่าของ total bilirubin (TB) ใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองจำนวน 39 ราย (Jaundice, $TB \geq 2.0$ mg/dl) และกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลืองจำนวน 67 ราย (No jaundice, $TB < 2.0$ mg/dl) ข้อมูลจากการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองและในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง

	Genotype frequency			Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	TT	TG	GG			
+45T/G (rs2241766) genotypes						
Jaundice (n=39)	17 (43.6%)	16 (41%)	6 (15.4%)	0.95	0.40-2.28	0.906
No jaundice (n=67)	30 (44.8%)	25 (37.3%)	12 (17.9%)	1		
	Genotype frequency			Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	GG	GT	TT			
+276G/T (rs1501299) genotypes						
Jaundice (n=39)	31 (79.5%)	8 (20.5%)	0 (0.0%)	2.62	0.96-7.28	0.060
No jaundice (n=67)	40 (59.7%)	22 (32.8%)	5 (7.5%)	1		

จากตารางที่ 18 แสดงการกระจายของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ผลจากการวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) โดยมีความถี่ต่ำกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 43.6 และร้อยละ 44.8, $P = 0.906$, odd ratio = 0.95) สำหรับที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) พบการกระจายตัวของจีโนไทป์ GG ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 79.5 และร้อยละ 59.7, $P = 0.060$, odd ratio = 2.62)

ตารางที่ 19 การกระจายตัวของอัลลีลของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง+45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลือง และในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง

	Allele frequency		Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	T allele	G allele			
+45T/G (rs2241766) genotypes					
Jaundice (2n=78)	50 (64.1%)	28 (35.9%)	1.03	0.55-1.92	0.922
No jaundice (2n=134)	85 (63.4%)	49 (36.6%)	1		
	Genotype		Odd ratio (OR)	95% CI	P value
	G allele	T allele			
+276G/T (rs1501299) genotypes					
Jaundice (2n=78)	70 (89.7%)	8 (10.3%)	1		
No jaundice (2n=134)	102* (76.1%)	32 (23.9%)	0.36	0.14-0.89	0.014*

จากตารางที่ 19 แสดงการกระจายของอัลลีลของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ผลจากการวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองมีการกระจายตัวของอัลลีล T ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) โดยมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 64.1 และร้อยละ 63.4, $P = 0.922$, odd ratio = 1.03) สำหรับที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) พบการกระจายตัวของอัลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองซึ่งมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 89.7 และร้อยละ 76.1, $P = 0.014$, odd ratio = 0.36)

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายพันธุกรรมของยีน adiponectin จำนวน 2 ตำแหน่ง คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลการกระจายตัวของจีโนไทป์ของทั้ง 2 ตำแหน่งดังกล่าวในลักษณะที่เรียกว่า haplotype block และการวิเคราะห์ linkage disequilibrium (LD) เพื่อศึกษาว่าอัลลีลที่อยู่คนละตำแหน่งบนโครโมโซมเดียวกัน มีโอกาสถ่ายทอดไปด้วยกันมากกว่าหรือน้อยกว่าค่าคาดหวัง ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ haploview version 4.2 ผลจากการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 การกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) แบบ haplotype block

Haplotype	BA patients (2n=212)	Controls (2n=214)	Chi-square	P value	Empirical P value
TG	104 (49.1%)	99 (46.3%)	0.274	0.601	0.945
GG	68 (27.6%)	50 (23.4%)	4.752	0.029*	0.116
TT	32 (18.2%)	46 (21.5%)	3.129	0.076	0.258
GT	8 (6.7%)	20 (9.4%)	4.897	0.027*	0.105

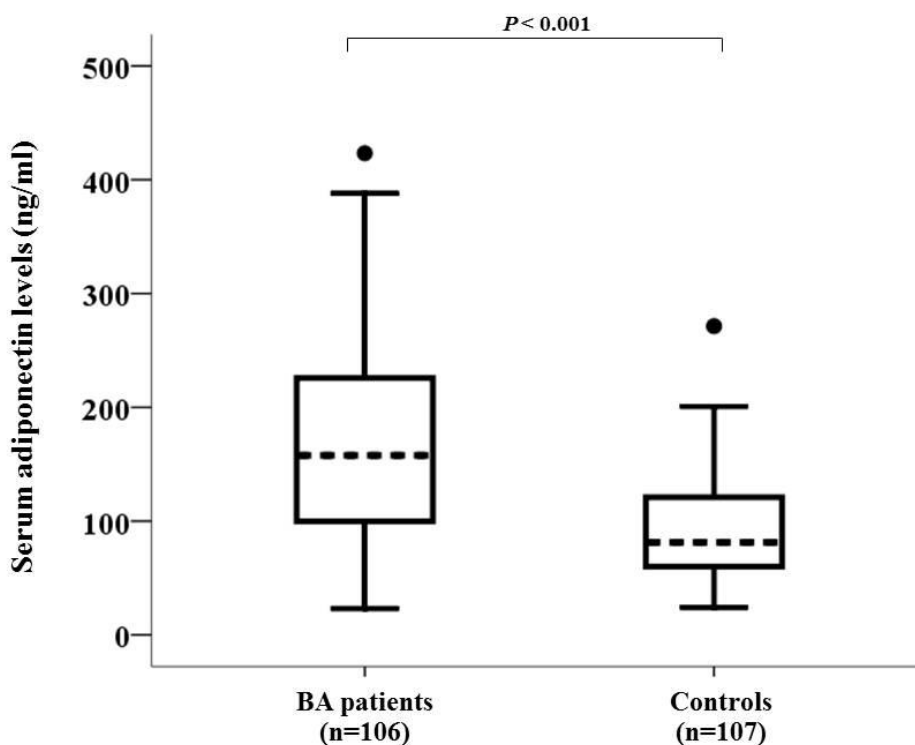
จากตารางที่ 20 แสดงการกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม เมื่อทำการวิเคราะห์ในลักษณะ haplotype block พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ในแบบ haplotype ที่มีลักษณะ +45 T- และ +276 G- (TG) ความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุม (ร้อยละ 49.1 และร้อยละ 46.3) และพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ในแบบ haplotype ที่มีลักษณะ +45 G-/ +276 G- (GG), ลักษณะ +45 T-/ +276 T- (TT) และลักษณะ +45 G-/ +276 T- (GT) ความถี่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม (GG; ร้อยละ 27.6 กับ ร้อยละ 23.4, TT; ร้อยละ 18.2 กับ ร้อยละ 21.5 และ GT; ร้อยละ 6.7 กับ ร้อยละ 9.4 ตามลำดับ) เมื่อนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การกระจายตัวของจีโนไทป์ในแบบ haplotype +45 G-/ +276 G- (GG) และ +45 G-/ +276 T- (GT) มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (GG; $P = 0.029$, GT; $P = 0.027$) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์หลังจากการทดสอบด้วย 100,000 permutation test พบว่า 2 ลักษณะ haplotype ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (GG; Empirical P value = 0.116, GT; Empirical P value = 0.105)

สำหรับการวิเคราะห์ linkage disequilibrium (LD) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ต่อโอกาสในการถ่ายทอดไปด้วยกัน ผลการวิเคราะห์พบว่าที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) อัลลีลที่อยู่บนยีน adiponectin ของทั้ง 2 ตำแหน่งนี้ไม่มีโอกาสในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกัน ($D' = 0.214$, $r^2 = 0.008$)

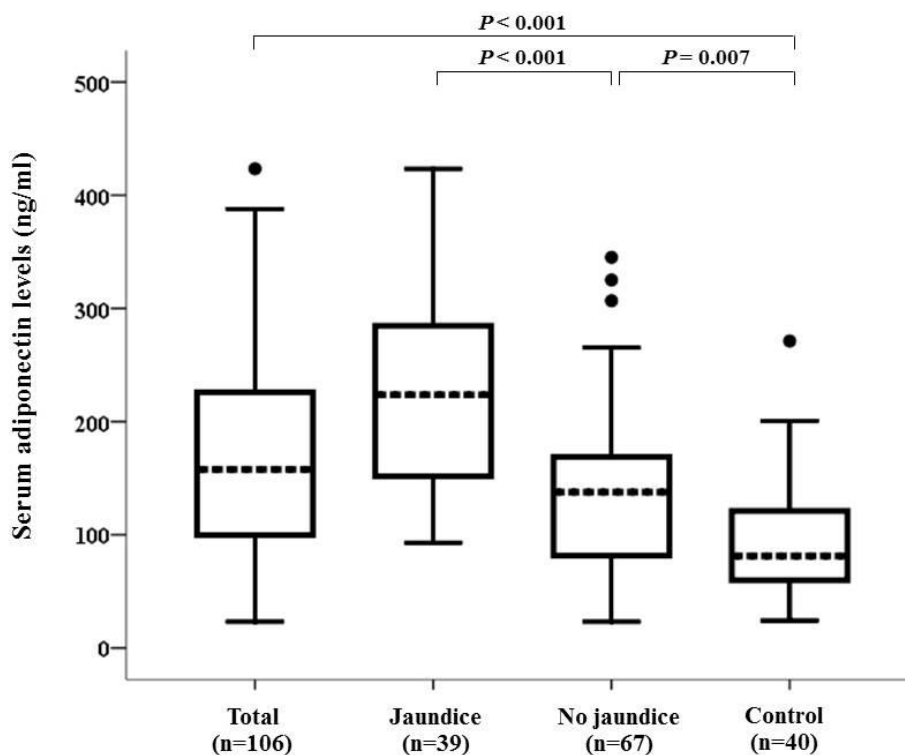
2. ผลการวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin

คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 106 ราย และในกลุ่มควบคุมจำนวน 40 ราย ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ต่อจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อศึกษาความแตกต่างของระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS statistical package version 17.0 ด้วยการทดสอบทางสถิติ Student's unpaired *t*-test และ Bonferoni One way ANOVA

ผลการวิเคราะห์พบว่าซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมและเมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยค่าสถิติ Student's unpaired *t*-test พบว่าระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (172.8 ± 90.8 ng/ml และ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P < 0.001$) ดังแสดงในรูปภาพที่ 20



รูปภาพที่ 20 กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม



รูปภาพที่ 21 กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลือง ผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง และกลุ่มควบคุม

จากรูปภาพที่ 21 ข้อมูลจากกราฟ box plot สามารถอธิบายได้ว่าระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองจำนวน 39 ราย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 229.6 ± 89.0 ng/ml และในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลืองจำนวน 67 ราย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 139.7 ± 74.5 ng/ml เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองสูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลืองอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.001$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองกับกลุ่มควบคุม พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (229.6 ± 89.0 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P < 0.001$) เช่นเดียวกันกับในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลืองพบระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (139.7 ± 74.5 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P = 0.007$)

เพื่อศึกษาผลของระดับเอนไซม์ ALT ที่มีต่อโปรตีน adiponectin ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจึงได้ทำการวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยแบ่งผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง (High ALT, ระดับ ALT \geq 45 IU/L) และกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ (Normal ALT, ระดับ ALT $<$ 45 IU/L) สำหรับข้อมูลลักษณะทั่วไปและอาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทั้ง 2 กลุ่ม แสดงในตารางที่ 21

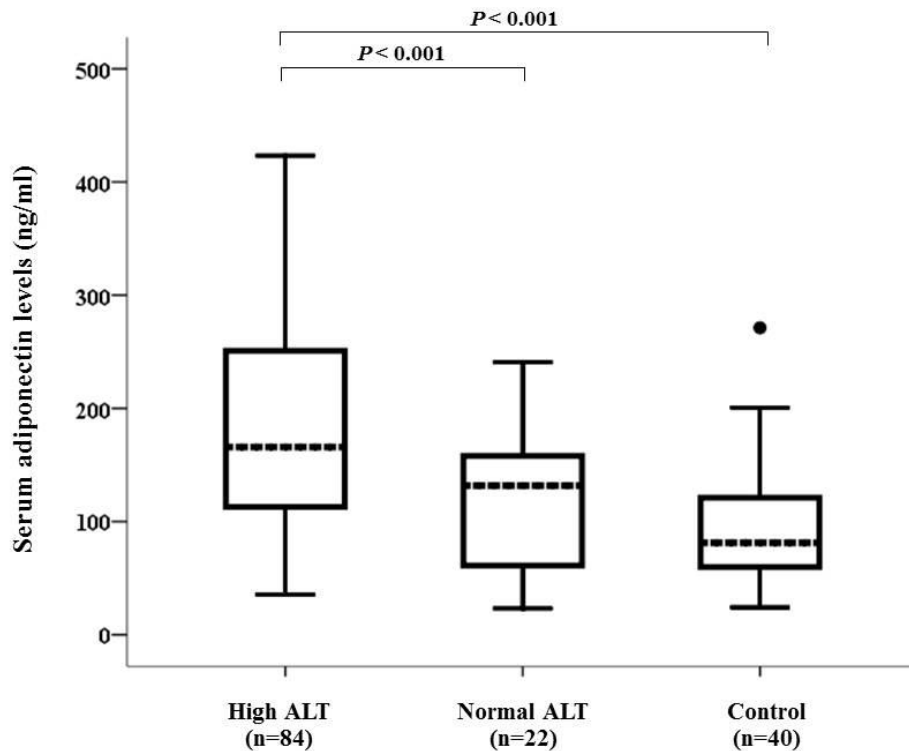
ตารางที่ 21 ข้อมูลลักษณะทั่วไปและอาการทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง และกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ

	High ALT (ALT \geq 45 IU/L)	Normal ALT (ALT $<$ 45 IU/L)	P value
N (M/F)	84 (40/44)	22 (4/18)	
Age (years)	5.6 \pm 5.0	6.5 \pm 3.5	
Serum adiponectin (ng/ml)	187.2 \pm 91.8	117.6 \pm 62.8	< 0.001
AST (IU/L)	163.2 \pm 101.1	37.9 \pm 9.8	< 0.001
ALT (IU/L)	146.5 \pm 93.7	27.9 \pm 8.2	< 0.001
ALP (IU/L)	524.4 \pm 269.7	238.5 \pm 150.9	< 0.001
γ -GGT (IU/L)	355.7 \pm 337.9	51.0 \pm 48.8	< 0.001
TB (mg/dl)	5.36 \pm 7.66	1.3 \pm 3.4	< 0.001
DB (mg/dl)	4.18 \pm 6.40	1.8 \pm 6.0	0.113
Total protein (g/dl)	6.86 \pm 0.70	7.3 \pm 0.5	0.021
Albumin (g/dl)	4.11 \pm 0.69	4.7 \pm 0.4	0.003

จากตารางที่ 21 แสดงข้อมูลทั่วไปและลักษณะอาการทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง (High ALT) และในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ (Normal ALT) พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง จำนวน 84 ราย เป็นเพศชายจำนวน 40 ราย และเพศหญิงจำนวน 44 ราย มีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 5.6 \pm 5.0 ปี และในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ จำนวน 22 ราย เป็นเพศชายจำนวน 4 ราย และเพศหญิงจำนวน 18 ราย มีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 6.5 \pm 3.5 ปี สำหรับผลตรวจทางห้องปฏิบัติการที่บ่งบอกลักษณะอาการทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง เปรียบเทียบกับในกลุ่มผู้ป่วย

ที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง มีระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST), เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT), เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), เอนไซม์ gamma-glutamyl transferase (γ -GGT), ค่า total bilirubin (TB), และค่า total protein สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ และเมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบทางสถิติ Student's unpaired *t*-test พบว่าข้อมูลของทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (AST; 163.2 ± 101.1 IU/L กับ 37.9 ± 9.8 IU/L, $P < 0.001$, ALT; 146.5 ± 93.7 IU/L กับ 27.9 ± 8.2 IU/L, $P < 0.001$, ALP; 524.4 ± 269.7 IU/L กับ 238.5 ± 150.9 IU/L, $P < 0.001$, γ -GGT; 355.7 ± 337.9 IU/L กับ 51.0 ± 48.8 IU/L, $P < 0.001$, TB; 5.36 ± 7.66 mg/dl กับ 1.3 ± 3.4 mg/dl, $P < 0.001$ และ Total protein; 6.86 ± 0.70 g/dl กับ 7.3 ± 0.5 g/dl, $P = 0.021$ ตามลำดับ) สำหรับระดับโปรตีน albumin ในผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง มีค่าต่ำกว่าในผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (4.11 ± 0.69 g/dl กับ 4.7 ± 0.4 g/dl, $P = 0.003$)

สำหรับผลการตรวจวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง และกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ ผลการทดสอบพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง มีระดับโปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 187.2 ± 91.8 ng/ml และในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ มีระดับโปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 117.6 ± 62.8 ng/ml เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (187.2 ± 91.8 ng/ml กับ 117.6 ± 62.8 ng/ml, $P < 0.001$) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (187.2 ± 91.8 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P < 0.001$) และสำหรับในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมแต่ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (117.6 ± 62.8 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P = 0.783$) ดังแสดงในรูปภาพที่ 22

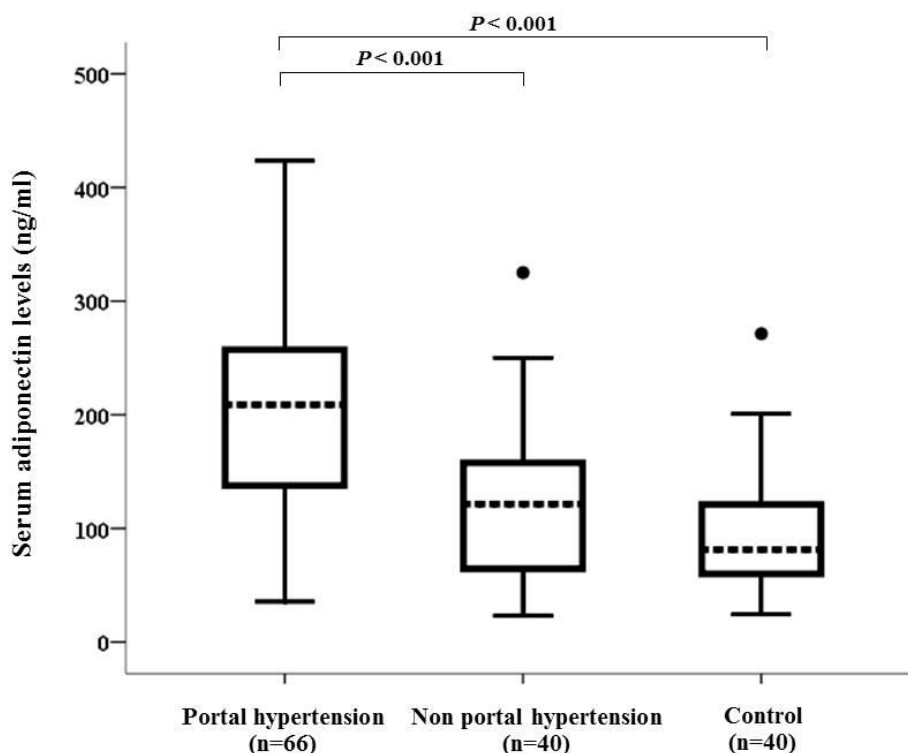


รูปภาพที่ 22 กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง ผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ และกลุ่มควบคุม

นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยยังได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีภาวะความดันพอร์ทัลสูงในหลอดเลือดดำของตับ (Portal hypertension) กับกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีภาวะความดันพอร์ทัลสูงในหลอดเลือดดำของตับ (Non-portal hypertension) เนื่องจากภาวะความดันพอร์ทัลสูงในหลอดเลือดดำของตับ (Portal hypertension) เป็นภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตับแข็งเกิดขึ้นร่วมด้วย และการศึกษาครั้งนี้ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีผู้ป่วยที่เกิดภาวะ portal hypertension จำนวน 66 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เกิดภาวะ portal hypertension (Non-portal hypertension) จำนวน 40 ราย

ผลจากการวิเคราะห์พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดภาวะ portal hypertension มีระดับโปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 207.0 ± 90.2 ng/ml และในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่เกิดภาวะ portal hypertension มีระดับโปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 118.5 ± 62.1 ng/ml เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เกิด

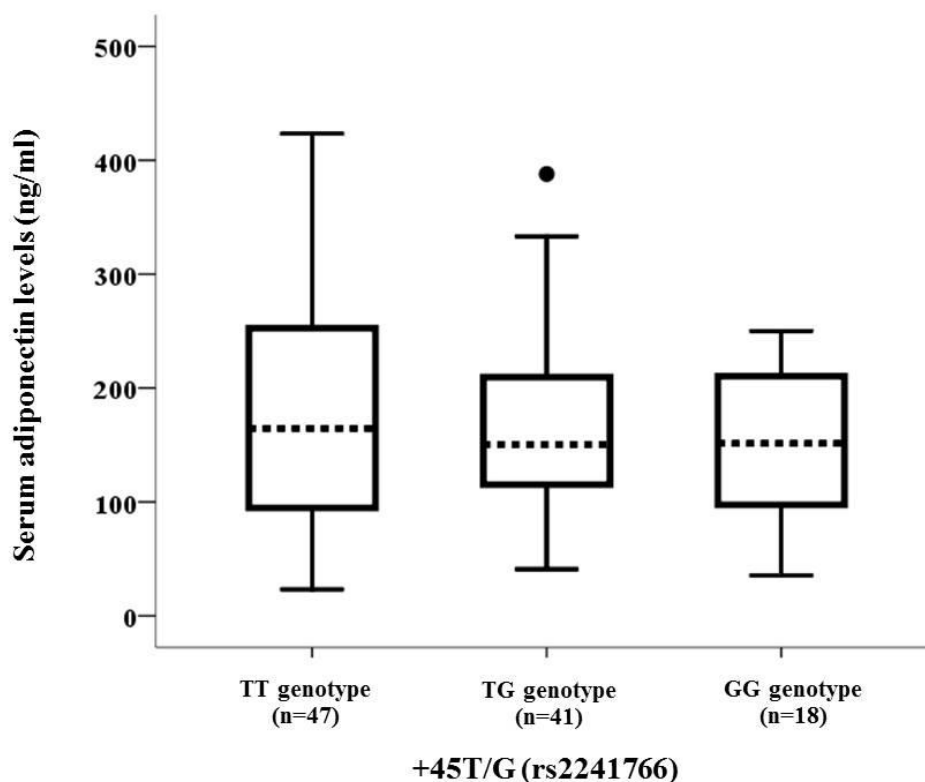
ภาวะ portal hypertension มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่เกิดภาวะ portal hypertension อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (207.0 ± 90.2 ng/ml กับ 118.5 ± 62.1 ng/ml, $P < 0.001$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบระดับโปรตีน adiponectin กับในกลุ่มควบคุมพบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่เกิดภาวะ portal hypertension มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (207.0 ± 90.2 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P < 0.001$) และสำหรับในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เกิดภาวะ portal hypertension มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (118.5 ± 62.1 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P = 0.420$) ข้อมูลแสดงในรูปภาพที่ 23



รูปภาพที่ 23 กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดภาวะ portal hypertension, กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่เกิดภาวะ portal hypertension, และกลุ่มควบคุม

สำหรับผลการการวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน adiponectin กับลักษณะจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วย

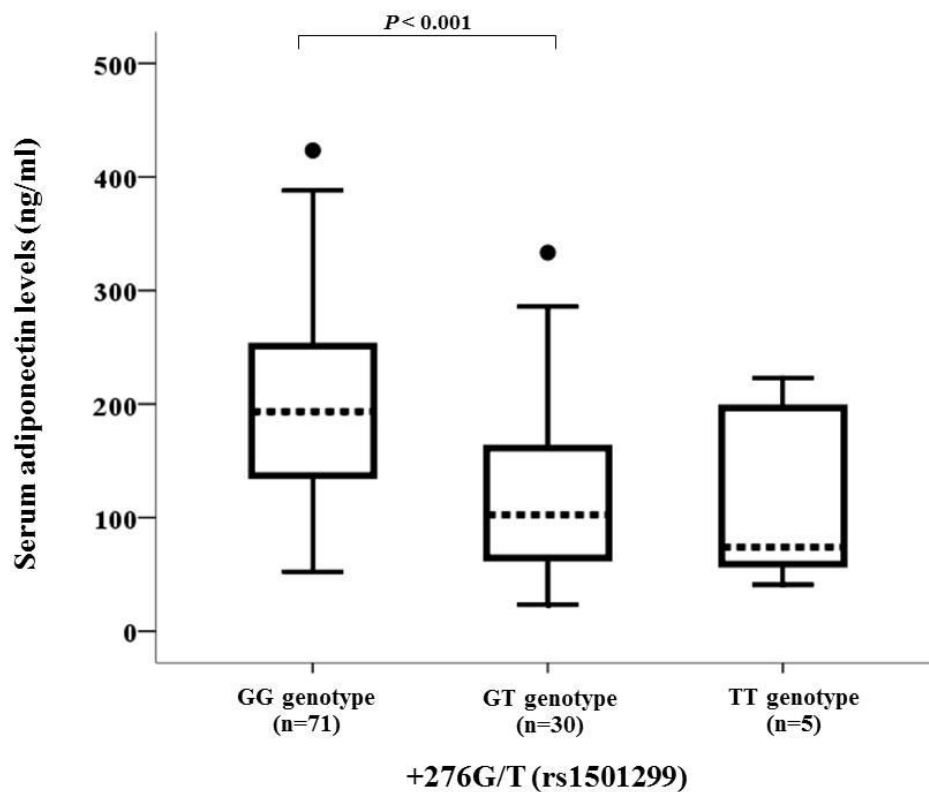
โรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 106 ราย ด้วยการทดสอบทางสถิติ Bofferoni One-way ANOVA ผลการวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 47 ราย พบลักษณะจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) มีระดับโปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 186.4 ± 104.1 ng/ml ลักษณะจีโนไทป์ TG จำนวน 41 ราย มีระดับโปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 167.0 ± 82.1 ng/ml และลักษณะจีโนไทป์ GG จำนวน 18 ราย มีระดับโปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 150.4 ± 68.3 ng/ml เมื่อนำข้อมูลของทั้ง 3 กลุ่มไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (TT ; 186.4 ± 104.1 ng/ml กับ TG; 167.0 ± 82.1 ng/ml กับ GG; 150.4 ± 68.3 ng/ml, $P = 0.318$) ข้อมูลดังแสดงในรูปภาพที่ 24



รูปภาพที่ 24 กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีลักษณะจีโนไทป์ TT, TG และ GG ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766)

สำหรับที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 71 ราย ที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG มีระดับโปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 197.9 ± 86.5 ng/ml ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GT จำนวน 30 ราย มีระดับโปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 122.1 ± 78.5 ng/ml และกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ TT จำนวน 5 ราย มีระดับ

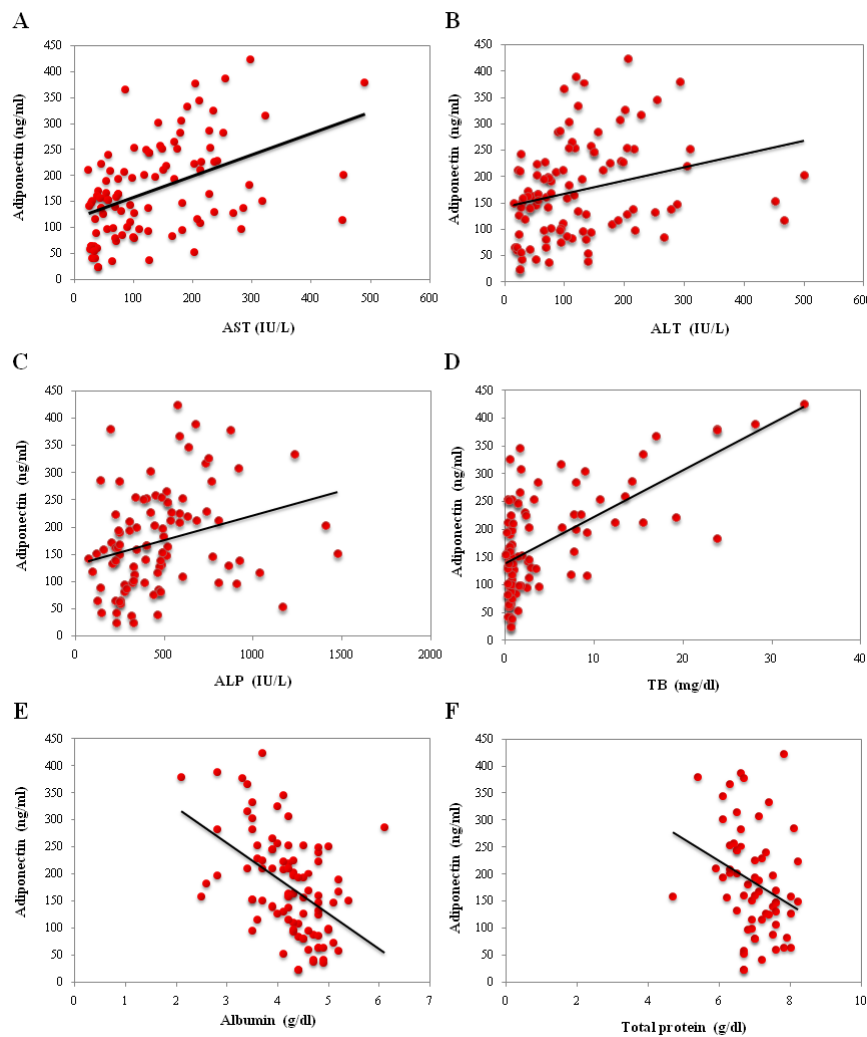
โปรตีน adiponectin ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 118.8 ± 84.5 ng/ml เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (197.9 ± 86.5 ng/ml กับ 122.1 ± 78.5 ng/ml, $P < 0.001$) แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบกับในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ TT ผลการวิเคราะห์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (197.9 ± 86.5 ng/ml กับ 118.8 ± 84.5 ng/ml, $P = 0.134$) และระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GT กับลักษณะจีโนไทป์ TT พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (122.1 ± 78.5 ng/ml กับ 118.8 ± 84.5 ng/ml, $P = 1.000$) ข้อมูลดังแสดงในรูปภาพที่ 25



รูปภาพที่ 25 กราฟ box plot แสดงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG, GT และ TT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs150299)

จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน adiponectin กับผลตรวจเลือดทางชีวเคมีที่บ่งชี้ลักษณะอาการทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ของตัวแปรทั้ง 2 ด้วยกราฟ correlation analysis

และวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบทางสถิติ Pearson's correlation ผลจากการวิเคราะห์พบว่าระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีความสัมพันธ์ที่เป็นไปในแนวทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST; $r = 0.626$, $P < 0.001$), ระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT; $r = 0.344$, $P < 0.001$), alkaline phosphatase (ALP; $r = 0.335$, $P = 0.001$) และระดับ total bilirubin (TB; $r = 0.626$, $P < 0.001$) ในทางตรงกันข้ามจะพบความสัมพันธ์ของระดับโปรตีน adiponectin ในลักษณะแปรผกผันกับระดับโปรตีน albumin และระดับ total protein ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (albumin; $r = -0.508$, $P < 0.001$ และ protein; $r = -0.355$, $P = 0.004$) ดังแสดงในรูปภาพที่ 26



รูปภาพที่ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับลักษณะอาการทางคลินิก

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นผลที่เกิดจากบริเวณท่อน้ำดีเกิดการอักเสบ ทำให้เกิดการตีบตันไม่สามารถระบายน้ำดีได้ ส่งผลทำให้เกิดการคั่งสะสมของน้ำดีในตับ สำหรับสาเหตุของการอักเสบที่เกิดขึ้นนั้นยังไม่สามารถระบุได้ว่ามีสาเหตุจากปัจจัยใดที่กระตุ้นทำให้เกิดลักษณะอาการดังกล่าว เมื่อมีน้ำดีสะสมที่ตับมากขึ้นจะก่อให้เกิดพังผืดสะสมในตับ (liver fibrosis) และพัฒนาไปสู่การเกิดภาวะตับแข็งได้ [2] มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง inflammatory cells กับการเกิดพยาธิสภาพบริเวณ bile ducts ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า inflammatory cells มีบทบาทในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน [74,75] ดังนั้นการศึกษบทบาทของโมเลกุลที่ตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบอาจจะทำให้เราสามารถอธิบายสาเหตุของเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ชัดเจนขึ้น

สำหรับโปรตีน adiponectin จัดเป็น adipokine ที่หลั่งมากจากเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) มีบทบาทในการต่อต้านการเกิดการอักเสบ (anti-inflammatory) โดยที่ adiponectin จะสามารถยับยั้งกระบวนการสร้าง pro-inflammatory cytokines เช่น TGF- α และ IL-6 รวมทั้งมีผลไปกระตุ้นการแสดงออกของ anti-inflammatory cytokines เช่น IL-10 และ IL-1 receptor antagonist [76,77] นอกจากนี้ adiponectin จะไปลดการแสดงออกของ adhesion molecules โดยไปยับยั้งการเกาะติดภายในเซลล์ของ intracellular adhesion molecule-1 กระบวนการดังกล่าวมีผลทำให้เซลล์เกิดการอักเสบน้อยลง [76] จากปัจจัยข้างต้นทำให้คณะผู้วิจัยเชื่อว่าโปรตีน adiponectin น่าจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) บริเวณ exon 2 และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 106 ราย กับกลุ่มควบคุมผู้ที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 107 ราย ผลการศึกษาพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT จำนวน 47 ราย (ร้อยละ 44.3), จีโนไทป์ TG จำนวน 41 ราย (ร้อยละ 38.7) และจีโนไทป์ GG จำนวน 18 ราย (ร้อยละ 17) ตามลำดับ สำหรับในกลุ่มควบคุมจำนวน 107 ราย มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT จำนวน 50 ราย (ร้อยละ 46.7), จีโนไทป์ TG จำนวน 45 ราย (ร้อยละ 42.1) และจีโนไทป์ GG จำนวน 12 ราย (ร้อยละ

11.2) ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบทางสถิติ Chi-square พบว่า ข้อมูลของทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P > 0.05$, odd ratio = 0.91) สำหรับการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบลักษณะจีโนไทป์ GG จำนวน 71 ราย (ร้อยละ 67), จีโนไทป์ GT จำนวน 30 (ร้อยละ 28.3) และจีโนไทป์ TT จำนวน 5 ราย (ร้อยละ 4.7) ในกลุ่มควบคุมพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ GG จำนวน 53 ราย (ร้อยละ 49.5) จีโนไทป์ GT จำนวน 42 ราย (ร้อยละ 39.3) และจีโนไทป์ TT จำนวน 12 ราย (ร้อยละ 11.2) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบทางสถิติ Chi-square พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบความถี่ของจีโนไทป์ GG สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P = 0.009$, odd ratio = 2.07) สำหรับการวิเคราะห์เพื่อศึกษาความแตกต่างของการกระจายของอัลลีลในยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มควบคุม พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการกระจายของอัลลีล T ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ความถี่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม แต่เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 63.7 และร้อยละ 67.8, $P > 0.05$, odd ratio = 1.20) สำหรับที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) พบการกระจายตัวของอัลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 81.1 และร้อยละ 69.2, $P = 0.004$, odd ratio = 1.92)

เมื่อทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุมโดยแบ่งตามลักษณะทางเพศ พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศหญิงพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 72.6 และร้อยละ 46.2, $P = 0.003$, odd ratio = 3.09) นอกจากนี้ยังพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ GT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงมีความถี่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 22.6 และร้อยละ 44.6, $P = 0.008$, odd ratio = 2.76) สำหรับการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าข้อมูลระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทั้งในเพศชายและเพศหญิงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งในเพศชายและเพศหญิงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (เพศชาย; ร้อยละ 45.5 และร้อยละ 50.0, $P = 0.673$, odd ratio = 0.83, เพศหญิง; ร้อยละ 43.5 และร้อยละ 44.6, $P = 0.904$, odd ratio = 0.96) เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่พบว่าการกระจายตัวของอัลลีล T ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยเพศชายและเพศหญิงเมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับในกลุ่ม

ควบคุมทั้งเพศชายและเพศหญิง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (เพศชาย; ร้อยละ 63.3 และร้อยละ 67.9, $P = 0.560$, odd ratio = 0.83, เพศหญิง; ร้อยละ 63.7 และร้อยละ 66.9, $P = 0.590$, odd ratio = 0.87) สำหรับการกระจายตัวของอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 83.9 และร้อยละ 68.5, $P = 0.004$, odd ratio = 2.40) และการกระจายตัวของอัลลีล G ในผู้ป่วยเพศชายเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมเพศชาย ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 77.3 และร้อยละ 70.2, $P = 0.294$, odd ratio = 1.44)

สำหรับการวิเคราะห์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองกับผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 43.6 และร้อยละ 44.8, $P = 0.906$, odd ratio = 0.95) และการกระจายตัวของอัลลีล T ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ที่พบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 64.1 และร้อยละ 63.4, $P = 0.922$, odd ratio = 1.03) สำหรับการกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีการกระจายของจีโนไทป์ GG ความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 79.5 และร้อยละ 59.7, $P = 0.060$, odd ratio = 2.62) และพบว่าการกระจายตัวของอัลลีล G ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 89.7 และร้อยละ 76.1, $P = 0.014$, odd ratio = 0.36)

จากนั้นคณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลการกระจายตัวของจีโนไทป์ระหว่างตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในลักษณะที่เรียกว่า haplotype block และการวิเคราะห์ linkage disequilibrium (LD) ผลการวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ในแบบ haplotype +45 G-/ +276 G- (GG) และ +45 G-/ +276 T- (GT) ความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (GG; ร้อยละ 27.6 กับ ร้อยละ 23.4, $P = 0.029$, GT; ร้อยละ 6.7 กับ ร้อยละ

9.4, $P = 0.027$) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์หลังจากการทดสอบด้วย 100,000 permutation test พบว่า 2 ลักษณะ haplotype ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (GG; Empirical P value = 0.116, GT; Empirical P value = 0.105) สำหรับการวิเคราะห์ linkage disequilibrium (LD) พบว่าที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) อัลลีลที่อยู่บนยีน adiponectin ของทั้ง 2 ตำแหน่งนี้ไม่มีโอกาสในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกัน ($D' = 0.214$, $r^2 = 0.008$)

ผลการตรวจวัดระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จำนวน 106 ราย และในกลุ่มควบคุมจำนวน 40 ราย พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (172.8 ± 90.8 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P < 0.001$) และเมื่อทำการวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองและกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (229.6 ± 89.0 ng/ml กับ 139.7 ± 74.5 ng/ml, $P < 0.001$) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (229.6 ± 89.0 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P < 0.001$) เช่นเดียวกับในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลืองพบระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (139.7 ± 74.5 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P = 0.007$)

สำหรับผลการตรวจวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง และกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (187.2 ± 91.8 ng/ml กับ 117.6 ± 62.8 ng/ml, $P < 0.001$) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT สูง มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (187.2 ± 91.8 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P < 0.001$) และในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระดับเอนไซม์ ALT ปกติ มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (117.6 ± 62.8 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P = 0.783$)

ถัดมาเป็นการวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดภาวะ portal hypertension และในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่เกิดภาวะ portal hypertension พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดภาวะ portal hypertension มีระดับ

โปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่เกิดภาวะ portal hypertension อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (207.0 ± 90.2 ng/ml กับ 118.5 ± 62.1 ng/ml, $P < 0.001$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบระดับโปรตีน adiponectin กับในกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มผู้ป่วยที่เกิดภาวะ portal hypertension มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (207.0 ± 90.2 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P < 0.001$) และในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เกิดภาวะ portal hypertension มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุม เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (118.5 ± 62.1 ng/ml กับ 93.9 ± 53.4 ng/ml, $P = 0.420$)

สำหรับผลการวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน adiponectin กับ ลักษณะจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีลักษณะจีโนไทป์ TT, TG และ GG ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ระดับโปรตีน adiponectin ของทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (TT; 186.4 ± 104.1 ng/ml กับ TG; 167.0 ± 82.1 ng/ml กับ GG; 150.4 ± 68.3 ng/ml, $P = 0.318$) และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (197.9 ± 86.5 ng/ml กับ 122.1 ± 78.5 ng/ml, $P < 0.001$) แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบกับในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ TT ผลการวิเคราะห์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (197.9 ± 86.5 ng/ml กับ 118.8 ± 84.5 ng/ml, $P = 0.134$) และระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GT และลักษณะจีโนไทป์ TT พบว่าข้อมูลทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (122.1 ± 78.5 ng/ml กับ 118.8 ± 84.5 ng/ml, $P = 1.000$)

สุดท้ายคณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin กับผลตรวจเลือดทางชีวเคมีที่บ่งชี้ลักษณะอาการทางคลินิกในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่าระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีความสัมพันธ์ที่เป็นไปในแนวทางเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST; $r = 0.626$, $P < 0.001$), ระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT; $r = 0.344$, $P < 0.001$), alkaline phosphatase (ALP; $r = 0.335$, $P = 0.001$) และระดับ total bilirubin (TB; $r = 0.626$, $P < 0.001$) ในทางตรงกันข้ามจะพบความสัมพันธ์ของระดับโปรตีน adiponectin ในลักษณะแปรผกผันกับระดับโปรตีน albumin และระดับ total protein ซึ่ง

ลักษณะดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (albumin; $r = -0.508$, $P < 0.001$ และ protein; $r = -0.355$, $P = 0.004$)

อภิปรายผลการวิจัย

ผลจากการวิเคราะห์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่าการกระจายตัวของลักษณะจีโนไทป์ GG และอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่การกระจายตัวของลักษณะจีโนไทป์ TT และอัลลีล T ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและกลุ่มควบคุม มีรายการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ชาวญี่ปุ่น พบว่าลักษณะจีโนไทป์ GG และอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวานประเภทที่ 2 [78] และรายงานการศึกษาของ Tokushige et al. [67] พบว่าในกลุ่มผู้ป่วย non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) ที่เกิดภาวะพังผืดสะสมระดับในระดับที่รุนแรง (severe fibrosis) มีการกระจายตัวของลักษณะจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) ความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่เกิดภาวะพังผืดสะสมระดับในระดับปานกลาง (mild fibrosis group) แม้ว่าการศึกษาของ Musso et al. [68] จะพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) มีความถี่สูงในกลุ่มผู้ป่วยโรค NAFLD ชาวอิตาลีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุมผู้ที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรค NAFLD อย่างไรก็ตามสิ่งที่พบจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลักษณะจีโนไทป์ GG และอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) อาจมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) อาจจะไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

จากตัวเลขรายงานอุบัติการณ์ของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่พบน้อย มีสัดส่วนในการเกิดโรคประมาณ 1-1.5:10,000 และผู้ป่วยที่เป็นเพศหญิงจะมีโอกาสในการเกิดโรคมากกว่าในเพศชาย [74] จากการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันเพศหญิงพบการกระจายตัวของลักษณะจีโนไทป์ GG และอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่การกระจายตัวของลักษณะจีโนไทป์ GT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีความถี่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ

ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าลักษณะจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดภาวะ polycystic ovary syndrome และโรคเบาหวานประเภทที่ 2 ในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิง [79, 80] นอกจากนี้ การศึกษาของ Tokushige et al. [67] ได้รายงานไว้ในกลุ่มผู้ป่วย NAFLD เพศหญิงจะพบ ลักษณะจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ผลการศึกษาที่พบในครั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่า ลักษณะจีโนไทป์ GG และอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) อาจจะมีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในผู้ป่วยเพศหญิง และลักษณะจีโนไทป์ GT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ที่พบในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงอาจจะมีผลในการป้องกันการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันได้

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดภาวะ cholestasis กับลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองและกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง ผลการวิเคราะห์พบว่าการกระจายตัวของอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ cholestasis ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลือง ถึงแม้ว่าลักษณะจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ไม่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดภาวะ cholestasis ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลือง อาจเป็นไปได้ว่าในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จำนวนผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีจำนวนน้อยเกินไป ทำให้เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติจึงไม่พบความแตกต่างระหว่างข้อมูลทั้ง 2 กลุ่ม สิ่งที่น่าสนใจจากผลการวิเคราะห์ครั้งนี้คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองจะไม่พบการกระจายตัวของลักษณะจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299)

ถัดมาคณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจวิเคราะห์ระดับโปรตีน adiponectin ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและทำการเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วย chronic liver disease (CLD) เช่น การศึกษาของ Tietge et al. [81] รายงานว่าระดับโปรตีน adiponectin จะเพิ่มขึ้นสูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วย advanced cirrhosis ผลจากการศึกษา Tietge et al. สรุปว่าระดับโปรตีน adiponectin ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค chronic liver disease (CLD) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tacke et al. [82] พบว่าระดับโปรตีน adiponectin จะเพิ่มขึ้นในผู้ป่วย CLD และมีความสัมพันธ์กับการกระบวนการอักเสบและการที่ตับถูกทำลายได้รับความเสียหาย นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่เกิดภาวะ cholestatic จะพบระดับโปรตีน adiponectin สูง ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่ากระบวนการกำจัดน้ำดีมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับบทบาทของ adiponectin จากรายงานการศึกษาดังกล่าวได้สนับสนุนผลการศึกษาที่พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะมีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มี

อาการตัวเหลืองจะมีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง จากผลการวิจัยที่พบสามารถอธิบายได้ว่า โปรตีน adiponectin อาจจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับโปรตีน adiponectin กับพารามิเตอร์ที่ใช้บ่งชี้การเกิดภาวะ hepatic injury และภาวะ cholestasis พบว่าระดับโปรตีน adiponectin มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับระดับเอนไซม์ AST, ALT, ALP และระดับ total bilirubin ในทางตรงข้ามจะพบความสัมพันธ์ของระดับโปรตีน adiponectin จะแปรผกผันกับระดับโปรตีน albumin และระดับ total protein ผลการวิเคราะห์ที่ได้สนับสนุนแนวคิดที่ว่าระดับของโปรตีน adiponectin มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับลักษณะอาการทางคลินิกที่ใช้บ่งบอกการเกิดภาวะ cholestasis ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน และการที่พบความสัมพันธ์ของระดับโปรตีน adiponectin ที่แปรผกผันกับระดับของโปรตีน albumin และระดับ total protein สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถของตับในการสังเคราะห์โปรตีน ผลการศึกษาที่พบสรุปได้ว่า adiponectin อาจจะเป็นตัวที่ใช้บ่งบอกการเกิด hepatocellular damage ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันได้

การวิเคราะห์ถัดมาเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมกับระดับโปรตีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ผลการวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GT และจีโนไทป์ TT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ผลการศึกษาที่พบบ่งชี้ว่าลักษณะจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มระดับโปรตีน adiponectin อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์มีความแตกต่างจากการศึกษาของ Kang et al. [83] ที่พบว่าอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ adiponectin ที่ลดลง และอัลลีล T จะมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ adiponectin ที่เพิ่มขึ้น [84, 85] นอกจากนี้รายงานการศึกษาของ Menzaghi et al. [86] พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) มีระดับโปรตีน adiponectin สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะจีโนไทป์ GT และจีโนไทป์ GG แม้ว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน adiponectin ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่ก็ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนว่าเหตุใดความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่มีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคจึงมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเกิดจากความแตกต่างทางด้านเชื้อชาติ และกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคที่ต่างกัน และเป็นไปได้ที่ลักษณะทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) บริเวณ exon 2 อาจอยู่ในส่วนบริเวณ silent substitution ทำให้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในสายพอลิเพป

ไทด์ และที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) ในส่วน intron 2 อาจเป็นบริเวณที่มีบทบาทเกี่ยวกับ consensus splice site

มีรายงานการศึกษาการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ในลักษณะที่เรียกว่า SNP haplotype พบว่าที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) จะมีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกันในยีน adiponectin ที่ตอบสนองต่อภาวะ metabolic syndrome ในกลุ่มชาว Caucasian [87] ชาวสวีเดน [88] และชาวญี่ปุ่น [89] แม้ว่าการศึกษานี้จะไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง SNP haplotype ในยีน adiponectin กับโอกาสในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากความแตกต่างทางด้านเชื้อชาติและกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคที่แตกต่างกันเป็นสาเหตุให้การวิเคราะห์ไม่พบความสัมพันธ์ของ SNP haplotype ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ต่อโอกาสในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกันที่ส่งผลต่อการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

จากบทบาทของ adiponectin ที่ตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบและการเกิด liver injury [90] ทำให้พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชาวไทยที่พบลักษณะจีโนไทป์ GG และอัลลีล G ที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) บริเวณ intron 2 สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สามารถที่จะนำข้อมูลมาใช้บ่งบอกการเกิดกระบวนการอักเสบในผู้ป่วย ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน สำหรับระดับโปรตีน adiponectin ที่สูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ลักษณะดังกล่าวเป็นสิ่งที่บ่งชี้ว่า adiponectin อาจจะมีบทบาทในการตอบสนองต่อ hepatoprotective effect และการเป็น anti-inflammatory เช่นเดียวกับระดับโปรตีน adiponectin ที่เพิ่มสูงขึ้นนั้นอาจจะเป็นผลที่เกิดจากการที่ตับได้รับความเสียหายและการมีน้ำดีคั่งสะสมในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน สุดทำยาคณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin และการตรวจวัดระดับโปรตีน adiponectin อาจจะสามารถนำมาใช้ในการช่วยอธิบายกลไกการเกิดพยาธิสภาพและการดำเนินของโรคท่อน้ำดีตีบตันให้เกิดความกระจ่างชัดเจนมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

ในการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง +45T/G (rs2241766) และ +276G/T (rs1501299) ด้วยวิธี PCR-RFLP ได้พบปัญหาในขั้นตอนของเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR ที่บริเวณ +276G/T (rs1501299) เนื่องจาก PCR-product ที่ได้มีการปนเปื้อนของแถบดีเอ็นเออื่น ซึ่งเกิดจากการจับกันอย่างไม่จำเพาะระหว่าง non-specific

ของดีเอ็นเอแม่แบบกับ primer ลักษณะดังกล่าวส่งผลต่อการแปลผลลักษณะทางพันธุกรรม สำหรับวิธีการแก้ปัญหาในระยะแรกคณะผู้วิจัยได้ทำการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาช่วง annealing ให้สูงขึ้นในช่วงการทำ PCR รอบแรกๆ จากนั้นจึงลดอุณหภูมิลง และทำการลดจำนวนรอบของปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ PCR แต่อย่างไรก็ยังไม่สามารถที่จะแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ คณะผู้วิจัยจึงทำการเปลี่ยนชนิดเอนไซม์ DNA polymerase เป็นแบบ hot-start enzyme ซึ่งสามารถลดการจับกันอย่างไม่จำเพาะลงได้

นอกจากนี้ยังพบปัญหาในขั้นตอนของการแปลผลลักษณะทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) เนื่องจากการวิเคราะห์ผลลักษณะจีโนไทป์ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์ตัดบริเวณ restriction site จะทำให้เกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดที่แตกต่างกัน สำหรับ PCR product ที่บริเวณตำแหน่ง +276G/T (rs1501299) เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะจะเกิดขึ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ทำให้ไม่สามารถอ่านผลได้อย่างชัดเจนในกลุ่มตัวอย่างบางราย ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการแปลผลลักษณะทางพันธุกรรมในกลุ่มตัวอย่างบางรายด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis เนื่องจากวิธีนี้จะมีความสามารถในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้ดีกว่าวิธี agarose gel electrophoresis

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมในยีน adiponectin กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่ายีน adiponectin มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรค ผลการวิจัยดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าปัจจัยทางพันธุกรรมอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน และเพื่อเป็นการยืนยันสมมติฐานข้างต้น เราควรที่จะทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนชนิดอื่นที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน เพื่อที่จะนำข้อมูลมาใช้ในการประกอบการอธิบายสาเหตุของการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรมให้มีความกระจ่างมากขึ้น

รายการอ้างอิง

- [1] Mieli-Vergani G, Vergani D. Biliary atresia. Semin Immunopathol. 2009; 31(10):371-81.
- [2] Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR, Karrer FM. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2003; 37(23):4-21.
- [3] Squires, Robert H. From whence does biliary atresia arise. Pediatr Transplant. 2005;9:145-47.
- [4] Perlmutter DH, Shepherd RW. Extrahepatic biliary atresia: a disease or a phenotype. Hepatology. 2002; 35(7):1297-1304.
- [5] Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. European Journal of Endocrinology. 2003; 148(7):293-300.
- [6] Houwen RH, Kerremans II, van Steensel-Moll HA, van Romunde LK, Bijleveld CM, Schweizer P. Time-space distribution of extrahepatic biliary atresia in The Netherlands and West Germany. Z Kinderchir. 1988; 43(4):68-71.
- [7] Khalil BA, Perera MT, Mirza DF. Clinical practice: management of biliary atresia. Eur J Pediatr. 2010; 169(7):395-402.
- [8] Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommelet C, Golmard JL, Auvert B. Epidemiology of biliary atresia in France: a national study 1986-96. J Hepatol. 1999; 31(6):1006-13.
- [9] Strickland AD, Shannon K. Studies in the etiology of extrahepatic biliary atresia: time-space clustering. J Pediatr. 1982; 100(5):749-53.
- [10] Danks DM, Campbell PE, Jack I, Rogers J, Smith AL. Studies of the aetiology of neonatal hepatitis and biliary atresia. Arch Dis Child. 1977; 52(5):360-7.
- [11] Chiba T, Kamiyama T, Nio M, Ibrahim M. Japanese biliary atresia registry. Biliary atresia. 1991; 56(7):79-86.
- [12] Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. Lancet. 2009; 374(9):1704-13.
- [13] Sydney M. Extra-hepatic biliary atresia: diagnosis methods. J Pediatr. 2003; 79(7):107-114.
- [14] Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR, Karrer FM. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2003; 37(1):4-21.

- [15] Schweizer P, Kerremans J. Discordant findings in extrahepatic bile duct atresia in 6 sets of twins. Z Kinderchir. 1988; 43(2):72-5.
- [16] Hyams JS, Glaser JH, Leichtner AM, Morecki R. Discordance for biliary atresia in two sets of monozygotic twins. J Pediatr. 1985; 107(3):420-2.
- [17] Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Tanunythawongse C, Norapaksunthorn T, Mutirangura A, Chandrakamol B. Extrahepatic biliary atresia in twins: zygosity determination by short tandem repeat loci. J Med Assoc Thai. 1996; 79(5):119-124.
- [18] Yoon PW, Bresee JS, Olney RS, James LM, Khoury MJ. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study. Pediatrics. 1997; 99(3):376-82.
- [19] Sokol RJ, Mack C. Etiopathogenesis of biliary atresia. Semin Liver Dis. 2001; 21(7):517-24.
- [20] Landing BH. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst--the concept of infantile obstructive cholangiopathy. Prog Pediatr Surg. 1974; 6(26):113-39.
- [21] Tarr PI, Haas JE, Christie DL. Biliary atresia, cytomegalovirus, and age at referral. Pediatrics. 1996; 97(4):828-31.
- [22] Jevon GP, Dimmick JE. Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study. Pediatr Dev Pathol. 1999; 2(1):11-4.
- [23] Bangaru B, Morecki R, Glaser JH, Gartner LM, Horwitz MS. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-induced cholangitis in weanling mice. Lab Invest. 1980; 43(5):456-62.
- [24] Morecki R, Glaser JH, Cho S, Balistreri WF, Horwitz MS. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. N Engl J Med. 1984; 310(24):482-484.
- [25] Morecki R, Glaser JH, Johnson AB, Kress Y. Detection of reovirus type 3 in the porta hepatis of an infant with extrahepatic biliary atresia: ultrastructural and immunocytochemical study. Hepatology. 1984; 4(6):1137-42.
- [26] Rosenberg DP, Morecki R, Lollini LO, Glaser J, Cornelius CE. Extrahepatic biliary atresia in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Hepatology. 1983; 3(4):577-80.

- [27] Steele TA, Cox DC. Reovirus type 3 chemoimmunotherapy of murine lymphoma is abrogated by cyclosporine. Cancer Biother. 1995; 10(4):307-15.
- [28] Riepenhoff-Talty M, Schaekel K, Clark HF, Mueller W, Uhnnoo I, Rossi T, Fisher J, Ogra PL. Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice. Pediatr Res. 1993; 33(5):394-399.
- [29] Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, Uhnnoo I, Greenberg SJ, Schäkel K, Zhaori G, Fitzgerald J, Chong S, el-Yousef M, Nemeth A, Brown M, Piccoli D, Hyams J, Ruffin D, Rossi T. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. J Infect Dis. 1996; 174(1):8-15.
- [30] Drut R, Drut RM, Gómez MA, Cueto Rúa E, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1998; 27(5):530-5.31.
- [31] Domiati-Saad R, Dawson DB, Margraf LR, Finegold MJ, Weinberg AG, Rogers BB. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. Pediatr Dev Pathol. 2000; 3(4):367-73.
- [32] Schreiber RA, Kleinman RE. Genetics, immunology, and biliary atresia: an opening or a diversion? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1993; 16(2):111-3.
- [33] Schreiber RA, Kleinman RE. Genetics, immunology, and biliary atresia: an opening or a diversion? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1993 Feb;16(2):111-3.
- [34] Donaldson PT. Immunogenetics in liver disease. Baillieres Clin Gastroenterol. 1996; 10(3):533-49.
- [35] Kobayashi H, Puri P, O'Briain DS, Surana R, Miyano T. Hepatic overexpression of MHC class II antigens and macrophage-associated antigens (CD68) in patients with biliary atresia of poor prognosis. J Pediatr Surg. 1997; 32(4):590-3.
- [36] Jurado A, Jara P, Camarena C, Hierro L, Lahoz C, Palomino P. Is extrahepatic biliary atresia an HLA-associated disease? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1997; 25(5):557-8.

- [37] Vasiliauskas E. Biliary atresia-an autoimmune disorder? Hepatology. 1995; 87.
- [38] Burch J. The role of maternal antibodies in cholestatic liver disease in infant: a new isolated finding in neonatal lupus? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000; 108
- [39] Bernal W, Moloney M, Underhill J, Donaldson PT. Association of tumor necrosis factor polymorphism with primary sclerosing cholangitis. J Hepatol. 1999; 30(2):237-41.
- [40] Mitchell SA, Grove J, Spurkland A, Boberg KM, Fleming KA, Day CP, Schrumph E, Chapman RW; European Study Group of Primary Sclerosing Cholangitis. Association of the tumour necrosis factor alpha -308 but not the interleukin 10 -627 promoter polymorphism with genetic susceptibility to primary sclerosing cholangitis. Gut. 2001; 49(2):288-94.
- [41] Donaldson P, Agarwal K, Craggs A, Craig W, James O, Jones D. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. Gut. 2001; 48(3):397-402.
- [42] Donaldson PT, Clare M, Constantini PK, Hadzic N, Mieli-Vergani G, Howard E, Kelley D. HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia. Liver. 2002; 22(3):213-9.
- [43] Pickett LK, Briggs HC. Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep. J Pediatr Surg. 1969; 4(6):95-101.
- [44] Schon P, Tsuchiya K, Lenoir D, Mochizuki T, Guichard C, Takai S, Maiti AK, Nihei H, Weil J, Yokoyama T, Bouvagnet P. Identification, genomic organization, chromosomal mapping and mutation analysis of the human INV gene, the ortholog of a murine gene implicated in left-right axis development and biliary atresia. Hum Genet. 2002; 110(2):157-65.
- [45] Bamford RN, Roessler E, Burdine RD, Saplakoglu U, dela Cruz J, Splitt M, Goodship JA, Towbin J, Bowers P, Ferrero GB, Marino B, Schier AF, Shen MM, Muenke M, Casey B. Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. Nat Genet. 2000; 26(3):365-9.

- [46] Jacquemin E, Cresteil D, Raynaud N, Hadchouel M. CFC1 gene mutation and biliary atresia with polysplenia syndrome. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2002; 34(3):326-9.
- [48] Clotman F, Lannoy VJ, Reber M, Cereghini S, Cassiman D, Jacquemin P, Roskams T, Rousseau GG, Lemaigre FP. The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. Development. 2002; 129(8):1819-28.
- [49] Harper P, Plant JW, Unger DB. Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves. Aust Vet J. 1990; 67(1):18-22.
- [50] Arikan C, Berdeli A, Ozgenc F, Tumgor G, Yagci RV, Aydogdu S. Positive association of macrophage migration inhibitory factor gene-173G/C polymorphism with biliary atresia. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2006; 42(5):77-82.
- [51] Arikan C, Berdeli A, Kilic M, Tumgor G, Yagci RV, Aydogdu S. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with biliary atresia. Dig Dis Sci. 2008;53:2000-4.
- [52] Lee HC, Chang TY, Yeung CY, Chan WT, Jiang CB, Chen WF, Chan HW, Liu HF, Lin M, Lee YJ. Genetic variation in the vascular endothelial growth factor gene is associated with biliary atresia. J Clin Gastroenterol. 2010; 44(2):135-9.
- [53] Guerre-Millo M. Adiponectin: an update. Diabetes Metab. 2008; 34(1):12-8.
- [54] Yang WS, Tsou PL, Lee WJ, Tseng DL, Chen CL, Pend CC, Lee KC, Chen MJ, Huang CJ, Tai TY, Chuang LM. Allele-specific differential expression of a common adiponectin gene polymorphism related to obesity. J Mol Med. 2003; 81(6):428-434.
- [55] Yang WS, Chuang LM. Human genetics of adiponectin in the metabolic syndrome. J Mol Med. 2006; 84(9):112-21.
- [56] Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P,

- Kadowaki T. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. Diabetes. 2002; 51(2):536-40.
- [57] Gil-Campos M, Cañete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. Clin Nutr. 2004; 23(11):963-74.
- [58] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev. 2005;26:439-51.
- [59] Anthony J.G. Hanley, Bowden Donald, Lynne E. Wagenknecht, Aarthi Balasubramanyam, et al. Associations of adiponectin with body fat distribution and insulin sensitivity in nondiabetic Hispanics and African-Americans. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2007; 92(7): 2665-2671.
- [60] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev. 2005; 26(3):439-51.
- [61] Yu Wang, Mingyan Zhou, Karen S. L. Lam, Aimin Xu. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009; 53(11):201-12.
- [62] Chudek J, Wiecek A. Adipose tissue, inflammation and endothelial dysfunction. Pharmacol Rep. 2006; 58(7):81-8.
- [63] Zhou M, Xu A, Tam PK, Lam KS, Chan L, Hoo RL, et al. Mitochondrial dysfunction contributes to the increased vulnerabilities of adiponectin knockout mice to liver injury. Hepatology. 2008; 48(9):1087-96.
- [64] Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. Diabetes Metab. 2004; 30(17):121-38.
- [65] Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, et al. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. FASEB J. 1997; 11(6):809-15.
- [66] Bai Y, Onuma H, Bai X, Medvedev AV, Misukonis M, Weinberg JB, et al. Persistent nuclear factor-kappa B activation in Ucp2^{-/-} mice leads to enhanced nitric

- oxide and inflammatory cytokine production. J Biol Chem. 2005; 280(7):19062-9.
- [67] Tokushige K, Hashimoto E, Noto H, Yatsuji S, Taniai M, Torii N, Shiratori K. Influence of adiponectin gene polymorphisms in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol. 2009; 44(6):976-82.
- [68] Musso G, Gambino R, De Michieli F, Durazzo M, Pagano G, Cassader M. Adiponectin gene polymorphisms modulate acute adiponectin response to dietary fat: Possible pathogenetic role in NASH. Hepatology. 2008; 47(10):1167-77.
- [69] Myhsok BM. The usefulness of single polynucleotide polymorphisms (SNPs) for genetic epidemiological investigation of complex psychiatric diseases. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2005; 29:1017-1020.
- [70] Kwok S. Procedures to minimize PCR product carryover. In: Innis MA, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press. 1990; 24(3): 142-5.
- [71] Longo MC, M.S. Berninger and J.L. Hartley. Use of uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in the polymerase chain reaction. Gene. 1990; 93(3): 125-8.
- [72] Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD, Kushnirov VV. Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. Journal of Biological Chemistry. 2003; 278(49):496-36.
- [73] Huang Q, Fu WL. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. Clin Chem Lab Med. 2005; 43(8):841-2.
- [74] Mack CL, Tucker RM, Sokol RJ, Karrer FM, Kotzin BL, Whittington PF, Miller SD. Biliary atresia is associated with CD4+ Th1 cell-mediated portal tract inflammation. Pediatr Res. 2004; 56(1):79-87.
- [75] Bezerra JA, Tiao G, Ryckman FC, Alonso M, Sabla GE, Shneider B, Sokol RJ, Aronow BJ. Genetic induction of proinflammatory immunity in children with biliary atresia. Lancet. 2002;360(9346):1653-9.

- [76] Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2005; 115(5):911-9.
- [77] Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nat Rev Immunol. 2006; 6(10):772-83.
- [78] Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, Yamauchi T, Otabe S, Okada T, Eto K, Kadowaki H, Hagura R, Akanuma Y, Yazaki Y, Nagai R, Taniyama M, Matsubara K, Yoda M, Nakano Y, Tomita M, Kimura S, Ito C, Froguel P, Kadowaki T. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. Diabetes. 2002; 51(2):536-40.
- [79] Haap M, Machicao F, Stefan N, Thamer C, Tschritter O, Schnuck F, Wallwiener D, Stumvoll M, Häring HU, Fritsche A. Genetic determinants of insulin action in polycystic ovary syndrome. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2005; 113(5):275-81.
- [80] Jang Y, Chae JS, Koh SJ, Hyun YJ, Kim JY, Jeong YJ, Park S, Ahn CM, Lee JH. The influence of the adiponectin gene on adiponectin concentrations and parameters of metabolic syndrome in non-diabetic Korean women. Clin Chim Acta. 2008; 391(2):85-90.
- [81] Tietge UJ, Böker KH, Manns MP, Bahr MJ. Elevated circulating adiponectin levels in liver cirrhosis are associated with reduced liver function and altered hepatic hemodynamics. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004; 287(1): 82-9.
- [82] Tacke F, Wüstefeld T, Horn R, Luedde T, Srinivas Rao A, Manns MP, Trautwein C, Brabant G. High adiponectin in chronic liver disease and cholestasis suggests biliary route of adiponectin excretion in vivo. J Hepatol. 2005; 42(5):666-73.
- [83] Kang ES, Park SY, Kim HJ, Ahn CW, Nam M, Cha BS, Lim SK, Kim KR, Lee HC. The influence of adiponectin gene polymorphism on the rosiglitazone response in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2005;28(5):1139-44.


- [84] Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Leprêtre F, Dupont S, Hara K, Clément K, Bihain B, Kadowaki T, Froguel P. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. Hum Mol Genet. 2002; 11(21):2607-14.
- [85] Yang WS, Tsou PL, Lee WJ, Tseng DL, Chen CL, Peng CC, Lee KC, Chen MJ, Huang CJ, Tai TY, Chuang LM. Allele-specific differential expression of a common adiponectin gene polymorphism related to obesity. J Mol Med. 2003;81(7):428-34.
- [86] Menzaghi C, Ercolino T, Salvemini L, Cocca A, Kim SH, Fini G, Doria A, Trischitta V. Multigenic control of serum adiponectin levels: evidence for a role of the APM1 gene and a locus on 14q13. Physiol Genom. 2004; 19(2):170-4.
- [87] Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, Berg AH, Warram JH, Scherer PE, Trischitta V, Doria A. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome. Diabetes. 2002; 51(7):2306-12.
- [88] Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Sjöström L, Bouchard C. Mutations in the adiponectin gene in lean and obese subjects from the Swedish obese subjects cohort. Metabolism. 2003; 52(7):881-4.
- [89] Nakatani K, Noma K, Nishioka J, Kasai Y, Morioka K, Katsuki A, Hori Y, Yano Y, Sumida Y, Wada H, Nobori T. Adiponectin gene variation associates with the increasing risk of type 2 diabetes in non-diabetic Japanese subjects. Int J Mol Med. 2005; 15(1):173-7.
- [90] Park PH, Thakur V, Pritchard MT, McMullen MR, Nagy LE. Regulation of Kupffer cell activity during chronic ethanol exposure: role of adiponectin. J Gastroenterol Hepatol. 2006; 21(3):30-3.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

เอกสารข้อมูล และหนังสือแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัย

1. เอกสารข้อมูลสำหรับผู้แทนโดยชอบธรรม
2. เอกสารข้อมูลสำหรับอาสาสมัครที่มีอายุระหว่าง 13-18 ปี
3. เอกสารข้อมูลสำหรับอาสาสมัครที่มีอายุระหว่าง 7-12 ปี
4. หนังสือแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัยสำหรับผู้แทนโดยชอบธรรม
5. หนังสือแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัยสำหรับอาสาสมัครที่มีอายุระหว่าง 13-18 ปี
6. หนังสือแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมโครงการวิจัยสำหรับอาสาสมัครที่มีอายุระหว่าง 7-12 ปี

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้แทนโดยชอบธรรม (Information sheet for research participant)</p>
--	--

ชื่อโครงการวิจัย ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง
SNP45/SNP276 ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน
ผู้สนับสนุนการวิจัย อยู่ระหว่างการดำเนินการขอทุนมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นางสาววันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ
ที่อยู่ 513/540 ม.2 ต. ประชาธิปัตย์ อ. รัษฎา จ. ปทุมธานี 12130
เบอร์โทรศัพท์ 087-068-9721, 02-958-4401

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ นพ.สิทธิศักดิ์ หารยาเวก
ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466
ชื่อ นพ.ยง ภู่วรรณ
ที่อยู่ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4909

เรียน ผู้แทนโดยชอบธรรมของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

เด็กในปกครองของท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากเด็กในปกครองของท่านเป็นผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจอนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของเด็กในปกครองของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่า จะอนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นกลุ่มอาการคั่งของน้ำดีที่เกิดในทารกอันเนื่องมาจากการตีบตันของท่อน้ำดีและเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดอาการตัวเหลืองในทารกแรกเกิด เมื่อมีการตีบตันของท่อน้ำดีเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้เกิดการคั่งของน้ำดีขึ้นในตับ ทำให้เกิดอันตรายต่อตับและนำไปสู่ภาวะตับแข็งได้ และเมื่อเกิดภาวะตับแข็งหากผู้ป่วยไม่ได้รับการผ่าตัดระบายน้ำดีที่คั่งลงมาในลำไส้ ผู้ป่วยจะเสียชีวิตจากตับแข็งที่อายุเฉลี่ยประมาณ 1 ปีครึ่ง และส่วนหนึ่งเสียชีวิตเมื่ออายุประมาณ 7 ปี หากอาการของโรคยังไม่ดีขึ้นจะต้องทำการรักษาโดยทำการผ่าตัดเปลี่ยนตับ

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่ค่อนข้างพบได้น้อยแม้ว่าจะมีการศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคอย่างจริงจังและเป็นจำนวนมาก แต่ในปัจจุบันก็ยังไม่มีผู้ใดทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงในการที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพโรค สำหรับการศึกษเกี่ยวกับปัจจัยทางพันธุกรรมกับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งได้มีรายงานการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่พบในเด็กฝาแฝด ประมาณร้อยละ 10-20 ของกลุ่มอาการของโรค จะพบลักษณะอาการที่เกิดจากความผิดปกติตั้งแต่กำเนิด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่มีการกลายพันธุ์มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในผู้ป่วย โดยมีปัจจัยที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัยทางพันธุกรรมอื่นช่วยส่งเสริมให้เกิดลักษณะของโรคร่วมด้วย นอกจากนี้การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ก่อให้เกิดโรค โดยยีนที่ทำการศึกษาจะเป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ก่อให้เกิดการอักเสบในตับ และการเกิดพังผืดสะสมอยู่ในตับซึ่งพบว่าลักษณะดังกล่าวมีความสัมพันธ์ในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันขึ้นได้ ในการศึกษาวิจัยได้พยายามมองหาความสัมพันธ์ระหว่างโรค กับความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมในประชากรที่เกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอในคนที่เป็โรคซึ่งมีความจำเพาะสูง ถ้านำตัวอย่างของดีเอ็นเอมาตรวจแบบสุ่มในประชากรหลายๆกลุ่มที่แตกต่างกัน แล้วสามารถตรวจสอบได้ การวิเคราะห์หาพื้นที่ตอบสนองต่อโรคเพื่อที่จะหาลักษณะทางพันธุกรรมที่พบมากในกลุ่มของผู้ป่วยจึงมีโอกาสูงที่จะทำให้เกิดโรคได้ เนื่องจากกลไกการเกิดโรคในมนุษย์อาจมีการควบคุมโดยยีนจำนวนมากมาย การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคจึงเป็นหนทางหนึ่งที่สามารถจะช่วยให้การวินิจฉัยและการป้องกันการเกิดโรคได้จำเพาะและรวดเร็วมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาหาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในประชากรไทย โดยเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน ข้อมูลวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์กับการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งจะสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางป้องกันการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ในอนาคต จำนวนผู้เข้าร่วม

โครงการวิจัย คือ ผู้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวนประมาณ 100 ราย และอาสาสมัครที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวนประมาณ 100 ราย

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากเด็กในปกครองของท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและท่านยินยอมที่จะให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ผู้ทำวิจัยครั้งนี้จะทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดโดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำชั้นผิว (venipuncture) บริเวณหน้ารอยพับข้อศอก (cubital fossa) ด้วยการใช้เข็มปลอดเชื้อ เจาะเก็บเลือดปริมาณประมาณ 3-5 มิลลิลิตร (1 ช้อนชา)

สารตัวอย่างจะนำไปยังห้องปฏิบัติการวิจัย โดยเลือดที่ได้จากการเจาะจะนำไปปั่นเพื่อทำการแยกเก็บซีรัม ซึ่งซีรัมของเด็กในปกครองของท่านจะได้รับการตรวจสอบการทำงานของตับ (liver function tests) สำหรับส่วนที่เป็นเม็ดเลือดขาวและซีรัมจะนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาลักษณะทางพันธุกรรมของเด็กในปกครองของท่าน

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ คณะผู้ทำวิจัยใคร่ขอความร่วมมือจากท่านและเด็กในปกครองของท่าน โดยจะขอให้ท่านอธิบายให้เด็กในปกครองของท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับเด็กในปกครองของท่านระหว่างที่เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

เด็กในปกครองของท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่เด็กในปกครองของท่านอาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากแพทย์ผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

เด็กในปกครองของท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของเด็กในปกครองของท่านท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่เด็กในปกครองของท่านอาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของเด็กในปกครองของท่านในระหว่างที่เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที

เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านอยู่ใน โครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอถอนตัวออกจากการศึกษา

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับเด็กในปกครองของท่าน ขอให้ท่านรีบพาเด็กในปกครองของท่านมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของเด็กในปกครองของท่าน และให้การรักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาทำให้สามารถนำข้อมูลมาอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมกับการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันเพื่อที่จะได้นำข้อมูลมาใช้ในการอธิบายสาเหตุของการเกิดโรคซึ่งอาจจะใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในอนาคตได้ การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เด็กในปกครองของท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใด ๆ โดยตรง แต่จะมีประโยชน์ต่อวงการแพทย์ในการคิดค้นวิธีการรักษาแบบใหม่ที่มีความจำเพาะต่อโรคและสามารถหาแนวทางการป้องกันการเกิดโรคในอนาคตได้ การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะทำให้เด็กในปกครองของท่านมีสุขภาพที่ดีขึ้น หรืออาจจะลดความรุนแรงของโรคได้ แต่ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของเด็กในปกครองของท่านจะต้องดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องอนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่เด็กในปกครองของท่านเป็นอยู่ เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของเด็กในปกครองของท่านได้ ดังนั้นท่านจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่น ๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาเด็กในปกครองของท่านก่อนท่านจะอนุญาตและตัดสินใจให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมในการวิจัย

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านและเด็กในปกครองของท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของเด็กในปกครองของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบันแก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่เด็กในปกครองของท่านร่วมในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของแพทย์ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย เด็กในปกครองของท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าเด็กในปกครองของท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของเด็กในปกครองของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าเด็กในปกครองของท่านได้ สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่เด็กในปกครองของท่านพึงมี

ในกรณีที่เด็กในปกครองของท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับ โครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับทีมแพทย์ผู้ร่วมใน โครงการวิจัยคือ นพ.ยง ภูวรวรรณ และ นพ.สิทธิศักดิ์ หารรษาเวก โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของเด็กในปกครองท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่ายในการอนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมการวิจัย

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัย เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ มีงบประมาณที่จำกัด ไม่มีงบประมาณสนับสนุนในส่วน of ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจที่จะ อนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถให้เด็กในปกครองของท่าน ถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอลถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของเด็ก ในปกครองท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนเด็กในปกครองของท่านออกจากกรเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของเด็กในปกครองของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีดังต่อไปนี้

- เด็กในปกครองของท่านไม่สามารถปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวเด็กในปกครองของท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของเด็กในปกครองของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของเด็กในปกครองของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านที่อนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของเด็กใน

ปกครองของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ นพ.สิทธิศักดิ์ ทรธยาเวก ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลือดที่เหลือจากการวิจัยในครั้งนี้ ผู้ทำวิจัยขออนุญาตเก็บไว้ในรูปนิรนาม โดยจะใช้รหัสที่สามารถเชื่อมโยงกับข้อมูลเดิมของเด็กในปกครองของท่านได้ แต่จะเก็บรักษาข้อมูลของเด็กในปกครองของท่านเป็นความลับ ไม่เปิดเผยต่อสาธารณะและไม่มีการบันทึกข้อมูลส่วนตัวของเด็กในปกครองของท่านเพิ่มเติม เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยในภายภาคหน้า โดยจะทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20° C เป็นระยะเวลา 10 ปี ในกรณีที่ครบกำหนดระยะเวลาจัดเก็บผู้ทำวิจัยจะขอเก็บเลือดที่เหลือต่อไว้ใช้ในอนาคต โดยจะทำบันทึกขออนุญาตผ่านหัวหน้าภาควิชามายังคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย หนึ่งการศึกษาวิจัยในภายภาคหน้าทุกครั้งที่มีการใช้เลือดที่เก็บไว้จะแจ้งขออนุญาตและได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยทุกครั้ง เลือดที่ถูกเก็บไว้จะไม่มีการจำหน่ายหรือนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้อนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของเด็กในปกครองของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของเด็กในปกครองของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และเด็กในปกครองของท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของเด็กในปกครองของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านที่อนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของเด็กในปกครองท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาเด็กในปกครองของท่านได้

สิทธิ์ของเด็กในปกครองของท่านในการเข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้แทนโดยชอบธรรม ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้


1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่เด็กในปกครองของท่านจะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่เด็กในปกครองของท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาเด็กในปกครองของท่านด้วยวิธีอื่น หรืออุปกรณ์ซึ่งมีผลดีต่อเด็กในปกครองของท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่เด็กในปกครองของท่านอาจได้รับ

6. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังที่เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย
7. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
8. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมอนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอลถอนตัวเด็กในปกครองของท่านจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยที่เด็กในปกครองของท่านสามารถถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
9. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
10. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะอนุญาตให้เด็กในปกครองของท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากเด็กในปกครองของท่านไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือเด็กในปกครองของท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการ ชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบพระคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับเด็กอายุ 13-18 ปี (Information sheet for research participant)</p>
--	---

ชื่อโครงการวิจัย ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง
SNP45/SNP276 ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ผู้สนับสนุนการวิจัย อยู่ระหว่างการดำเนินการขอทุนมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นางสาววันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ
ที่อยู่ 513/540 ม.2 ต. ประชาธิปัตย์ อ. รัษฎบุรี จ.ปทุมธานี 12130
เบอร์โทรศัพท์ 087-068-9721, 02-958-4401

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ นพ.สิทธิศักดิ์ หารรษาเวก
ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466

ชื่อ นพ.ยง ภู่วรรณ
ที่อยู่ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4909

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เนื่องจากท่านเป็นเด็กอายุ 13 – 18 ปี และเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการศึกษาวิจัยดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างถี่ถ้วน เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถตอบคำถามและให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ท่านมีเวลาอย่างเพียงพอในการตัดสินใจโดยอิสระ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของโครงการวิจัยนี้

เหตุผลความเป็นมา

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นกลุ่มอาการคั่งของน้ำดีที่เกิดในทารกอันเนื่องมาจากการตีบตันของท่อน้ำดีและเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดอาการตัวเหลืองในทารกแรกเกิด เมื่อมีการตีบตันของท่อน้ำดีเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้เกิดการคั่งของน้ำดีขึ้นในตับ ทำให้เกิดอันตรายต่อตับและ

นำไปสู่ภาวะดับแข็งได้ และเมื่อเกิดภาวะดับแข็งหากผู้ป่วยไม่ได้รับการผ่าตัดระบายน้ำดีที่คั่งลงมาในลำไส้ ผู้ป่วยจะเสียชีวิตจากดับแข็งที่อายุเฉลี่ยประมาณ 1 ปีครึ่ง และส่วนหนึ่งเสียชีวิตเมื่ออายุประมาณ 7 ปี หากอาการของโรคยังไม่ดีขึ้นจะต้องทำการรักษาโดยทำการผ่าตัดเปลี่ยนตับ

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่ค่อนข้างพบได้น้อยแม้ว่าจะมีการศึกษาหาสาเหตุของการเกิดโรคอย่างจริงจังและเป็นจำนวนมาก แต่ในปัจจุบันก็ยังไม่มีความชัดเจนถึงสาเหตุที่แท้จริงในการทำให้เกิดพยาธิสภาพโรค สำหรับการศึกษเกี่ยวกับปัจจัยทางพันธุกรรมกับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งได้มีรายงานการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่พบในเด็กฝาแฝด ประมาณร้อยละ 10-20 ของกลุ่มอาการของโรค จะพบลักษณะอาการที่เกิดจากความผิดปกติตั้งแต่กำเนิด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่มีการกลายพันธุ์มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในผู้ป่วย โดยมีปัจจัยที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัยทางพันธุกรรมอื่นช่วยส่งเสริมให้เกิดลักษณะของโรคร่วมด้วย นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ก่อให้เกิดโรค โดยยีนที่ทำการศึกษาจะเป็นยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ก่อให้เกิดการอักเสบในตับ และการเกิดพังผืดสะสมอยู่ในตับซึ่งพบว่าลักษณะดังกล่าวมีความสัมพันธ์ในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันขึ้นได้ ในการศึกษาวิจัยได้พยายามมองหาความสัมพันธ์ระหว่างโรค กับความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมในประชากรที่เกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอในคนที่เป็โรคซึ่งมีความจำเพาะสูง ถ้านำตัวอย่างของดีเอ็นเอมาตรวจแบบสุ่มในประชากรหลายๆกลุ่มที่แตกต่างกัน แล้วสามารถตรวจสอบได้ การวิเคราะห์หา ยีนที่ตอบสนองต่อโรคเพื่อที่จะหาลักษณะทางพันธุกรรมที่พบมากในกลุ่มของผู้ป่วยจึงมีโอกาสูงที่จะทำให้เกิดโรคได้ เนื่องจากกลไกการเกิดโรคในมนุษย์อาจมีการควบคุมโดยยีนจำนวนมากมาย การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคจึงเป็นหนทางหนึ่งที่สามารถจะช่วยให้การวินิจฉัยและการป้องกันการเกิดโรคได้จำเพาะและรวดเร็วมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาหาลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในประชากรไทย โดยเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน ข้อมูลวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์กับการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งจะสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางป้องกันการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ในอนาคต จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย คือ ผู้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวนประมาณ 100 ราย และอาสาสมัครที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวนประมาณ 100 ราย

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

หากท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านจะได้รับเชิญให้มาพบแพทย์ตามวันเวลาที่นัดหมาย เพื่อตรวจเลือดด้วยการเจาะเลือดประมาณ 3-5 มิลลิลิตร (1 ช้อนชา) จากหลอดเลือดดำโดยใช้เข็มปลอดเชื้อ อันตรายที่อาจเกิดขึ้นหลังจากการเจาะเลือดพบได้น้อยมาก เช่น อาจมีรอยช้ำบริเวณเจาะเลือดเพียงเล็กน้อย ซึ่งหายได้เองภายใน 7 วัน สารตัวอย่างจะนำไปยังห้องปฏิบัติการวิจัย โดยเลือดที่ได้จากการเจาะจะนำไปปั่นเพื่อทำการแยกเก็บซีรัม สำหรับส่วนที่เป็นเม็ดเลือดขาวและซีรัมจะนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาลักษณะทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคล โดยตลอดระยะเวลาที่ท่านอยู่ในโครงการวิจัย คือ 1 ปีและมาพบผู้วิจัยหรือแพทย์ผู้ร่วมทำวิจัยซึ่งเป็นการนัดตรวจตามปกติอยู่แล้ว

ความรับผิดชอบของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

เพื่อให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ ผู้ทำวิจัยใคร่ขอความความร่วมมือจากท่าน โดยจะขอให้ท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัยอย่างเคร่งครัด รวมทั้งแจ้งอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับท่านระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัยให้ผู้ทำวิจัยได้รับทราบ

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืด และโอกาที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก

หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ความเสี่ยงที่ไม่ทราบแน่นอน

ท่านอาจเกิดอาการข้างเคียง หรือความไม่สบาย นอกเหนือจากที่ได้แสดงในเอกสารฉบับนี้ ซึ่งอาการข้างเคียงเหล่านี้เป็นอาการที่ไม่เคยพบมาก่อน เพื่อความปลอดภัยของท่าน ควรแจ้งผู้ทำวิจัยให้ทราบทันทีเมื่อเกิดความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้น

หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านสามารถสอบถามจากผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

หากมีการค้นพบข้อมูลใหม่ ๆ ที่อาจมีผลต่อความปลอดภัยของท่านในระหว่างที่ท่านเข้าร่วมในโครงการวิจัย ผู้ทำวิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบทันที เพื่อให้ท่านตัดสินใจว่าจะอยู่ในโครงการวิจัยต่อไปหรือจะขอลงตัวออกจากการวิจัย

การพบแพทย์นอกตารางนัดหมายในกรณีที่เกิดอาการข้างเคียง

หากมีอาการข้างเคียงใด ๆ เกิดขึ้นกับท่าน ขอให้ท่านรีบมาพบแพทย์ที่สถานพยาบาลทันที ถึงแม้ว่าจะอยู่นอกตารางการนัดหมาย เพื่อแพทย์จะได้ประเมินอาการข้างเคียงของท่าน และให้การ

รักษาที่เหมาะสมทันที หากอาการดังกล่าวเป็นผลจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่าย

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาทำให้สามารถนำข้อมูลมาอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมกับการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันเพื่อที่จะได้นำข้อมูลมาใช้ในการอธิบายสาเหตุของการเกิดโรคซึ่งอาจจะใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในอนาคตได้ การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ท่านจะไม่ได้รับประโยชน์ใด ๆ โดยตรง แต่จะมีประโยชน์ต่อวงการแพทย์ในการคิดค้นวิธีการรักษาแบบใหม่ที่มีความจำเพาะต่อโรคและสามารถหาแนวทางการป้องกันการเกิดโรคในอนาคตได้ การเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้อาจจะทำให้ท่านมีสุขภาพที่ดีขึ้น หรืออาจจะลดความรุนแรงของโรคได้ แต่ไม่ได้รับรองว่าสุขภาพของท่านจะต้องดีขึ้นหรือความรุนแรงของโรคจะลดลงอย่างแน่นอน

วิธีการและรูปแบบการรักษาอื่น ๆ ซึ่งมีอยู่สำหรับอาสาสมัคร

ท่านไม่จำเป็นต้องเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เพื่อประโยชน์ในการรักษาโรคที่ท่านเป็นอยู่เนื่องจากมีแนวทางการรักษาอื่น ๆ หลายแบบสำหรับรักษาโรคของท่านได้ ดังนั้นจึงควรปรึกษาแนวทางการรักษาวิธีอื่นๆ กับแพทย์ผู้ให้การรักษาท่านก่อนตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมในโครงการวิจัย

ขอให้ท่านปฏิบัติดังนี้

- ขอให้ท่านให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง
- ขอให้ท่านแจ้งให้ผู้ทำวิจัยทราบความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัยและความรับผิดชอบของผู้ทำวิจัย/ผู้สนับสนุนการวิจัย

หากพบอันตรายที่เกิดขึ้นจากการวิจัย ท่านจะได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมทันที หากพิสูจน์ได้ว่าท่านปฏิบัติตามคำแนะนำของทีมผู้ทำวิจัยแล้ว ผู้ทำวิจัยยินดีจะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของท่าน และการลงนามในเอกสารให้ความยินยอม ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมายตามปกติที่ท่านพึงมี

ในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใด ๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถ

ติดต่อกับแพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัยคือ นพ.ยง ภู่วรรณ และ นพ.สิทธิศักดิ์ หารยาเวก โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466 ได้ตลอด 24 ชั่วโมง

ค่าใช้จ่ายของท่านในการเข้าร่วมการวิจัย

ท่านจะไม่เสียค่าใช้จ่ายในการเข้าร่วมการวิจัย

ค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย

ท่านจะไม่ได้รับเงินค่าตอบแทนจากการเข้าร่วมในการวิจัย เนื่องจากโครงการวิจัยนี้มีงบประมาณที่จำกัด ไม่มีงบประมาณสนับสนุนในส่วนของคุณค่าตอบแทนสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวออกจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

ผู้ทำวิจัยอาจถอนท่านออกจากโครงการเข้าร่วมการวิจัย เพื่อเหตุผลด้านความปลอดภัยของท่าน หรือเมื่อผู้สนับสนุนการวิจัยยุติการดำเนินงานวิจัย หรือ ในกรณีที่ท่านไม่ให้ความร่วมมือ และไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ทำวิจัย

การปกป้องรักษาข้อมูลความลับของอาสาสมัคร

ข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยสามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้แม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถแจ้ง หรือเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอมได้ โดยส่งไปที่ นพ.สิทธิศักดิ์ ธรรมาเวก ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลือดที่เหลือจากการวิจัยในครั้งนี้ ผู้ทำวิจัยขออนุญาตเก็บไว้ในรูปนิรนาม โดยจะใช้รหัสที่สามารถเชื่อมโยงกับข้อมูลเดิมของท่านได้ แต่จะเก็บรักษาข้อมูลของท่านเป็นความลับ ไม่เปิดเผยต่อสาธารณะและไม่มีการบันทึกข้อมูลส่วนตัวของท่านเพิ่มเติม เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยในภายภาคหน้า โดยจะทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นระยะเวลา 10 ปี ในกรณีที่ครบกำหนดระยะเวลาจัดเก็บ ผู้ทำวิจัยจะขอเก็บเลือดที่เหลือต่อไว้ใช้ในอนาคต โดยจะทำบันทึกขออนุญาตผ่านหัวหน้าภาควิชามายังคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย เนื่องจากไม่สามารถขออนุญาตท่านซึ่งเป็นเจ้าของเลือดโดยตรง อนึ่งการศึกษาวิจัยในภายภาคหน้าทุกครั้งที่มีการใช้เลือดที่เก็บไว้ นี้ จะแจ้งขออนุญาตและได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยทุกครั้ง เลือดที่ถูกเก็บไว้จะไม่มีการจำหน่ายหรือนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกบันทึกเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย และท่านจะไม่สามารถกลับมาเข้าร่วมในโครงการนี้ได้อีก ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลของท่านที่จำเป็นสำหรับใช้เพื่อการวิจัยไม่ได้ถูกบันทึก

จากการลงนามยินยอมของท่านผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย


ในฐานะที่ท่านเป็นผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

11. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
12. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์
13. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับการวิจัย
14. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับการวิจัย
15. ท่านจะได้รับการเปิดเผยถึงทางเลือกในการรักษาด้วยวิธีอื่น ซึ่งมีผลดีต่อท่านรวมทั้งประโยชน์และความเสี่ยงที่ท่านอาจได้รับ
16. ท่านจะได้รับทราบแนวทางในการรักษา ในกรณีที่พบโรคแทรกซ้อนภายหลังการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
17. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
18. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลกระทบใด ๆ ทั้งสิ้น
19. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
20. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านไม่ได้รับการชัดเจนต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้น โดยตรงจากการวิจัย หรือท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการ 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....

 <p>คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p>เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับเด็กอายุ 7-12 ปี (Information sheet for research participant)</p>
--	--

ชื่อโครงการวิจัย ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง
SNP45/SNP276 ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ผู้สนับสนุนการวิจัย อยู่ระหว่างการดำเนินการขอทุนมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

ผู้ทำวิจัย

ชื่อ นางสาววันวิสาข์ อุดมสินประเสริฐ

ที่อยู่ 513/540 ม.2 ต. ประชาธิปัตย์ อ. รัษฎบุรี จ.ปทุมธานี 12130

เบอร์โทรศัพท์ 087-068-9721, 02-958-4401

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ชื่อ นพ.สิทธิศักดิ์ หารยาเวก

ที่อยู่ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4482, 085-042-5466

ชื่อ นพ.ยง ภู่วรรณ

ที่อยู่ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4909

ถึง เด็กๆที่เข้าร่วมโครงการวิจัย

หนูได้รับเชิญให้เข้าร่วมในการวิจัย เนื่องจากหนูเป็นเด็กอายุ 7 – 12 ปี และเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีการคั่งของน้ำดีในตับ ดังนั้นถ้าหากหนูเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ผู้ทำวิจัยจะขอทำการเจาะเลือดของหนูบริเวณแขน ปริมาณประมาณ 3-5 มิลลิลิตร (1 ช้อนชา) ซึ่งจะทำให้หนูรู้สึกเจ็บคล้ายมดตัวใหญ่ๆกัด หนูมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก ซ้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือด หากหนูมีข้อสงสัยใด ๆ เกี่ยวกับความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย หนูสามารถสอบถามจากหมอผู้ทำวิจัยได้ตลอดเวลา

ถ้าหากหนูไม่ยินยอมเข้าร่วมโครงการ ก็ไม่เป็นไร จะไม่มีใครโกรธหนูเลย และได้รับการรักษาตามปกติจากคุณหมอ นอกจากนี้หากหนูตกลงเข้าร่วมวิจัยแล้ว ภายหลังต้องการหยุดหรือออกจากโครงการวิจัย หนูก็สามารถทำได้เช่นกัน


ผู้วิจัยจะขอนำเลือดของหนูที่เจาะในวันนี้ไปตรวจเพิ่มเติมเพื่อประโยชน์ด้านการศึกษาวิจัย ในอนาคตภายหลังจากโครงการวิจัยนี้เสร็จสิ้นโดยจะทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นระยะเวลา 10 ปี และจะไม่มีการบันทึกข้อมูลส่วนตัวใดๆของหนูเพิ่มเติม ในกรณีที่ครบกำหนดระยะเวลาจัดเก็บผู้วิจัยจะขอเก็บเลือดที่เหลือต่อไว้ใช้ในอนาคต โดยจะทำบันทึกขออนุญาตผ่านหัวหน้าภาควิชามายังคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย อนึ่งการศึกษาวิจัยในภายภาคหน้า ทุกครั้งที่มีการใช้เลือดที่เก็บไว้นี้ จะแจ้งขออนุญาตและได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยทุกครั้ง เลือดที่ถูกเก็บไว้จะไม่มีการจำหน่ายหรือนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์

ถ้าหากมีคำถามหนูสามารถโทรหาผู้วิจัยได้ที่เบอร์ 087-068-9721 ผู้วิจัยยินดีจะพูดคุยรายละเอียดให้หนูเข้าใจด้วยความเต็มใจ

หากหนูไม่ได้รับการชดเชยอันควรต่อการบาดเจ็บหรือเจ็บป่วยที่เกิดขึ้นโดยตรงจากการวิจัย หรือหนูไม่ได้รับการปฏิบัติตามที่ปรากฏในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย หนูสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอำนวยการชั้น 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถนนพระราม 4 ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร 0-2256-4455 ต่อ 14, 15 ในเวลาราชการ

ขอขอบใจในการร่วมมือของหนูมา ณ ที่นี้

.....

 <p style="text-align: center;">คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: center;">เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย สำหรับผู้แทนโดยชอบธรรม (Informed Consent Form)</p>
--	---

โครงการวิจัยเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง SNP45/SNP276 ในผู้ป่วย
โรคท่อน้ำดีตีบตัน

วันให้ความยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็น..... ของ ด.ช./ด.ญ./นาย/นาง/นางสาว.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมการวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่.....

แล้วข้าพเจ้ายินยอมให้ ด.ช./ด.ญ./นาย/นาง/นางสาว..... เข้าร่วมในโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่
พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมใน
การวิจัยนี้ ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัยได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการ
ทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยและ
แนวทางการรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัยมีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อ
สงสัยทั้งหมดจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัย สงสัยด้วย
ความเต็มใจ ไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัย พอใจ

ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยได้รับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว
ผู้เข้าร่วมการวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่จะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้าเข้าใจถึงสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัย เมื่อใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลและการ
บอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ผู้เข้าร่วมการวิจัยจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัยเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้
เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่น ในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย และ
คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน อาจจะได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลส่วนตัว
ของผู้เข้าร่วมการวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดย
การตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ข้าพเจ้าได้ให้ความยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทาง
การแพทย์ของผู้เข้าร่วมการวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมการวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการ
เข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวผู้เข้าร่วมการวิจัย

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้าและ ผู้เข้าร่วมการวิจัยมีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของ
ผู้เข้าร่วมการวิจัยและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัยได้ โดยต้องแจ้งให้
ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อของผู้เข้าร่วม
การวิจัย จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การ

ตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์
ในอนาคต เท่านั้น


ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้น และมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีให้ ค.ช./ค.ญ./นาย/นาง/นางสาว
.....(ชื่อ-นามสกุล ของผู้เข้าร่วมวิจัย) เข้าร่วมในโครงการวิจัยด้วย
ความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารใบยินยอมนี้

..... ลงนามผู้แทน โดยชอบธรรม
(.....) ชื่อผู้แทน โดยชอบธรรมตัวบรรจง
.....ความสัมพันธ์ของผู้แทน โดยชอบธรรมกับผู้เข้าร่วมการวิจัย
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย อาการไม่พึงประสงค์ หรือความเสี่ยง
ที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้แทน โดยชอบธรรมของ
ผู้เข้าร่วมการวิจัยตามนามข้างต้น ได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอม
ด้วยความเต็มใจ

..... ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

..... ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

 <p style="text-align: center;">คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: center;">เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย สำหรับเด็กอายุ 13-18 ปี (Informed Consent Form)</p>
--	--

โครงการวิจัยเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง SNP45/SNP276 ในผู้ป่วย
โรคท่อน้ำดีตีบตัน

วันให้ความยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....

ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็น..... ของ ด.ช./ด.ญ./นาย/นาง/นางสาว.....

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมการวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่.....

แล้วข้าพเจ้ายินยอมให้ ด.ช./ด.ญ./นาย/นาง/นางสาว..... เข้าร่วมในโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่
พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมใน
การวิจัยนี้ ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัยได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการ
ทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยและ
แนวทางการรักษาโดยวิธีอื่นอย่างละเอียด ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัยมีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อ
สงสัยทั้งหมดจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัย สงสัยด้วย
ความเต็มใจ ไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมการวิจัย พอใจ

ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยได้รับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว
ผู้เข้าร่วมวิจัยจะได้รับการรักษาพยาบาล โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่จะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

ข้าพเจ้าเข้าใจถึงสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัย เมื่อใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลและการ
บอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ผู้เข้าร่วมการวิจัยจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัยเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้
เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่น ในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย และ
คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน อาจจะได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลส่วนตัว
ของผู้เข้าร่วมการวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดย
การตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษาวิจัยนี้ข้าพเจ้าได้ให้ความยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทาง
การแพทย์ของผู้เข้าร่วมการวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมการวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการ
เข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวผู้เข้าร่วมการวิจัย

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้าและ ผู้เข้าร่วมการวิจัยมีสิทธิที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของ
ผู้เข้าร่วมการวิจัยและสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมการวิจัยได้ โดยต้องแจ้งให้
ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อของผู้เข้าร่วม
การวิจัย จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การ

ตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์
ในอนาคต เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้น และมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีให้ ค.ช./ค.ญ./นาย/นาง/นางสาว
.....(ชื่อ-นามสกุล ของผู้เข้าร่วมวิจัย) เข้าร่วมในโครงการวิจัยด้วย
ความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารใบยินยอมนี้


..... ลงนามผู้แทน โดยชอบธรรม
(.....) ชื่อผู้แทน โดยชอบธรรมตัวบรรจง
.....ความสัมพันธ์ของผู้แทน โดยชอบธรรมกับผู้เข้าร่วมการวิจัย
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

..... ลงนามผู้เข้าร่วม โครงการวิจัย
(.....) ชื่อผู้เข้าร่วม โครงการวิจัยตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย อาการไม่พึงประสงค์ หรือความเสี่ยง
ที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้แทน โดยชอบธรรมของ
ผู้เข้าร่วมการวิจัยตามนามข้างต้น ได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอม
ด้วยความเต็มใจ

..... ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

..... ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

 <p style="text-align: center;">คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>	<p style="text-align: center;">เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย สำหรับเด็กอายุ 7-12 ปี</p>
--	--

ชื่อโครงการวิจัยเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน adiponectin ที่ตำแหน่ง
SNP45/SNP276 ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

หนูชื่อ ค.ช./ ค.ญ.

ผู้วิจัยกำลังทำการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับสาเหตุการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรม และหนูได้รับเชิญให้เข้าร่วมในการวิจัย เนื่องจากหนูเป็นเด็กอายุ 7 – 12 ปี และเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน ผู้วิจัยจึงจะขอเก็บตัวอย่างเลือดของหนู โดยขอเจาะเลือดของหนู ปริมาณประมาณ 3-5 มิลลิลิตร (1 ช้อนชา) หลังเจาะเลือดในบางครั้งอาจจะมีรอยเขียวช้ำ ตรงบริเวณที่โดนเจาะแต่จะหายได้ในเวลา 3-5 วัน

ผู้วิจัยจะขออนุญาตให้หนูเข้าร่วมการวิจัยจากคุณพ่อคุณแม่ก่อน ถ้าหนูไม่อยากเข้าร่วมให้หนูบอกกับคุณพ่อคุณแม่ได้ ถ้าหนูไม่เข้าร่วมการวิจัยนี้ก็จะไม่มีใครว่า

หนูและพ่อและแม่ของหนูจะเปลี่ยนใจไม่ร่วมการวิจัยภายหลังได้ตลอดเวลา คุณหมอและพยาบาลจะไม่ว่าอะไรทั้งนั้น เพราะว่าคุณหมอและพยาบาลยินดีให้การดูแลหนูเสมอ

ลงชื่อ.....ผู้ยินยอม

(.....)ชื่อนาม-สกุล ตัวบรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ลงชื่อ.....ผู้แทนโดยชอบธรรม

(.....)ชื่อนาม-สกุล ตัวบรรจง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ภาคผนวก ข

การเตรียมบัฟเฟอร์ และสารละลาย

1. สารละลาย lysis buffer

5.0 M NaCl	15	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	48	ml
Distilled water เป็น	1,000	ml

ฆ่าเชื้อสารละลายด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลาย 20 mg/ml Proteinase K

Proteinase K	2	ml
Distilled water เป็น	100	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลาย 10X Tris-acetic EDTA buffer (TAE buffer)

Tris base	48.4	g
glacial acetic	17.0	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	7.44	ml
Distilled water เป็น	100	ml

ปรับ pH ของสารละลายเท่ากับ 7.8 ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. สารละลาย 1 M Tris-hydrochloric acid (pH 8.0)

Tris (MW: 121.14 g/mol)	181.7	g
Distilled water (ใช้ละลาย Tris)	70	ml
Distilled water เป็น	100	ml

ปรับ pH ของสารละลายเท่ากับ 8.0 ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. สารละลาย 10X Tris-boric EDTA buffer (TBE buffer)

Tris base	121.1	g
Boric acid anhydrous	55.6	ml
0.5 M Na ₂ EDTA	40	ml
Distilled water เป็น	1,000	ml

ปรับ pH ของสารละลายเท่ากับ 8.3 ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

6. สารละลาย red blood cell lysis buffer

KHCO ₃	0.5	g
NH ₄ Cl	4.15	g
EDTA	0.019	g
Distilled water (ใช้ละลายสาร)	100	ml
Distilled water เป็น	500	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำสารละลายกรองผ่าน filter ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 μ m

7. 2% Agarose gel (w/v)

Agarose	2	g
1X TBE	100	ml

ละลายด้วยการอุ่นในเตาไมโครเวฟจากนั้นผสมให้เข้ากันจนเจลละลายหมด

8. 30% polyacrylamide

Bis acrylamide	0.8	g
Distilled water (ใช้ละลาย bis)	25	ml
40% acrylamide	75	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากัน

9. 6X loading dye

Bromphenol blue	0.25	g
Xylene cyanol	0.25	g
Glycerol	50	ml
1M Tris (pH 8.0)	1	ml
Distilled water เป็น	100	ml

ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4° C

10. สารละลาย 10% Ammonium persulfate

Ammonium persulfate	0.1	g
Distilled water เป็น	1,000	ml

ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4° C

11. สารละลาย 1X Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.0	g
Na ₂ HPO ₄	1.16	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
KCl	0.2	g
Distilled water เป็น	1,000	ml

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วปรับ pH ของสารละลาย 7.2 นำเชื้อสารละลาย
ด้วยการ autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง