



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ความสัมพันธ์ระหว่างพหุสัณฐานในยีนเอสโตรเจนแอลฟา รีเซพเตอร์ และ
ความไวต่อโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศไทย
ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS IN THE *ESTROGEN*
RECEPTOR ALPHA GENE AND SUSCEPTIBILITY TO KNEE
OSTEOARTHRITIS IN THAI POPULATION

ชื่อนิสิต นางสาวกนกวรรณ ศรีมณี เลขประจำตัว 5832101123

ภาควิชา พฤกษศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	Association between polymorphisms in the <i>estrogen receptor alpha</i> gene and susceptibility to knee osteoarthritis in Thai population
ชื่อนิสิต	นางสาวกนกวรรณ ศรีมณี
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ
ปีการศึกษา	2561

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาวิชาพันธุศาสตร์

.....รัชนิกร ธรรมโชติ.....อาจารย์ที่ปรึกษา
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)
ธีรวิทย์ บวรจรัตน์.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืองวิทย์ บวรจรัตน์)
ภัทรา ยี่ทอง.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง)

ลิขสิทธิ์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิทยาศาสตร์	ความสัมพันธ์ระหว่างพหุสัณฐานในยีนเอสโตรเจนแอลฟารีเซพเตอร์และความไวต่อโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศไทย
ชื่อนิติบัตร	นางสาวกนกวรรณ ศรีมณี
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ความอ้วน การบาดเจ็บที่ข้อเข่า รวมถึงพันธุกรรม การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของพหุสัณฐานชนิด single nucleotide polymorphism (SNP) ใน ยีน *Estrogen receptor alpha (ESR1)* กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศไทย โดยวิเคราะห์ SNP ตำแหน่ง rs2234693 และ rs9340799 โดยใช้ดีเอ็นเอจากกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (การเสื่อมระดับ 3 ถึง 4) 176 ราย และกลุ่มควบคุม 160 ราย ด้วยวิธี PCR-RFLP จากการวิเคราะห์ พบว่า SNP ทั้งสองตำแหน่งของยีน *ESR1* มีความสัมพันธ์กับการลดการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (SNP ตำแหน่ง rs2234693 CC : OR = 0.31, $p = 0.006$ และ C : OR = 0.61, $p = 0.0013$ และตำแหน่ง rs9340799 GG : OR = 0.22, $p < 0.001$, AG : OR = 0.48, $p = 0.0025$ และ G : OR = 0.47, $p < 0.001$) อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเฉพาะในเพศหญิงเท่านั้น (SNP ตำแหน่ง rs2234693 CC : OR = 0.27, $p = 0.0007$ และ C : OR = 0.58, $p = 0.0018$ และตำแหน่ง rs9340799 GG : OR = 0.17, $p < 0.001$, AG : OR = 0.45, $p = 0.0035$ และ G : OR = 0.42, $p < 0.001$) ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าพหุสัณฐานในยีน *ESR1* มีความสัมพันธ์กับการลดการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม นอกจากนี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอาจแปรผันในประชากรอื่น

คำสำคัญ: โรคข้อเข่าเสื่อม, single nucleotide polymorphism, ยีน *Estrogen receptor alpha*

Title	Association between polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and susceptibility to knee osteoarthritis in Thai population
Student name	Miss Kanokwan Srimanee
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Assist. Prof Dr. Rachaneekorn Tammachote
Academic year	2018

ABSTRACT

Knee osteoarthritis is an important health problem that is common in the elderly. Can be caused by many reasons such as obesity, knee injury along with genetics. This study aims to analyze genetic relationships of single nucleotide polymorphism (SNP) in the *Estrogen receptor alpha (ESR1)* gene and knee osteoarthritis in the Thai population by analyzing 2 SNPs: rs2234693 and rs9340799. DNA samples from 176 knee osteoarthritis patients (severity levels 3 to 4) and 160 normal controls were analyzed by PCR-RFLP method. The results showed that both SNPs were associated with reduction of knee osteoarthritis (SNP position rs2234693 CC: OR = 0.31, $p = 0.006$ and C: OR = 0.61, $p = 0.0013$ and position rs9340799 GG: OR = 0.22, $p < 0.001$, AG: OR = 0.48, $p = 0.0025$ and G: OR = 0.47, $p < 0.001$). However, when the samples were stratified by gender, the significant association was found only in female (SNP position rs2234693 CC: OR = 0.27, $p = 0.0007$ and C: OR = 0.58, $p = 0.0018$ and position rs9340799 GG: OR = 0.17, $p < 0.001$, AG: OR = 0.45, $p = 0.0035$ and G: OR = 0.42, $p < 0.001$). Results from this study showed that SNPs in the *ESR1* gene were associated with reducing the occurrence of knee osteoarthritis. In addition, genetic relationships may vary in other populations.

Keywords: Knee osteoarthritis, single nucleotide polymorphism, *Estrogen receptor alpha* gene

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิทยาศาสตร์ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการในครั้งนี้ คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขโครงการฉบับนี้ อย่างดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบโครงการวิทยาศาสตร์ โดยมีผู้ช่วยศาสตราจารย์ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐพล ธรรมโชติ จากภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แอนนา วงษ์กุลจากภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวช วิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเพื่อการรวบรวมตัวอย่างเลือดและข้อมูลทางคลินิกของประชากรที่ใช้ศึกษาในโครงการฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วรลักษณ์ เกษตรนันท์ ที่ได้ให้คำปรึกษา ให้ความรู้เกี่ยวกับการวิเคราะห์ทาง สถิติ และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านของ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือด้วยความยินดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่ชาย พี่ตล ขอขอบคุณพี่ ๆ และเพื่อน ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยทางพันธุศาสตร์มนุษย์และการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำอย่างต่อเนื่องตลอดการดำเนินโครงการ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ น้อง ๆ รวมไปถึงทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย สุดท้ายนี้ ประโยชน์อันเกิดจากโครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ ผู้วิจัย ขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการศึกษา	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	18
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	35
รายการเอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	44

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 วิธีการคำนวณค่าออเดอเรโซ	10
ตารางที่ 2 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาลักษณะพหุสัณฐานบนยีน <i>ESR1</i>	16
ตารางที่ 3 ข้อมูลกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม	18
ตารางที่ 4 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่สามารถได้จากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ	22
ตารางที่ 5 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่างกลุ่มที่ 1	25
ตารางที่ 6 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2	26
ตารางที่ 7 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3	27
ตารางที่ 8 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่างกลุ่มที่ 4	28
ตารางที่ 9 ผลการทดสอบสมดุลงของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก	29
ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด	30
ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย	30
ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง	31
ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด	32
ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย	32
ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง	33
ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 และ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด	34

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 เปรียบเทียบข้อเข้าของคนปกติ และข้อเข้าของผู้มีอาการโรคข้อเข่าเสื่อม	4
รูปที่ 2 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม	6
รูปที่ 3 ตำแหน่งของยีน <i>ESR1</i> บนโครโมโซมที่ 6	7
รูปที่ 4 โครงสร้างหลักของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา	7
รูปที่ 5 บทบาทของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม	8
รูปที่ 6 การทำ PCR-RFLP และผลที่ได้ มีทั้งสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดและไม่ถูกตัด	9
รูปที่ 7 การทำ PCR-RFLP ณ ตำแหน่ง rs8144801 ในหนู	9
รูปที่ 8 ภาพถ่ายเจลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	19
รูปที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ direct DNA sequencing ของตัวอย่างที่ 1	20
รูปที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ direct DNA sequencing ของตัวอย่างที่ 2	20
รูปที่ 11 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ <i>PvuII</i> และ <i>XbaI</i>	21
รูปที่ 12 รูปแบบการตัดของ <i>PvuII</i> และ <i>XbaI</i> ณ ตำแหน่ง rs2234693 และ rs9340799	22
รูปที่ 13 ภาพถ่ายเจลหลังตรวจสอบด้วยวิธี direct DNA sequencing	23
รูปที่ 14 ภาพถ่ายเจลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากกลุ่มตัวอย่าง	24
รูปที่ 15 ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของตัวอย่างกลุ่มที่ 1	25
รูปที่ 16 ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2	26
รูปที่ 17 ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของตัวอย่างกลุ่มที่ 3	27
รูปที่ 18 ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของตัวอย่างกลุ่มที่ 4	28

บทที่ 1

บทนำ

โรคกระดูกและข้อเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญระดับโลก รวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากอุบัติการณ์ของโรคเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากสถิติผู้ป่วยโรคกระดูกและข้อในคนไทย พ.ศ. 2553 พบว่ามีผู้ป่วยโรคนี้มากกว่า 6 ล้านคน (Pereira et al., 2011) โดยโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุดในโรคข้อเสื่อม (osteoarthritis, OA) คาดว่าจะเป็นสาเหตุอันดับสี่ของความพิการในปีพ.ศ. 2563 (Haq and Davatchi, 2011) ในประเทศไทยพบโรคข้อเข่าเสื่อมได้มากถึงร้อยละ 60-70 ในผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 65 ปีขึ้นไป (ทวิพร เตชรัตนมณี, 2547) ในประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถพบโรคข้อเข่าเสื่อมได้ในผู้สูงอายุที่มีอายุตั้งแต่ 65 ขึ้นไปถึงร้อยละ 12.0 (Yurkow and Yudin, 2002)

โรคข้อเสื่อม หมายถึง โรคที่มีพยาธิสภาพเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นที่กระดูกอ่อนผิวข้อ (articular cartilage) และกระดูกที่อยู่ใต้ผิวข้อ (subchondral bone) ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะที่เกิดกับข้อชนิด synovial joint เช่น ข้อเข่า ข้อมือ ข้อสะโพก กระดูกไขสันหลัง เป็นต้น เกิดจากเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) สูญเสียการควบคุมสมดุลระหว่างการทำลายและการสังเคราะห์สารเนื้อพื้่นนอกเซลล์ (extracellular matrix) โรคนี้มีการเพิ่มการทำลายกระดูกอ่อนจากเอนไซม์ย่อยโปรตีน นอกจากนี้ยังมีสารช่วยกระตุ้นอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น สาร prostaglandins และสารในกลุ่ม reactive oxygen species ที่ช่วยให้เกิดพยาธิกำเนิดของโรคข้อเสื่อม (สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, 2553)

โรคข้อเข่าเสื่อมโดยปกติเกิดจากความชรา แต่อย่างไรก็ตามพันธุกรรม ความอ่อนแอของกล้ามเนื้อบริเวณข้อต่อ ท่าทางที่ผิดปกติ ความอ้วน และการเปลี่ยนแปลงสภาพการรับแรงกล เช่น การเคลื่อนไหวซ้ำ ๆ และการบาดเจ็บอาจทำให้ความเสี่ยงต่อการพัฒนาโรคข้อเสื่อมเพิ่มขึ้น การวิจัยทางระบาดวิทยาแสดงความแตกต่างระหว่างเพศกับความชุกและอุบัติการณ์ของโรคประจำตัวในเพศหญิงโดยทั่วไปมีความเสี่ยงสูง นอกจากนี้ความชุกของโรคข้อเข่าเสื่อมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในสตรีวัยหมดประจำเดือน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอิทธิพลของฮอร์โมนอาจมีผลต่อการพัฒนาโรคข้อเข่าเสื่อม (Ma et al., 2015)

ยีน *estrogen receptor alpha (ESR1)* อยู่บนโครโมโซมที่ 6 ตำแหน่ง 6q25.1-q25.2 ทำหน้าที่ผลิตเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา ซึ่งเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ มี 2 ชนิด คือ เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา และเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดเบต้า โดยเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา พบที่มดลูก ต่อมม้าม ระบบประสาทส่วนกลาง ระบบหัวใจและหลอดเลือด และกระดูก ในปริมาณมาก ส่วนเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดเบต้า จะพบมากในอวัยวะ ต่อมลูกหมาก รังไข่ ตับอ่อน ผิวหนังและกล้ามเนื้อลาย (Wiik et al., 2009) โปรตีนทั้งสองชนิดนี้อาจจัดรูปร่างเป็น homodimer หรือ heterodimer กันและอยู่ในกลุ่มตัวรับที่อยู่ในนิวเคลียส (super family nuclear receptor) ทั้งเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา และเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดเบต้าประกอบด้วยหลายโดเมนที่มีความสำคัญในการจับกับฮอร์โมน และดีเอ็นเอทำหน้าที่ร่วมกันในการกระตุ้นแฟกเตอร์ถอดรหัส (transcription factor) และการแปลรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีน (translation) (Riancho et al., 2010) นอกจากนี้เอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อมคือจับกับฮอร์โมนเอสโตรเจนและช่วยกระตุ้นให้เซลล์โปรเจนิเตอร์ (progenitor cells) ที่อยู่ในระยะพักของวัฏจักรเซลล์ เกิดการเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อนที่โตเต็มที่ (Robinson et al., 2017)

polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เป็นวิธีหนึ่ง ที่นิยมใช้สำหรับการตรวจสอบจีโนไทป์ของภาวะพหุสัณฐานชนิด single nucleotide polymorphism (SNP) ทำได้รวดเร็ว สามารถใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์รูปแบบจีโนไทป์ได้ โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้จากการทำ polymerase chain reaction (PCR) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) หากดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ของ SNP แตกต่างกัน เอนไซม์จะสามารถตัดได้เพียงบางรูปแบบ ส่งผลให้มีทั้งจีโนไทป์ที่เอนไซม์ตัดได้ และเอนไซม์ตัดไม่ได้จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดแตกต่างกัน และสามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบจีโนไทป์ได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Chuang et al., 2008)

งานวิจัยก่อนหน้านี้ทั้งในหลอดทดลองและในร่างกายรายงานว่า *ESR1* แสดงออกในเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์สร้างกระดูก และมีอิทธิพลต่อกระบวนการทางพยาธิวิทยาของโรคข้อเข่าเสื่อม การกลายพันธุ์ในยีน *ESR1* อาจเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Roman-Blas et al., 2009) มีงานวิจัยหลายงานที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 ในยีน *ESR1* กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Stemig et al., 2015; Liu et al., 2014; Dia et al., 2014; Borgonio-Cuadra et al., 2012; Riancho et al., 2010; Wise et al., 2009; Lian et al., 2007; Kang et al., 2007) อย่างไรก็ตาม ผลการเชื่อมโยงการกลายพันธุ์ในยีน *ESR1* กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมไม่สอดคล้องกัน (Ma et al., 2015) ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจขึ้นอยู่กับความหลากหลายของเชื้อชาติ เช่น การศึกษาของ Liu และคณะ พบว่ามีเพียง SNP ตำแหน่ง rs9340799 ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรฮั่นของจีน (Liu et al., 2014) ส่วนการศึกษาด้วยกรวิเคราะห์ถ้อยคำของ Hu และคณะ แสดงให้เห็นว่า SNP ตำแหน่ง rs2234693 อาจเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงที่ลดลงในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรจีน (Hu et al., 2015) และในการศึกษาของ Riancho และคณะ ในประชากรจาก 4 จุดสำคัญของประเทศสเปนและสหราชอาณาจักร พบว่า SNP ตำแหน่ง rs2234693 เท่านั้น ที่เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง (Riancho et al., 2010)

ปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพหุสัณฐานในยีน *ESR1* กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย ดังนั้นโครงการนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทยโดยจะทำการศึกษาในคนปกติและผู้ป่วยกลุ่มละอย่างน้อย 150 คน ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ด้านการทำนายโอกาสในการเกิดโรค

วัตถุประสงค์

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพหุสัณฐานตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 ของ *ESR1* และความเสี่ยงในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย

บทที่ 2

การตรวจเอกสารของงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

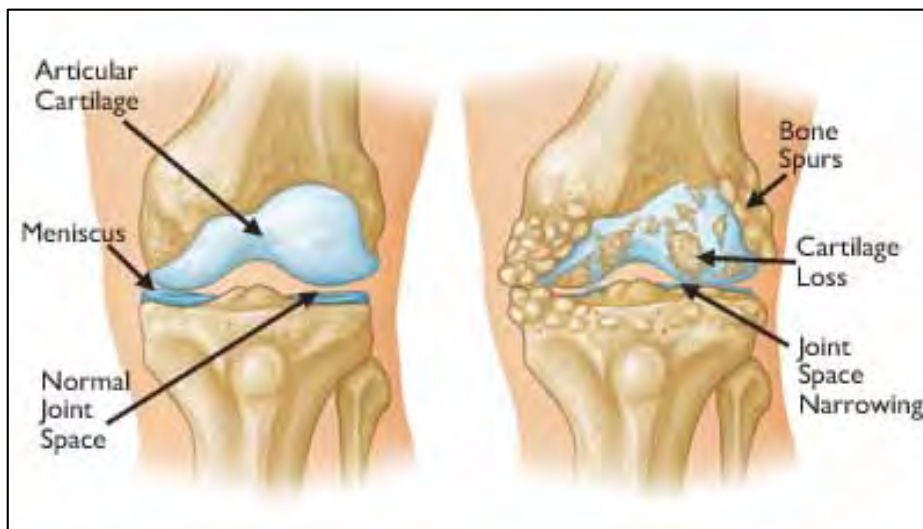
1. โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis)

โรคข้อเข่าเสื่อม คือ โรคที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางเสื่อมของข้อเข่า โดยบริเวณกระดูกอ่อนผิวข้อและในข้อชนิดที่มีเยื่อ (diarthrodial joint) เป็นตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน โดยพบการทำลายกระดูกอ่อนผิวข้อซึ่งเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ อย่างต่อเนื่องตามเวลาที่ผ่านไป กระดูกอ่อนผิวข้อมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี (biochemical) ชีวกลศาสตร์ (biomechanical) และโครงสร้าง (biomorphology) รวมถึงกระดูกบริเวณใกล้เคียง เช่น ขอบกระดูกในข้อ (subchondral bone) หนาตัวขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำไขข้อทำให้คุณสมบัติการหล่อลื่นลดลง (สมาคมรูมาติสซั่มแห่งประเทศไทย, 2550) ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอาการเจ็บปวดข้อเข่าขณะเคลื่อนไหวข้อ จนบางรายที่มีอาการรุนแรงไม่สามารถเดินได้ และนำไปสู่ภาวะทุพพลภาพ (Schuelert et al.,2011)

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรกระบบกล้ามเนื้อและข้อต่อที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มผู้สูงอายุ (Neogi and Zhang, 2013) ข้อมูลจากงานวิจัยในประเทศไทยพบค่าความชุกของโรคข้อเข่าเสื่อม มีพิสัยอยู่ที่ร้อยละ 34.5-45.6 (Kuptniratsaikul et al., 2002) มีหนึ่งงานวิจัยประมาณการณ์การเกิดอาการโรคข้อเข่าเสื่อมในช่วงชีวิตของบุคคลไว้ที่ร้อยละ 40 ในเพศชาย และร้อยละ 47 ในเพศหญิง และความเสี่ยงนี้จะเพิ่มในกลุ่มคนที่มีน้ำหนักตัวมากเกินไปหรือคนอ้วน (Murphy et al.,2008)

โรคข้อเข่าเสื่อมเกิดจากเซลล์กระดูกอ่อนสูญเสียการควบคุมสมดุลระหว่างการทำลายและการสังเคราะห์สารองค์ประกอบนอกเซลล์ โรคนี้มีการเพิ่มการทำลายกระดูกอ่อน จากเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinases) เช่น เอนไซม์ย่อยสารองค์ประกอบนอกเซลล์ (matrix metalloproteinase) สารจำพวกไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) ซึ่งสังเคราะห์โดยเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์เยื่อข้อ (synoviocytes) อาจมีส่วนช่วยเร่งกระบวนการสร้างเอนไซม์ที่ไปช่วยทำลายหรือย่อยสลายกระดูกอ่อน นอกจากนี้ยังมีสารช่วยกระตุ้นอื่น ๆ ที่ทำให้เกิดการอักเสบ (mediators of inflammation) เช่น สารโพรสตาแกลนดิน (prostaglandins) และสารในกลุ่ม reactive oxygen species ที่ช่วยทำให้เกิดพยาธิกำเนิดของโรคข้ออักเสบ (สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, 2553)

รูปแบบของโรคที่พบได้มากที่สุดโรคข้ออักเสบในเข่าคือ โรคข้อเข่าเสื่อม เกิดได้มากในผู้สูงอายุและยังส่งผลให้เกิดความพิการในผู้สูงอายุได้มากกว่าโรคอื่น ๆ การอักเสบจะเกิดทั่วทั้งข้อ ทำให้ร่างกายตอบสนองด้วยการซ่อมแซมส่วนที่ผิดปกติหรือเกิดการอักเสบ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อของข้ออย่างมากและพบได้บ่อยเมื่ออายุมากขึ้น (สมาคมเพื่อการศึกษาเรื่องความเจ็บปวด, 2559)



รูปที่ 1 เปรียบเทียบข้อเข่าของคนปกติ (ชาย) และข้อเข่าของผู้มีอาการโรคข้อเข่าเสื่อม (ขวา)
(<http://orthoinfo.aaos.org/topic.cfm?topic=a00212>)

อาการทางคลินิกของโรคข้อเข่าเสื่อม

ผู้ป่วยมีอาการปวดตื้อๆทั่วไปบริเวณข้อ ไม่สามารถระบุตำแหน่งได้ชัดเจน บางรายมีอาการตึงบริเวณข้อพับเข่า อาการปวดมักเป็นเรื้อรังและมากขึ้นเมื่อใช้งานหรือลงน้ำหนักบนข้อ หากอาการรุนแรงขึ้นอาจทำให้ปวดตลอดเวลาได้ มีเสียงดังกรอบแกรบในข้อเข่า มีอาการเดินไม่สะดวก อาการข้อฝืด ซึ่งพบได้บ่อยและมักเป็นตอนเช้า แต่มักไม่เกิน 30 นาที อาการฝืดอาจเกิดขึ้นชั่วคราวในช่วงแรกของการเคลื่อนไหวหลังจากพักเป็นเวลานาน เรียกว่า ปราณุกาณ์ข้อหนีต อาการขาโก่งที่เกิดจากข้อที่บวมและผิดรูป โดยข้อที่บวมเป็นการบวมจากกระดูกงอกโปนบริเวณข้อ นอกจากนี้ผู้ป่วยอาจสูญเสียการเคลื่อนไหวและการทำงานได้ (สมาคมเพื่อการศึกษาเรื่องความเจ็บปวด, 2559)

ปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคข้อเสื่อม

โรคข้อเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากหลายปัจจัย (multifactorial disorder) ได้แก่

1.อายุ เป็นหนึ่งในปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคข้อเสื่อมทุกชนิด อุบัติการณ์ของโรคข้อเข่าเสื่อมจะเพิ่มขึ้นตามอายุ เนื่องจากเมื่ออายุมากขึ้นระบบการทำงานของร่างกายรวมถึงจำนวนเซลล์ของกระดูกก็จะลดลง จึงสังเคราะห์ extracellular matrix ได้ลดลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของและโครงสร้างของกระดูกอ่อนผิวข้อ ทำให้เกิดอาการของโรคข้อเสื่อม (Loeser et al., 2005) และการใช้งานข้อเข่าที่หนักเกินไปมาเป็นเวลานาน อาจทำให้กระดูกอ่อนสึกกร่อน อีกทั้งหากเสียสมดุลระหว่างการสร้างและการสลายกระดูกก็อาจส่งผลให้เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Zhang et al., 2003)

2.เพศและฮอร์โมน เพศหญิงมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคข้อเสื่อมมากกว่าเพศชายและมักจะเป็นขั้นรุนแรงกว่า โดยมักจะเป็นในเพศหญิงวัยหมดประจำเดือน (Zhang et al., 2003) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอิทธิพลของฮอร์โมนหญิงมีผลต่อการพัฒนาโรคข้อเข่าเสื่อม (Ma et al., 2015) โดยภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้เซลล์กระดูกอ่อนซึ่งมีตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน ผลิตไซโตไคน์และมีเมตาบอลิซึมเปลี่ยนไปจากเดิม เนื่องจากเอสโตรเจนช่วยกระตุ้นการสร้างและซ่อมแซมกระดูกอ่อนผิวข้อ (Riancho et al., 2010)

3.เชื้อชาติ อัตราการเกิดโรคข้อเสื่อมและรูปแบบของข้อที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากโรคข้อเสื่อมมีความหลากหลายในแต่ละกลุ่มเชื้อชาติ มีงานวิจัยหลายงานที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพหุสัณฐาน (single nucleotide polymorphism, SNP) ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 ในยีน *ESR1* กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งผลการเชื่อมโยงการกลายพันธุ์ของยีน *ESR1* กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมไม่สอดคล้องกัน (Ma et al., 2015)

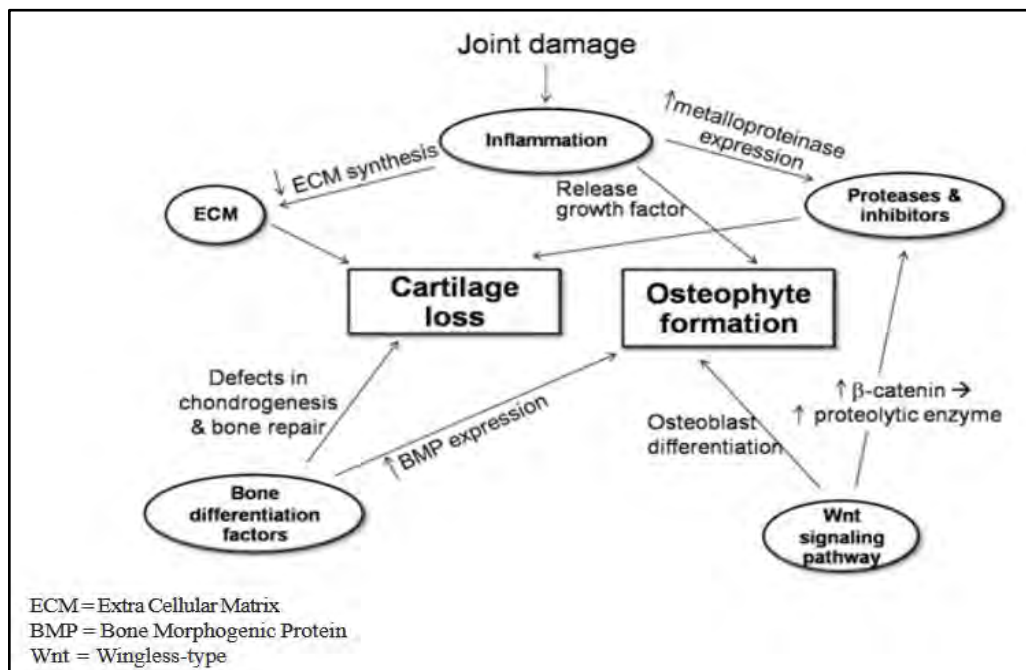
4.พันธุกรรม จากการศึกษา twin studies ของฝาแฝดหญิงจาก Australian National Health and Medical Research Council ประเทศออสเตรเลีย ที่เป็น monozygotic จำนวน 31 คู่ และ dizygotic จำนวน 37 คู่ แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดข้อเสื่อมร้อยละ 35 ถึง 60 เฉพาะในข้อเข่ามีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมถึงร้อยละ 40 (Valdes and spector, 2011) และเป็นการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ polygenic (Ikegawa, 2007) โดยอาจทำให้ขนาดของข้อมีความแตกต่างกัน (Spector et al., 1996)

5.ภาวะน้ำหนักตัวเกิน มีผลระยะยาวต่อการเกิดโรคข้อเสื่อม โดยเฉพาะข้อเข่า เนื่องจากข้อเข่าต้องรับน้ำหนักที่มากเกินไป ส่งผลให้กระดูกอ่อนผิวข้อสึกกร่อนได้ (Zhang et al., 2003) งานวิจัยของ Hedley และคณะพบว่า ผู้ที่มีดัชนีมวลกาย (BMI) เกิน 30 kg/m² จะมีโอกาสเป็นข้อเข่าเสื่อมเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 4 เท่า เมื่อเทียบกับผู้มีน้ำหนักตัวอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งมีค่า BMI อยู่ระหว่าง 18.5 kg/m² ถึง 24.9 kg/m² (Lementowski and Zelicof, 2008)

6.อุบัติเหตุ เป็นสาเหตุที่ส่งผลอย่างมากต่อการเกิดโรคข้อเสื่อม เนื่องจากผู้ที่เคยได้รับอุบัติเหตุบริเวณข้อนั้นอาจทำให้โครงสร้างข้อเกิดแตกหักได้และจะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคข้อเสื่อม (Zhang and Jordan, 2010)

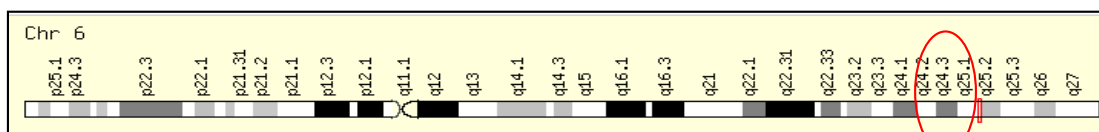
2. ยีน *estrogen receptor alpha (ESR1)*

มีการศึกษาพบว่า มียีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากกว่า 50 ยีน โดยสามารถแบ่งกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องเป็น 5 กลุ่ม คือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง extracellular matrix ยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณในวิถี Wnt (Wnt signaling pathway) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของกระดูก และยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน และตัวยับยั้งเอนไซม์ (Tammachote, 2011) ดังรูปที่ 2



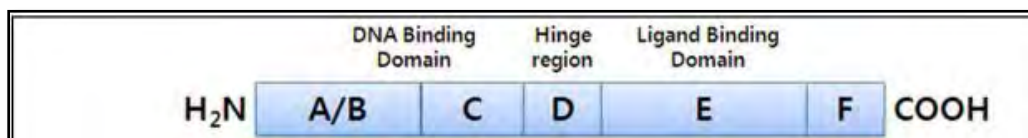
รูปที่ 2 กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Tammachote, 2011)

ยีน *ESR1* อยู่บนโครโมโซมที่ 6 ตำแหน่ง 6q25.1-q25.2 ดังรูปที่ 3 อยู่ในกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของกระดูก ยีน *ESR1* เป็นตัวกลางที่สำคัญในเส้นทางการถ่ายทอดสัญญาณในระบบต่อมไร้ท่อ (Ma et al., 2015) ทำหน้าที่ผลิตเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟาซึ่งเป็นตัวหลักในการกระตุ้นแฟกเตอร์ถอดรหัส (transcription factor) และการแปลรหัสเพื่อสังเคราะห์โปรตีน (translation) (Riancho et al., 2010) โปรตีนนี้มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย 5 โดเมนที่มีความสำคัญในการจับกับฮอร์โมน และดีเอ็นเอได้แก่ โดเมน A/B, C, D, E และ F ดังรูปที่ 4 โดยโดเมน A/B จะอยู่บริเวณ N-terminal ทำหน้าที่เป็น transactivation function ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัส (transcription) ของยีนเป้าหมายในเอสโตรเจนรีเซพเตอร์แต่ละชนิด โดเมน C เป็น DNA-binding domain ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงและเกี่ยวกับ receptor dimerization โดเมน D เป็น flexible hinge region เชื่อมระหว่างโดเมน C และ E โดเมน E เป็น ligand binding domain มีความสำคัญในการจับกับ ligand เกิดการจับคู่ของรีเซพเตอร์ (receptor dimerization) และการกระตุ้นการถอดรหัส (transcription activation) ส่วนโดเมน F ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน (Wiik et al., 2008) นอกจากนี้เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟายังมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม คือ จับกับฮอร์โมนเอสโตรเจนและช่วยกระตุ้นให้เซลล์โปรเจนิตอร์ (progenitor cells) ที่อยู่ในระยะพักของวัฏจักรเซลล์ เกิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อนที่โตเต็มที่ (Robinson et al., 2017) ดังรูปที่ 5



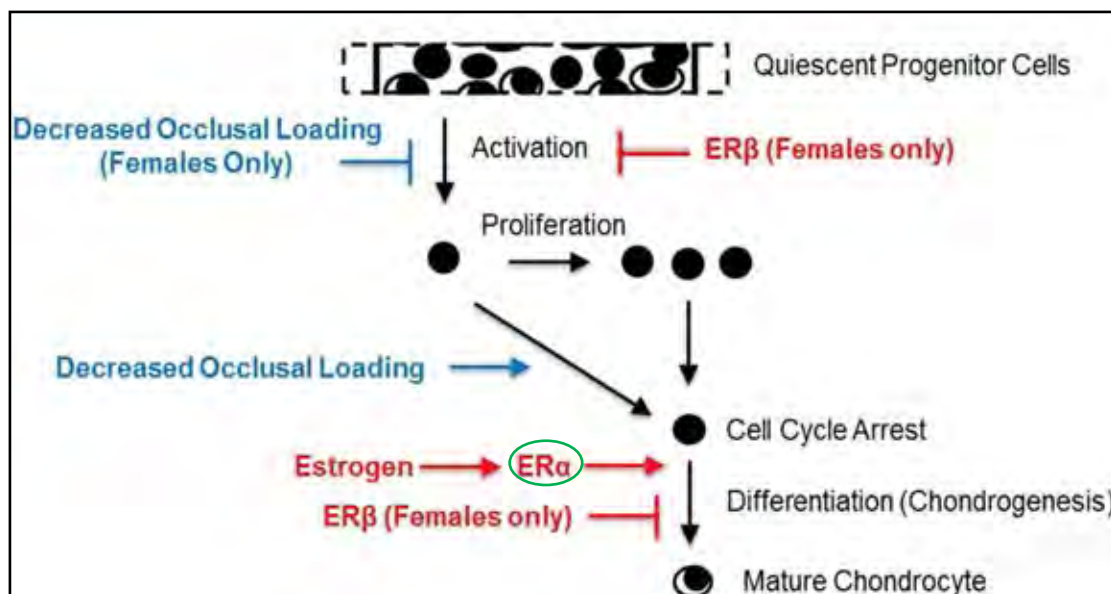
รูปที่ 3 ตำแหน่งของยีน *ESR1* บนโครโมโซมที่ 6

(<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ESR1>)



รูปที่ 4 โครงสร้างหลักของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา

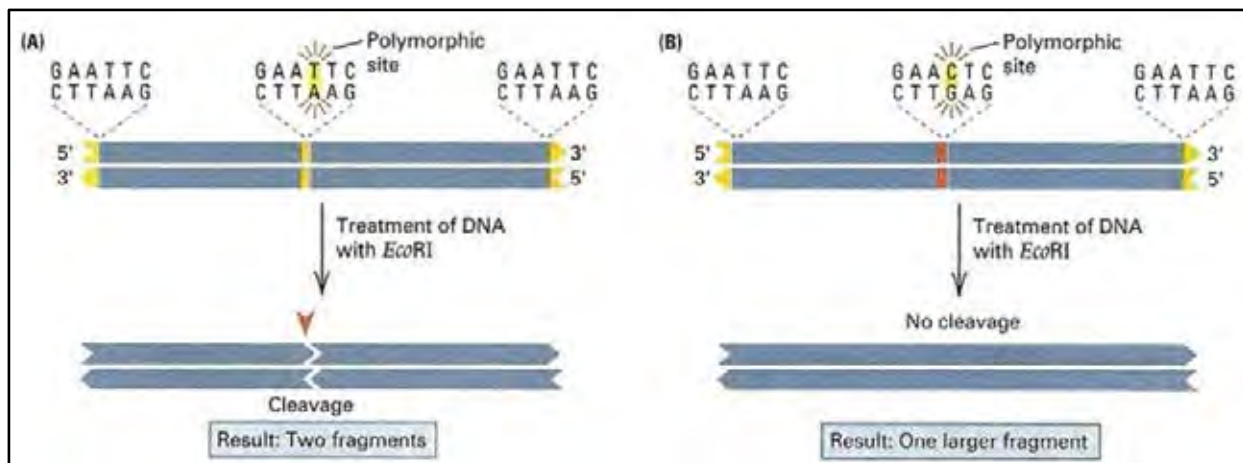
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3389841/figure/F1/?report=objectonly>)



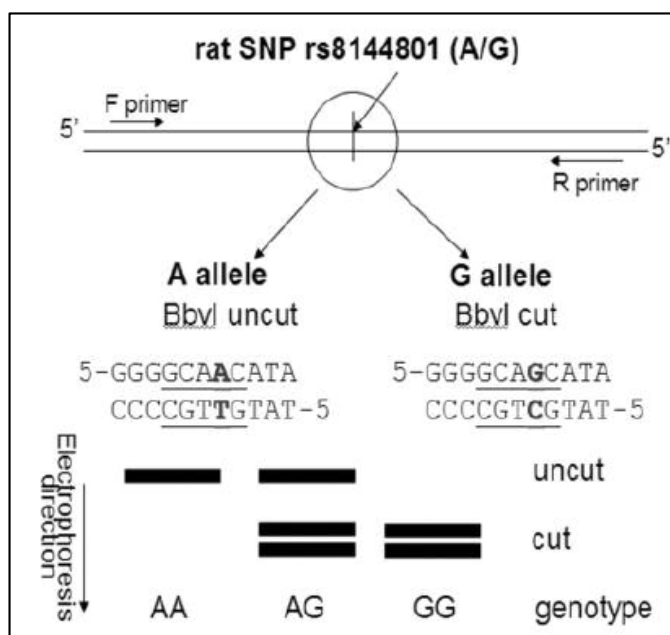
รูปที่ 5 บทบาทของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคข้อเสื่อม โดยฮอร์โมนเอสโตรเจน จับกับฮอร์โมนเอสโตรเจนและช่วยกระตุ้นให้ progenitor cells ที่อยู่ในระยะพักของวัฏจักรเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อนที่โตเต็มที่ (Robinson et al., 2017)

3. การวิเคราะห์ทางพันธุกรรม

การตรวจสอบจีโนไทป์ของ SNP มีหลายวิธี เช่น วิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) วิธี sequencing วิธี HRM วิธี TaqMan วิธี OpenArray และ วิธี Pyrosequencing สำหรับการศึกษานี้เลือกใช้วิธี PCR-RFLP ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้สำหรับการตรวจสอบจีโนไทป์ของ SNP ทำได้รวดเร็ว สามารถใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์รูปแบบจีโนไทป์ได้ โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้จากการทำพีซีอาร์ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งสามารถตัดโมเลกุลของดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะ โดยจะตัดเฉพาะตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นจุดจดจำของเอนไซม์ ซึ่งมักมีความยาว 4-6 คู่เบส หากดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ของ SNP แตกต่างกัน เอนไซม์จะสามารถตัดได้เพียงบางรูปแบบ ส่งผลให้มีทั้งจีโนไทป์ที่เอนไซม์ตัดได้ และเอนไซม์ตัดไม่ได้ดังรูปที่ 6 จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ขนาดแตกต่างกัน และสามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบจีโนไทป์ได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังรูปที่ 7 (Chuang et al., 2008)



รูปที่ 6 การทำ PCR-RFLP และผลที่ได้ มีทั้งสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดและไม่ถูกตัด
(<https://i.ytimg.com/vi/UcA9W7BbacQ/maxresdefault.jpg>)



รูปที่ 7 การทำ PCR-RFLP ณ ตำแหน่ง rs8144801 ในหนู ซึ่งแอลลีลที่เป็นไปได้มี 2 แอลลีล คือ A หรือ G ทำให้หนูมีจีโนไทป์ได้ 3 แบบ คือ AA AG และ GG โดยตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ BbvI คือ 5'-GCAGC-3' ดังนั้นเอนไซม์จึงตัดแอลลีล G ได้ แต่ไม่สามารถตัดแอลลีล A ได้ (Chuang et al, 2008)

4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การเลือกค่าสถิติเพื่อวัดความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัว ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวแปร การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้การวิเคราะห์ค่าไคสแควร์ และค่า Odds ratio ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

4.1 ค่าไคสแควร์ (Chi-square)

การวิเคราะห์ค่าไคสแควร์เป็นการทดสอบทางสถิติที่ใช้เปรียบเทียบระหว่างข้อมูลที่ได้จากการทดลองกับค่าคาดหวังที่คำนวณได้ซึ่งค่าคาดหวังสามารถคำนวณได้จากค่าความน่าจะเป็น วัตถุประสงค์ของการทดสอบนี้คือ เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลจากการศึกษาว่าเป็นไปตามทฤษฎีหรือไม่ หากความแปรปรวนของข้อมูลเกิดจากการคาดเคลื่อนของการสุ่มเพียงอย่างเดียว นั่นคือยอมรับสมมติฐานว่าอัตราส่วนที่ศึกษาเป็นไปตามทฤษฎี แต่หากความแตกต่างระหว่างค่าสังเกตและค่าคาดหวังไม่ได้เกิดจากการคาดเคลื่อนจากการสุ่มเพียงอย่างเดียว นั่นคือยอมรับสมมติฐานว่าอัตราส่วนที่กำลังศึกษาไม่เป็นไปตามทฤษฎี (วัชรภรณ์ สุริยาภิวัฒน์, 2552) ค่าไคสแควร์สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Observe} - \text{Expected})^2}{\text{Expected}}$$

4.2 Odds ratio (OR)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ค่า Odds ratio เป็นการคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัวที่แต่ละตัวแปรจัดกลุ่มที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกรณีที่มีหรือไม่มีปัจจัยที่สงสัยจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคน้อยเพียงใด (Szumilas, 2010)

ตารางที่ 1 วิธีการคำนวณค่า Odds ratio

		จำนวนประชากรแต่ละกลุ่ม	
		ผู้ป่วย	คนปกติ
ปัจจัยที่ทำการศึกษา	มีปัจจัย	A	B
	ไม่มีปัจจัย	C	D

สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Odds ratio} = \frac{(D)(A)}{(C)(B)}$$

- A คือความถี่ของแอลกอฮอล์หรือจ๊อบที่เป็นปัจจัยเสี่ยงแล้วทำให้เกิดโรค
- B คือความถี่ของแอลกอฮอล์หรือจ๊อบที่เป็นปัจจัยเสี่ยงแล้วไม่ทำให้เกิดโรค
- C คือความถี่ของแอลกอฮอล์หรือจ๊อบที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยงแล้วทำให้เกิดโรค
- D คือความถี่ของแอลกอฮอล์หรือจ๊อบที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยงแล้วไม่ทำให้เกิดโรค

โดยค่า Odds ratio ที่ได้สามารถแปลความหมายได้ดังนี้

OR = 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษาไม่มีความสัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยง

OR > 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษามีความสัมพันธ์กับการมีปัจจัยเสี่ยงเมื่อเทียบกับคนปกติ

OR < 1 การมีปัจจัยเสี่ยงนั้นทำให้ไม่เกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา

โดยทุกครั้งที่ศึกษาค่า Odds ratio จะสุ่มมาศึกษาแค่ครั้งเดียวดังนั้นจึงต้องรายงานค่าเป็นช่วงซึ่งนิยามกันคือ 95% confident intervals (95% CI) โดยค่า 95% CI ต้องมีค่าไม่อยู่ในระหว่าง 1 และค่า P-value < 0.05 จึงถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการ

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็นตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุม กลุ่มละอย่างน้อย 150 ราย ซึ่งกลุ่มผู้ป่วยผู้ป่วยที่เป็นประชากรไทย อายุ 50 ปีขึ้นไป คัดเลือกเฉพาะผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของการเสื่อมของข้อเข่าอยู่ในช่วงเกรด 3 ถึง 4 ตามเกณฑ์ของ Kellgren และ Lawrence (Kellgren and Lawrence, 1957) ซึ่งพิจารณาจากการตรวจทางรังสีวิทยาโดยแพทย์เฉพาะทาง และกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มประชากรไทยอายุ 50 ปีขึ้นไป ที่ได้รับการซักประวัติ สอบถามอาการ และการตรวจทางรังสีวิทยาโดยแพทย์เฉพาะทางเพื่อสรุปว่าอาสาสมัครไม่ได้เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม และไม่มีประวัติอุบัติเหตุ หรือทำกิจกรรม/เล่นกีฬาที่ ทำให้เข่าเสื่อม โดยอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ไม่ถูกคัดเข้าในการศึกษานี้ โดยตัวอย่างจะอยู่ในรูปของเลือด ซึ่งได้รับมาจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ คณะแพทยศาสตร์ มหาลาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ซึ่งกลุ่มตัวอย่างเหล่านี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติแล้ว

วัสดุอุปกรณ์

- ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด P2, P20, P100, P200, P1000 (Gilson, France)
- ไมโครปิเปตทิว (micropipette tip) ขนาด 10 μ l, 200 μ l และ 1000 μ l (ExtraGene Inc., Taiwan)
- หลอด microcentrifuge ขนาด 0.2 ml. และ 1.5 ml (ExtraGene Inc.)
- Weighing machine ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- Beaker
- Flask
- Rack
- Para film
- Vortex machine
- เครื่องปั่นเหวี่ยง MIKRO 120 MICROLITER CENTRIFUGE (Hettich Lab Technology, USA)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Heat block ALB64 (FINEPCR, Korea)
- Submerge-Mini Gel Electrophoresis System WSE-1710 (ATTO, Japan)
- เตอบไมโครเวฟ (SHARP, Thailand)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ GenePro Thermal cycler (Bioer Technology, China)
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม 10X Tri-Borate-EDTA (TBE)

- Tris (hydroxymethyl) amino methane (Bio Basic Canada INC., Canada) 108 g
- Boric acid (Bio Basic Canada INC., Canada) 55 g
- EDTA (Bio Basic Canada INC., Canada) 7.44 g
- ปรับปริมาตรน้ำกลั่น (ตัวทำละลาย) ให้มีปริมาตร 1000 ml จากนั้นนำมาปรับความเข้มข้นเป็น 1X TBE

2. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)

3. สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

- Nuclease free-H₂O water (Apsalagen)
- 10X reaction buffer (Apsalagen)
- 50 mM MgCl₂ (Apsalagen)
- 10 mM dNTP Mix, PCR Grade (Invitrogen, USA)
- Oligonucleotide primer (Macrogen Korea) สำหรับ ยีน *ESR1* ที่ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799
- *Taq* DNA Polymerase (Fermentas International Inc., USA)

ก. สารเคมีที่ใช้ในการทำ RFLP

- เอนไซม์ตัดจำเพาะ : *PvuII* และ *XbaI* (New England BioLabs., USA)
- 10X CutSmart buffer (New England BioLabs., USA)

ข. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

- Agarose (VETEC, China)
- 1X Tri-Borate-EDTA (1X TBE buffer)
- Ethidium bromide
- 100 bp DNA Ladder OneMARK 100 (GeneDireX, Taiwan)
- 25 bp DNA Ladder HyperLadder™ 25bp (Bioline, England)
- 6X DNA loading dye (biotech rabbit GmbH, Germany)
- Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs)
- RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000X) (iNtRON Biotechnology, USA)

วิธีการดำเนินการ

1. การรวบรวมตัวอย่าง

รวบรวมข้อมูลทางคลินิกของอาสาสมัคร ได้แก่ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง การเสื่อมของข้อเข่า และการปรากฏของการเสื่อมที่ข้อต่ออื่น และรวบรวมตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 3 มิลลิลิตร โดยพยาบาลวิชาชีพของแผนกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และขอรับรองการพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 (คณะแพทยศาสตร์) ในการศึกษาประกอบด้วยอาสาสมัคร 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุมกลุ่มละอย่างน้อย 150 ราย ในศึกษานี้ ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม หมายถึง ผู้ป่วยที่เป็นประชากรไทย อายุ 50 ปีขึ้นไป คัดเลือกเฉพาะผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของการเสื่อมของข้อเข่าอยู่ในช่วงเกรด 3 ถึง 4 ตามเกณฑ์ของ Kellgren และ Lawrence (1957) ซึ่งพิจารณาจากการตรวจทางรังสีวิทยาโดยแพทย์เฉพาะทาง กลุ่มควบคุม หมายถึงอาสาสมัครที่เป็นประชากรไทยอายุ 50 ปีขึ้นไป ที่ได้รับการซักประวัติ สอบถามอาการ และการตรวจทางรังสีวิทยาโดยแพทย์เฉพาะทางเพื่อสรุปว่า อาสาสมัครไม่ได้เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม และไม่มีประวัติอุบัติเหตุ หรือทำกิจกรรม/เล่นกีฬาที่ทำให้เข่าเสื่อม โดยอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมาตอยต์ไม่ถูกคัดเข้าในการศึกษานี้

2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดปริมาตร 1 ml มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ *AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit* (Bioneer, Korea) โดยในขั้นสุดท้ายใช้ 200 μ l ในการชะดีเอ็นเอใส่ลงในหลอด 1.5 ml centrifuge tube จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 nm และค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ตามสูตร $\text{DNA concentration (ng/}\mu\text{L)} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$ และคำนวณค่าความบริสุทธิ์ของ DNA ได้จาก $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ (หยาดพิรุณ โทมี่ และคณะ, 2552)

3. ทดลองทำ PCR-RFLP

ในเบื้องต้นได้ทดลองทำ PCR-RFLP โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ 2 ตัวอย่างได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 และ ตัวอย่างที่ 2 เพื่อทราบรายละเอียดของขั้นตอนและปริมาณสารที่เหมาะสมในการทำพีซีอาร์ อีกทั้งได้ส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ข้างต้นไปทำ direct DNA sequencing เพื่อยืนยันผลว่าไพรเมอร์ที่ใช้นั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 ของยีน *ESR1* จริง และยืนยันผลว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* และ *XbaI* สามารถใช้จำแนกจีโนไทป์ของตำแหน่งดังกล่าวได้ถูกต้อง จากนั้นจึงจะทำ PCR-RFLP ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เหลือ

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในหนึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย Nuclease free- H_2O water ปริมาณ 13.8 μ l, 10X buffer ปริมาณ 2.0 μ l, dNTP ความเข้มข้น 10 mM ปริมาณ 0.4 μ l, forward และ reverse primer ที่ออกแบบโดยโปรแกรม Primer3 (Untergasser et al., 2012) ดังตารางที่ 2 ความเข้มข้น 10 μ M อย่างละ 0.4 μ l, MgCl_2 ความเข้มข้น 50 mM ปริมาณ 0.8 μ l, *Taq* DNA polymerase 0.2 μ l และ DNA 2.0 μ l ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาในการทำพีซีอาร์แต่ละหลอดเป็น 20 μ l โดยมีรอบการทำพีซีอาร์ ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำปฏิกิริยาที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ทำทั้งหมด 35 รอบ หลังจากนั้นเป็นขั้น final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้ว นำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรสที่ความเข้มข้น 2 % ซึ่งประกอบด้วย agarose 0.5 g, 1X TBE buffer 25 ml ในการตรวจสอบนั้นจะใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5 μ l รวมกับ loading dye 1 μ l เทียบกับขนาดดีเอ็นเอของ 100 bp DNA ladder โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที

ตารางที่ 2 ข้อมูลไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาลักษณะพหุสัณฐานบนยีน *ESR1*

ไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์ (5'-3')	ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (bp)
Forward	5'- AGGGTTATGTGGCAATGACG -3'	584
Reverse	5'- TCCTTGGCAGATCCATAGC -3'	

3.2 การตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีการ direct DNA sequencing

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 ตัวอย่างที่ได้ตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และพบว่ามีความยาว 584 bp ซึ่งคาดว่าเป็นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 ตัวอย่างละ 15 μ l มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) โดยในขั้นสุดท้ายใช้ EL buffer 20 μ l ในการชะผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ใส่ลงในหลอด 1.5 ml centrifuge tube และนำ forward primer 10 μ l ส่งไปด้วย ซึ่งการทำ direct DNA sequencing นี้ได้ส่งไปทำที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

เมื่อได้ผล DNA sequencing แล้วจึงนำผลมาวิเคราะห์จีโนไทป์ ในตำแหน่ง SNP rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 หลังจากนั้นทำการบันทึกข้อมูลไว้ และทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลโดยทำ RFLP ในตัวอย่างเดิมที่ทำการส่ง DNA sequencing โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* และ *XbaI* และตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังข้อ 2.3

3.3 การตรวจสอบลักษณะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 ด้วยวิธี PCR-RFLP

ทำพีซีอาร์โดยใช้ตัวอย่างที่ 1 และ ตัวอย่างที่ 2 ตามขั้นตอน 2.1 อีกครั้งและนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้ ผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 15 μ l, Cut Smart buffer 2 μ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* 0.2 μ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* 0.2 μ l และ Nuclease free-H₂O water 2.6 μ l ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 3% ซึ่งประกอบด้วย agarose 0.75 g, 1XTBE buffer 25 ml โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

4. ทำ PCR-RFLP กับตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมด

เมื่อได้ผลจากการทดลองทำ PCR-RFLP ในการทดลองที่ 2 ว่าปริมาณของสารและขั้นตอนตามการทดลองที่ 2 นั้นสามารถจำแนกจีโนไทป์ของตำแหน่งดังกล่าวได้ถูกต้อง จากนั้นจึงทำ PCR-RFLP ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่เหลือ

4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในหนึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย Nuclease free-H₂O water ปริมาณ 13.8 μ l, 10X buffer ปริมาณ 2.0 μ l, dNTP ความเข้มข้น 10 mM ปริมาณ 0.4 μ l, forward และ reverse primer ดังตารางที่ 2 ความเข้มข้น 10 μ M อย่างละ 0.4 μ l, MgCl₂ ความเข้มข้น 50 mM ปริมาณ 0.8 μ l, Taq DNA polymerase 0.2 μ l และ DNA 2.0 μ l ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาในการทำพีซีอาร์ แต่ละหลอด เป็น 20 μ l โดยมีรอบการทำพีซีอาร์ ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำปฏิกิริยาที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ทำทั้งหมด 35 รอบ หลังจากนั้นเป็นขั้น final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้ว นำไปบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังข้อ 3.2

4.2 การตรวจสอบลักษณะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 ด้วยวิธี PCR-RFLP

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ทั้งหมด มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้ ผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 15.0 μ l, Cut Smart buffer 2.0 μ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ PvuII 0.2 μ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI 0.2 μ l และ Nuclease free-H₂O water 2.6 μ l ลงในหลอดทดลอง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรสที่ความเข้มข้น 3% ซึ่งประกอบด้วย agarose 1.8 g, 1X TBE buffer 60 ml โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 42 นาที

4.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิกของประชากรด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2013 (USA) โดยใช้การทดสอบไคสแควร์ (กำหนดค่า P -value < 0.05) เปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างเพศหญิงต่อเพศชายของสองกลุ่มตัวอย่าง และใช้ unpaired Student's t-test เปรียบเทียบข้อมูลอายุ น้ำหนัก ส่วนสูง และค่าดัชนีมวลกายระหว่างสองกลุ่มตัวอย่าง

ตรวจสอบสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) โดยใช้ OEGE - Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology (<http://www.oege.org/software/hardyweinberg.html>) (Rodriguez, Gaunt, and Day, 2009)

ทดสอบความเป็นอิสระกันของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรม โดยการทดสอบไคสแควร์แบบที่ละคู่ และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมด้วย odds ratio (OR) โดยใช้ MEDCALC® easy-to-use statistical software (MedCalc Software, Belgium)

บทที่ 4 ผลการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างเลือด ดีเอ็นเอพร้อมบันทึกข้อมูลของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารวมทั้งสิ้น 336 ราย ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 (คณะแพทยศาสตร์) โดยมีรหัสโครงการวิจัยคือ MTU-EC-OT-4193/60 แบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 176 ราย และกลุ่มควบคุม 160 ราย ข้อมูลสัดส่วนระหว่างเพศหญิงต่อเพศชาย อายุเฉลี่ยและค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ย (BMI) แสดงดังตารางที่ 3 สัดส่วนระหว่างเพศหญิงและเพศชายในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและในกลุ่มควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับน้ำหนักเฉลี่ยและค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ย ในขณะที่ อายุเฉลี่ยและส่วนสูงของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3 ข้อมูลกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม

ข้อมูลทางคลินิก	กลุ่มผู้ป่วย n = 176	กลุ่มควบคุม n = 160	P-value*
เพศหญิง/เพศชาย	146/30	123/37	>0.05
อายุ (ปี)	70.2±9.3	57.5±7.2	<0.001*
น้ำหนัก (กก.)	61.7±11.5	63.6±12.2	0.157
ส่วนสูง (ซม.)	155.5±7.4	157.7±6.2	0.003*
ค่าดัชนีมวลกาย (กก./ม ²)	25.6±4.4	25.5±4.2	0.943

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

(ค่าเฉลี่ยของอายุ และ BMI คำนวณจากกลุ่มผู้ป่วย 176 ตัวอย่าง กลุ่มควบคุม 160 ตัวอย่าง) รายละเอียดตั้งข้อมูลในภาคผนวก)

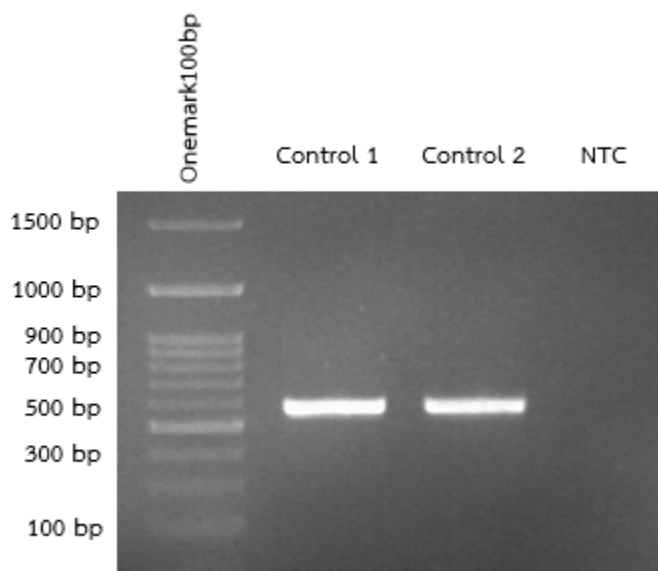
2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเลือดในกลุ่มตัวอย่าง จากนั้นนำมาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.181 – 654.925 ng/μl และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ พบว่า มีค่า OD₂₆₀/OD₂₈₀ อยู่ระหว่าง -197.699 – 66.084

3. ทดลองทำ PCR-RFLP

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *ESR1*

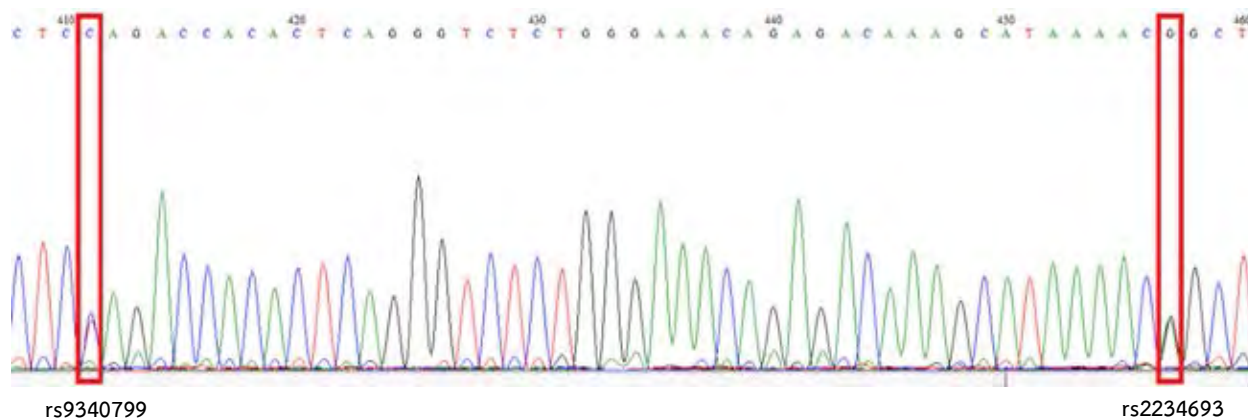
จากการทดลองทำ PCR-RFLP โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ 2 ตัวอย่าง และตรวจสอบผลจากการทำพีซีอาร์ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 584 bp ตามที่คาด ดังรูปที่ 8 นอกจากนี้ พบว่า ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอสำหรับการทำ RFLP



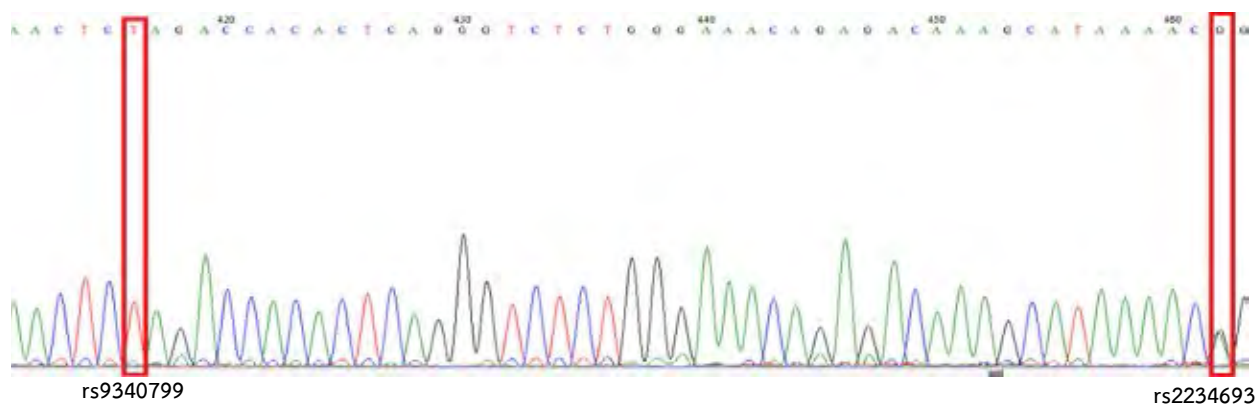
รูปที่ 8 ภาพถ่ายเจลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 จากซ้ายไปขวา ตามลำดับ โดย NTC คือ Non template control

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct DNA sequencing

จากการใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 ไปทำ direct DNA sequencing พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครอบคลุมบริเวณที่ต้องการศึกษาจริง และตัวอย่างที่ 1 มีจีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 เป็น TC และ AG ตามลำดับ (รูปที่ 9) และตัวอย่างที่ 2 มีจีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 เป็น TC และ AA (รูปที่ 10) ตามลำดับ



รูปที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบโดยการทำ direct DNA sequencing จากด้าน Reverse prime ของตัวอย่างที่ 1 พบว่ามีจีโนไทป์เป็น TC และ AG ตามลำดับ



รูปที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการตรวจสอบโดยการทำ direct DNA sequencing จากด้าน Reverse primer ของตัวอย่างที่ 2 พบว่ามีจีโนไทป์เป็น TC และ AA ตามลำดับ

3.3 การตรวจสอบ SNP ณ ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 ที่ทราบจีโนไทป์ของ จาก DNA sequencing แล้ว ด้วยวิธี PCR-RFLP

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของตัวอย่างที่ได้ศึกษาจีโนไทป์ด้วยวิธีการ DNA sequencing แล้ว มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* และ *XbaI* เพื่อตรวจสอบรูปแบบการตัด SNP ณ ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 โดย *PvuII* และ *XbaI* มีตำแหน่งจดจำ (recognition site) ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *PvuII* และ *XbaI*

(<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r7260?lang=en®ion=TH> และ <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r2631?lang=en®ion=TH>)

โดย ณ ตำแหน่ง rs2234693 มีรูปแบบของจีโนไทป์ 3 แบบ ได้แก่ TT, TC และ CC ซึ่งเอนไซม์จะสามารถจดจำรูปแบบที่เป็นแบบ T เท่านั้น จึงทำให้มีเพียงรูปแบบ TT และ TC ที่สายดีเอ็นเอจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* แล้ว จะได้แถบของดีเอ็นเอ ดังนี้

รูปแบบจีโนไทป์ TT จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ 488 bp และ 96 bp

รูปแบบจีโนไทป์ TC จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ 584 bp, 488 bp และ 96 bp

รูปแบบจีโนไทป์ CC จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ 584 bp

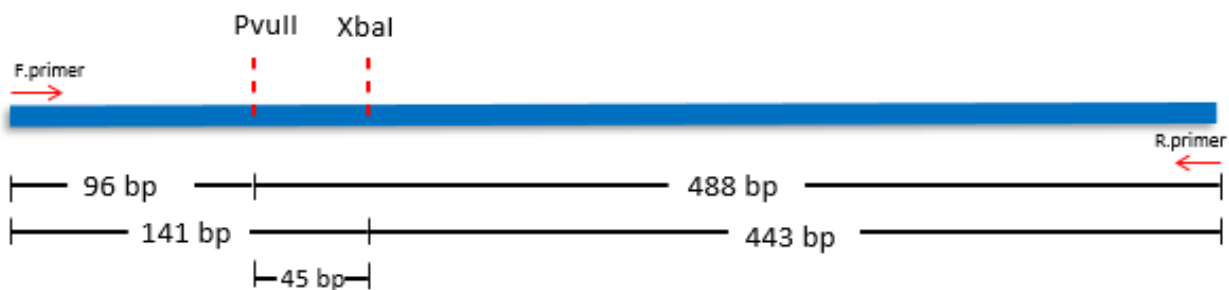
และ ณ ตำแหน่ง rs9340799 มีรูปแบบของจีโนไทป์ 3 แบบ ได้แก่ AA, AG และ GG ซึ่งเอนไซม์จะสามารถจดจำรูปแบบที่เป็นแบบ A เท่านั้น จึงทำให้มีเพียงรูปแบบ AA และ AG ที่สายดีเอ็นเอจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* แล้วจะได้แถบของดีเอ็นเอ ดังนี้

รูปแบบจีโนไทป์ AA จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ 443 bp และ 141 bp

รูปแบบจีโนไทป์ AG จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ 584 bp, 443 bp และ 141 bp

รูปแบบจีโนไทป์ GG จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ 584 bp

ซึ่งรูปแบบการตัดของทั้งสองเอนไซม์เป็นดังรูปที่ 12 และสามารถสรุปความเป็นไปได้ของแถบดีเอ็นเอที่จะได้จากการตัดของทั้งสองเอนไซม์ ดังตารางที่ 4

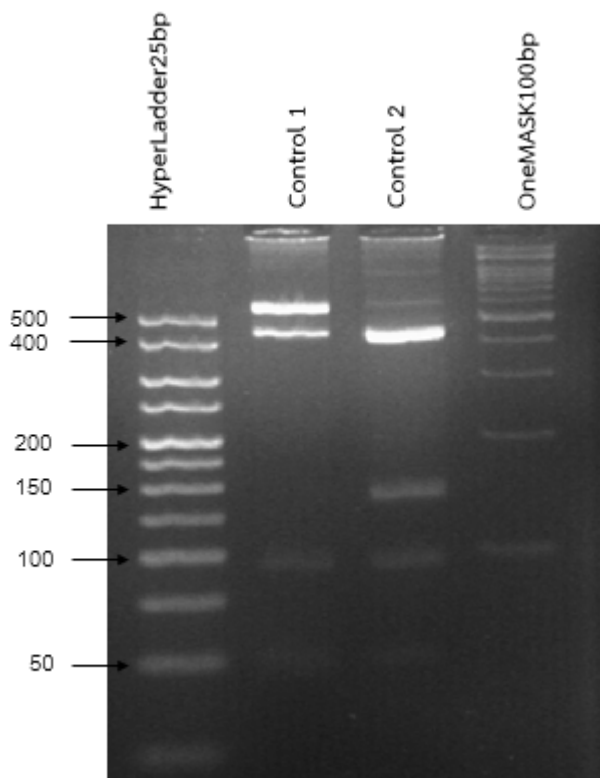


รูปที่ 12 รูปแบบการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* และ *XbaI* ณ ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799

ตารางที่ 4 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่สามารถได้จากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* และ *XbaI* ณ ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799

<i>PvuII</i>	<i>XbaI</i>	แอลลีล	ขนาด (base pair)					
			584	488	443	141	96	45
TT	AA	TA/TA			✓		✓	✓
TC	AA	TA/CA			✓	✓	✓	✓
CC	AA	CA/CA			✓	✓		
TT	AG	TA/TG		✓	✓		✓	✓
TC	AG	TA/CG	✓		✓		✓	✓
TC	AG	TG/CA		✓	✓	✓	✓	
CC	AG	CA/CG	✓		✓	✓		
TT	GG	TG/TG		✓			✓	
TC	GG	TG/CG	✓	✓			✓	
CC	GG	CG/CG	✓					

ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของตัวอย่างที่ได้ศึกษาจีโนมไทป์ด้วยวิธีการ direct DNA sequencing แล้ว มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* และ *XbaI* พบว่ามีผลจาก sequencing และ PCR-RFLP สอดคล้องกัน ดังรูปที่ 13

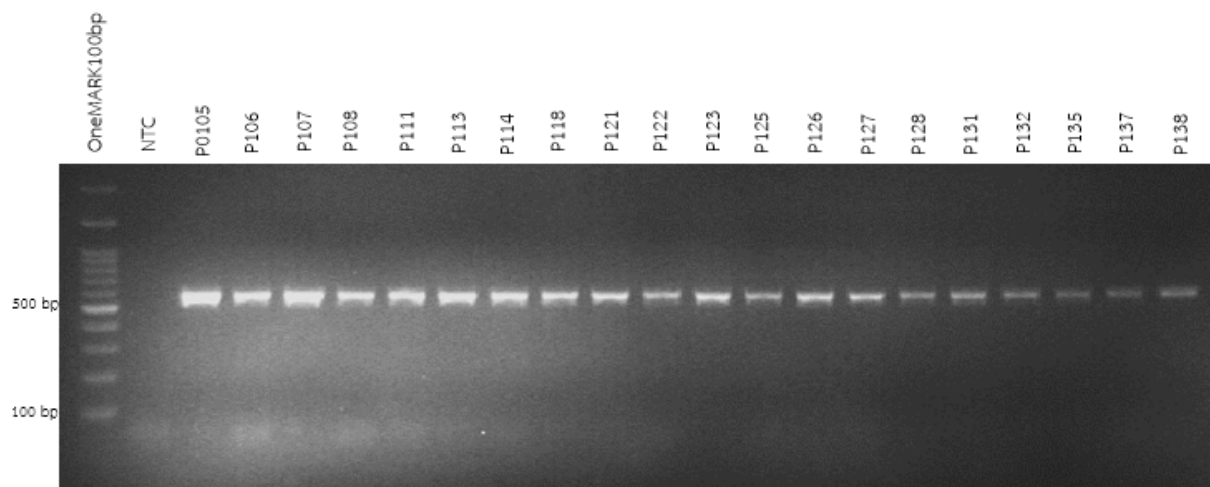


รูปที่ 13 ภาพถ่ายเจลที่ทำการตรวจสอบรูปแบบของจีโนมไทป์ในตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 หลังจากตรวจสอบด้วยวิธี direct DNA sequencing เรียบร้อยแล้ว ผลการตรวจสอบเป็นไปในทางเดียวกัน คือ จีโนมไทป์ของตัวอย่างที่ 1 ณ ตำแหน่ง rs2234693 เป็น TC และตำแหน่ง rs9340799 เป็น AG และจีโนมไทป์ของตัวอย่างที่ 2 ณ ตำแหน่ง rs2234693 เป็น TC และตำแหน่ง rs9340799 เป็น AA

4. ทำ PCR-RFLP กับตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมด

4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

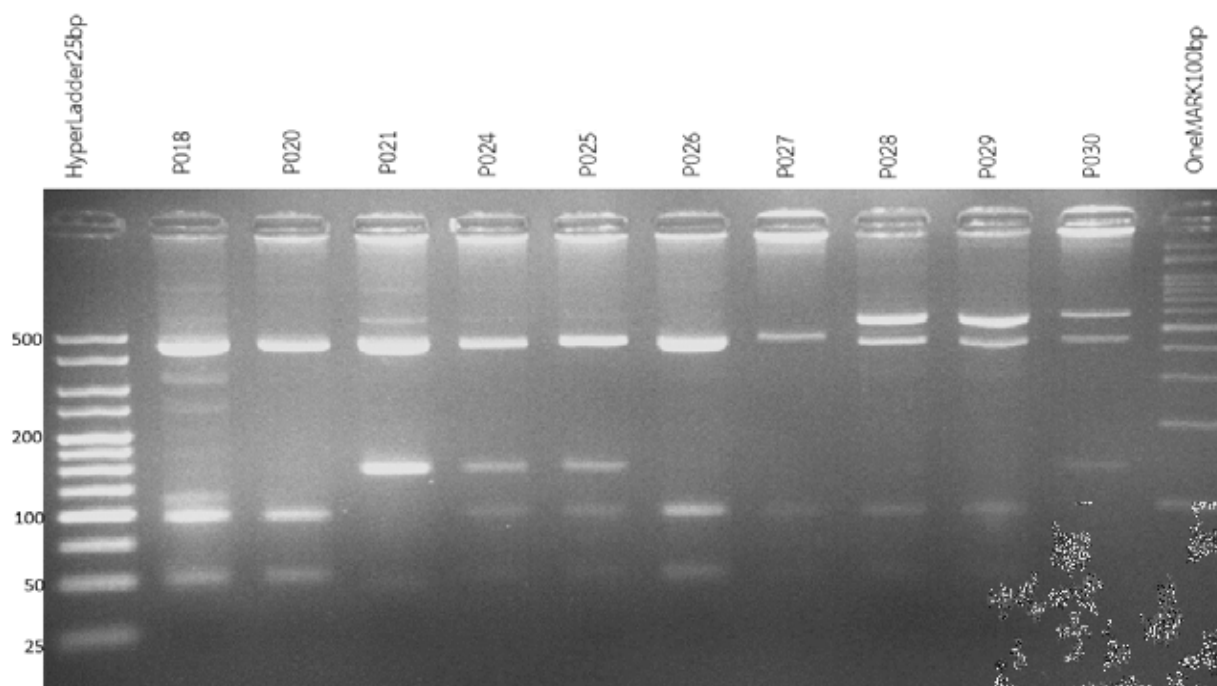
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 584 bp ตามที่คาด นอกจากนี้ พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอสำหรับการทำ RFLP ตัวอย่างภาพถ่ายเจลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 ภาพถ่ายเจลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากตัวอย่าง P105, P106, P107, P108, P111, P113, P114, P118, P121, P122, P123, P125, P126, P127, P128, P131, P132, P135, P137 และ P138 จากซ้ายไปขวา ตามลำดับ โดย NTC คือ Non template control

4.2 การตรวจสอบ SNP ณ ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 ด้วยวิธี PCR-RFLP

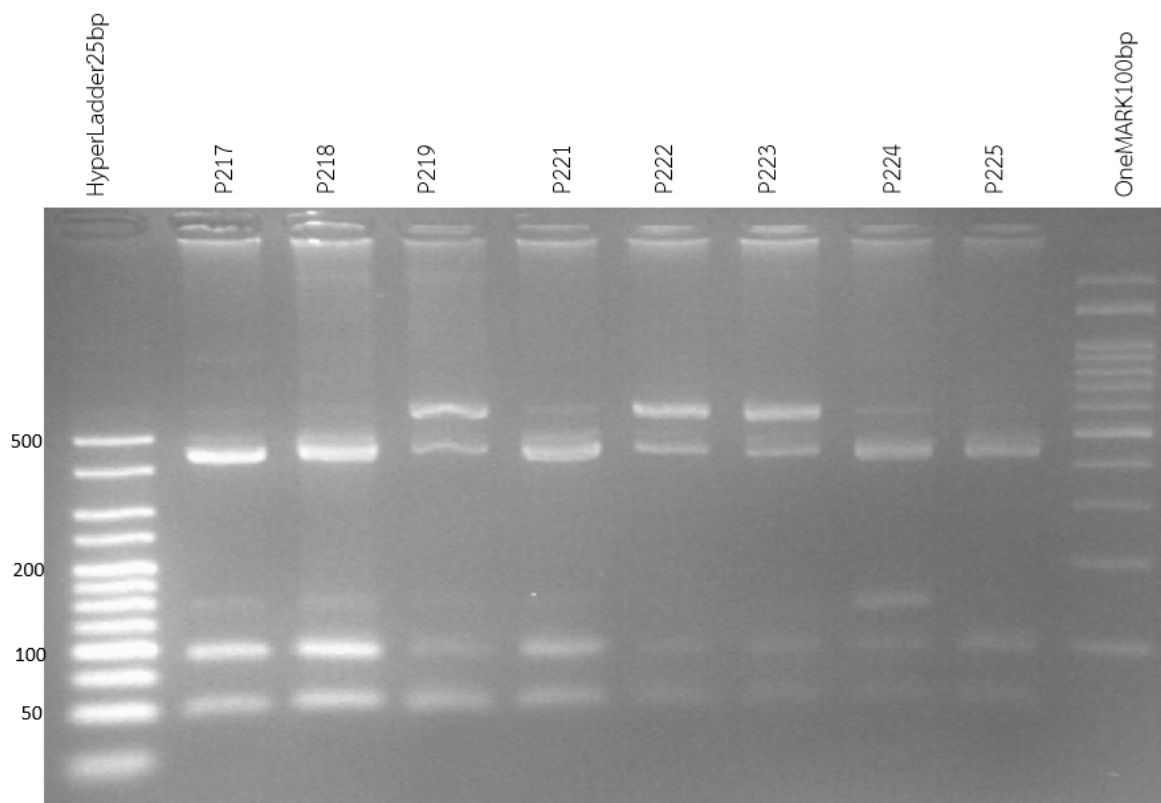
ตัวอย่างผลการตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ 38 ราย จากทั้งหมด 336 ราย แสดงในรูปที่ 15 ถึง 18 และตารางที่ 5 ถึง 8



รูปที่ 15 ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของกลุ่มตัวอย่าง ได้ผลจีโนไทป์ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่าง P018, P020, P021, P024, P025, P026, P027, P028, P029 และ P030

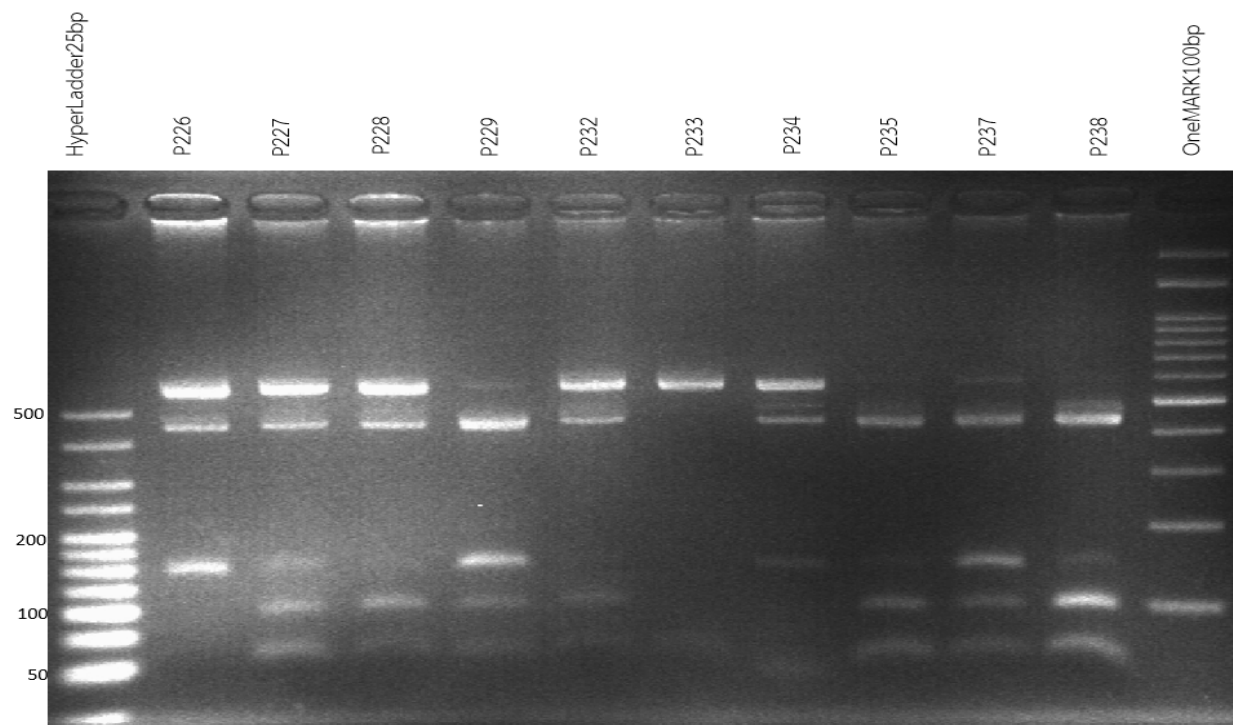
ชื่อตัวอย่าง	จีโนไทป์ (rs2234693-rs9340799)	ชื่อตัวอย่าง	จีโนไทป์ (rs2234693-rs9340799)
P018	TT-AA	P026	TT-AA
P020	TT-AA	P027	TT-GG
P021	CC-AA	P028	TC-AG
P024	TC-AA	P029	TC-AG
P025	TC-AA	P030	CC-AG



รูปที่ 16 ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของกลุ่มตัวอย่าง ได้ผลจีโนไทป์ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่าง P217, P218, P219, P221, P222, P223, P224 และ P225

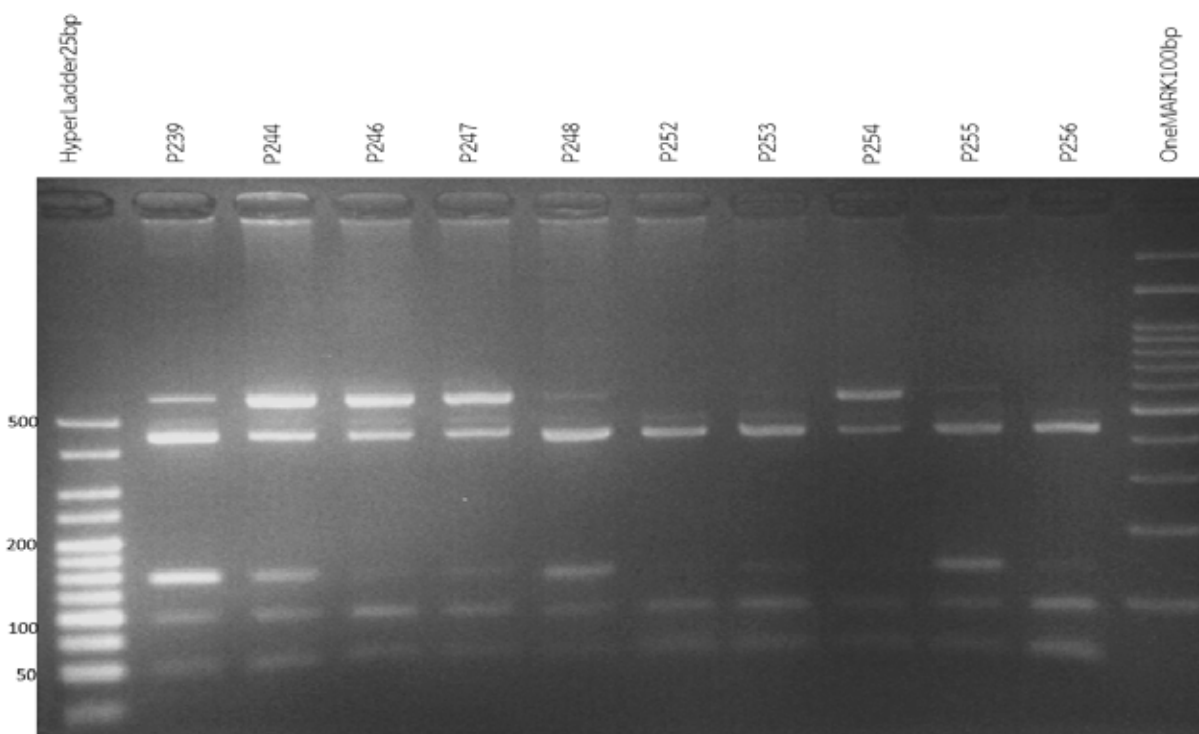
ชื่อตัวอย่าง	จีโนไทป์ (rs2234693-rs9340799)	ชื่อตัวอย่าง	จีโนไทป์ (rs2234693-rs9340799)
P217	TC-AA	P222	TC-AG
P218	TC-AA	P223	TC-AG
P219	TC-AG	P224	TC-AA
P221	TT-AA	P225	TT-AA



รูปที่ 17 ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของกลุ่มตัวอย่าง ได้ผลจีโนไทป์ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่าง P226, P227, P228, P229, P232, P233, P234, P235, P237 และ P238

ชื่อตัวอย่าง	จีโนไทป์ (rs2234693-rs9340799)	ชื่อตัวอย่าง	จีโนไทป์ (rs2234693-rs9340799)
P226	CC-AG	P233	CC-GG
P227	TC-AG	P234	CC-AG
P228	TC-AG	P235	TC-AA
P229	TC-AA	P237	TC-AA
P232	TC-AG	P238	TC-AA



รูปที่ 18 ภาพถ่ายเจลที่ได้จากการทำ PCR-RFLP ของกลุ่มตัวอย่าง ได้ผลจีโนไทป์ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลจีโนไทป์ของตัวอย่าง P239, P244, P246, P247, P248, P252, P253, P254, P255 และ P256

ชื่อตัวอย่าง	จีโนไทป์ (rs2234693-rs9340799)	ชื่อตัวอย่าง	จีโนไทป์ (rs2234693-rs9340799)
P239	TC-AA	P252	TT-AA
P244	TC-AG	P253	TT-AA
P246	TC-AG	P254	TC-AG
P247	TC-AG	P255	TC-AA
P248	TC-AA	P256	TT-AA

4.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

จากการทดสอบสมดุของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่า rs2234693 และ rs9340799 มีการกระจายของจีโนไทป์อยู่ในสมดุของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ($P > 0.05$) ทั้งในประชากรทั้งหมด ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 9) ซึ่งจะได้รับการวิเคราะห์ทาง สถิติอื่น ๆ ต่อไป

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบสมดุของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

	Common homozygotes	Heterozygotes	Rare Homozygotes	Chi-squared	P-value*
rs2234693	TT	TC	CC		
ประชากรทั้งหมด	93	179	64	1.81	>0.05
กลุ่มผู้ป่วย	57	98	21	4.63	>0.01*
กลุ่มควบคุม	36	81	43	0.03	>0.05
rs9340799	AA	AG	GG		
ประชากรทั้งหมด	139	149	48	0.62	>0.05
กลุ่มผู้ป่วย	91	71	14	0	>0.05
กลุ่มควบคุม	48	78	34	0.05	>0.05

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs2234693 ในประชากรทั้งหมด (ตารางที่ 10) พบว่าจีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับการเกิดข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง (ตารางที่ 11 - 12) พบความสัมพันธ์แบบเดียวกันนี้เฉพาะในเพศหญิงเท่านั้น

ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด (OR = odds ratio, CI = confidence interval)

	กลุ่มผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	OR (95%CI)	P-value*
จีโนไทป์				
TT ^a	57	36	1	
TC	98	81	0.76	0.3018
CC	21	43	0.31	0.0006*
แอลลีล				
T ^a	208	158	1	
C	138	167	0.61	0.0013*

^aจีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย (OR = odds ratio, CI = confidence interval)

	กลุ่มผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	OR (95%CI)	P-value*
จีโนไทป์				
TT ^a	11	10	1	
TC	14	18	0.71	0.5387
CC	5	9	0.51	0.3350
แอลลีล				
T ^a	36	38	1	
C	24	36	0.70	0.3174

^aจีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง (OR = odds ratio, CI = confidence interval)

	กลุ่มผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	OR (95%CI)	P-value*
จีโนไทป์				
TT ^a	46	26	1	
TC	84	63	0.75	0.3403
CC	16	34	0.27	0.0007*
แอลลีล				
T ^a	176	115	1	
C	116	131	0.58	0.0018*

^aจีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs9340799 ในประชากรทั้งหมด (ตารางที่ 13) พบว่าทุกจีโนไทป์ของ SNP นี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง (ตารางที่ 14 – 15) พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเดียวกันนี้เฉพาะในเพศหญิงเท่านั้น

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด (OR = odds ratio, CI = confidence interval)

	กลุ่มผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	OR (95%CI)	P-value*
จีโนไทป์				
AA ^a	91	48	1	
AG	71	78	0.48	0.0025*
GG	14	34	0.22	<0.0001*
แอลลีล				
A ^a	253	174	1	
G	99	146	0.47	<0.0001*

^aจีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย (OR = odds ratio, CI = confidence interval)

	กลุ่มผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	OR (95%CI)	P-value*
จีโนไทป์				
AA ^a	17	15	1	
AG	10	17	0.52	0.2187
GG	3	5	0.53	0.4333
แอลลีล				
A ^a	44	47	1	
G	16	27	0.63	0.2274

^aจีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง (OR = odds ratio, CI = confidence interval)

	กลุ่มผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	OR (95%CI)	P-value*
จีโนไทป์				
AA ^a	74	33	1	
AG	61	61	0.45	0.0035*
GG	11	29	0.17	<0.0001*
แอลลีล				
A ^a	209	127	1	
G	83	119	0.42	<0.0001*

^aจีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากร กับ rs2234693 และ rs9340799 พร้อมกัน พบว่าทุกจีโนไทป์มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นจีโนไทป์ CT-AA และ TT-GG (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 และ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด (OR = odds ratio, CI = confidence interval)

	กลุ่มผู้ป่วย	กลุ่มควบคุม	OR (95%CI)	P-value*
จีโนไทป์				
CC-GG	7	8	0.28	0.0336*
CC-AG	12	19	0.20	0.0008*
CC-AA	2	16	0.04	0.0001*
CT-GG	3	21	0.05	<0.0001*
CT-AG	50	42	0.38	0.0090*
CT-AA	45	18	0.80	0.5810
TT-GG	4	5	0.25	0.0636
TT-AG	9	17	0.17	0.0005*
TT-AA ^a	44	14	1	

^aจีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

จากการเก็บตัวอย่างเลือดและดีเอ็นเอของกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม สามารถบันทึกข้อมูลได้อย่างถูกต้อง การสกัดดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอจากกลุ่มตัวอย่างและนำไปตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพดี จึงนำไปทำพีซีอาร์ต่อ ผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากภาพถ่ายวีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส พบว่าตัวอย่างมีแถบสว่างชัดเจนมากกว่า 80% ซึ่งจะนำตัวอย่างดังกล่าวไปทำ RFLP ต่อ วิธี RFLP เป็นวิธีที่ง่ายในการระบุจีโนป์ เนื่องจากวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้โปรแกรมเฉพาะใด ๆ ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ และสามารถระบุจีโนไทป์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มี SNP หลายตำแหน่งได้ในปฏิกิริยาเดียว สำหรับตัวอย่างที่แถบไม่ชัดเจน ผู้ทดลองนำกลับมาทำพีซีอาร์อีกครั้ง โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ แล้วจึงนำไปทำ RFLP ต่อ ผลที่ได้จากการทำ RFLP พบว่าตัวอย่างมากกว่า 80% สามารถนำไปวิเคราะห์จีโนไทป์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิสยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอขนาด 443 และ 488 pb ออกจากกันได้ ทำให้ไม่สามารถแปรผลจีโนไทป์ TT-AA และ TT-AG ได้อย่างชัดเจน จึงบ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์อีกครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันผลการระบุจีโนไทป์ของตำแหน่ง rs9340799

ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน *ESR1* กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่า SNP ตำแหน่ง rs2234693 จีโนไทป์ CC (OR = 0.31, 95% CI = 0.16-0.60, $p = 0.006$) และแอลลีล C (OR = 0.61, 95% CI = 0.44-0.82, $p = 0.0013$) มีความสัมพันธ์กับการเกิดข้อเข่าเสื่อมที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบความสัมพันธ์แบบเดียวกันนี้เฉพาะในเพศหญิงเท่านั้น (CC : OR = 0.27, 95% CI = 0.12-0.57, $p = 0.0007$), (C : OR = 0.58, 95% CI = 0.41-0.82, $p = 0.0018$) สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ SNP ตำแหน่ง rs9340799 พบว่าทุกจีโนไทป์มีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (GG : OR = 0.22, 95% CI = 0.11-0.44, $p < 0.001$), (AG : OR = 0.48, 95% CI = 0.30-0.78, $p = 0.0025$) และแอลลีล G มีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 0.47, 95% CI = 0.34-0.64, $p < 0.001$) และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเดียวกันนี้เฉพาะในประชากรเพศหญิงเท่านั้น (GG : OR = 0.17, 95% CI = 0.08-0.38, $p < 0.001$), (AG : OR = 0.45, 95% CI = 0.26-0.77, $p = 0.0035$), (G : OR = 0.42, 95% CI = 0.30-0.61, $p < 0.001$) และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ SNP ตำแหน่ง rs2234693 และตำแหน่ง rs9340799 พร้อมกัน พบว่าทุกจีโนไทป์มีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นจีโนไทป์ CT-AA และ TT-GG

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Riancho และคณะ ในประชากรจาก 4 จุดสำคัญของประเทศสเปนและสหราชอาณาจักร พบว่าจีโนไทป์ CC ของ SNP ตำแหน่ง rs2234693 มีแนวโน้มเป็นจีโนไทป์ที่ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมของในประชากรเพศหญิง (OR = 0.76, 95% CI = 0.59-0.97, $p = 0.028$) (Riancho et al., 2010) อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP นี้ กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรจีนฮั่น พบว่า จีโนไทป์ CC (OR = 1.73, 95% CI = 0.65-3.94, $p = 0.071$) ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Lui et al.,

2014) เป็นไปได้ว่าความแตกต่างของความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจเกิดจากภูมิหลังทางพันธุกรรม (genetic background) ของประชากรแต่ละเชื้อชาติ แสดงให้เห็นว่าประชากรไทยกับประชากรจีนอื่น แม้จะเป็นชาวเอเชียเหมือนกันแต่เมื่อเป็นคนละประชากร ก็มี genetic background ที่แตกต่างกัน ส่วนประชากรไทยซึ่งเป็นชาวเอเชียกับ ประชากรจาก 4 จุดสำคัญของประเทศสเปนและสหราชอาณาจักรซึ่งเป็นชาวคอเคเซียน แม้จะมี genetic background ที่แตกต่างกัน แต่ผลของความสัมพันธ์ก็อาจเป็นไปในทิศทางเดียวกันได้ ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ควรศึกษาในประชากรนั้น ๆ ไม่สามารถนำผลของประชากรอื่นมาใช้กับอีกประชากรได้ นอกจากนี้การคัดเลือกผู้ป่วยในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยเลือกเฉพาะผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของการเสื่อมของข้อเข่าอยู่ในช่วงเกรด 3 ถึง 4 คือเป็นผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีอาการรุนแรงปานกลางถึงรุนแรงมาก (Kellgren and Lawrence, 1957) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความสัมพันธ์ดังกล่าวขึ้น ส่วนการที่พบความสัมพันธ์ของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมกับ SNPs ทั้งสองตำแหน่งเฉพาะในเพศหญิงนั้นอาจมีสาเหตุมาจากโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่เกิดจากพหุปัจจัย รูปแบบการใช้ชีวิต อาชีพ อาหารที่รับประทาน รวมทั้งการออกกำลังกายที่แตกต่างกันในแต่ละประชากร อาจส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ (Haidich, 2010) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้แตกต่างไปจากการศึกษาของ Lui ที่ศึกษาในประชากรจีนอื่นเพศหญิง โดยมีกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมเพศหญิงจำนวน 98 คน และกลุ่มคนไม่เป็นโรคข้อเสื่อมจำนวน 196 คน พบว่าจีโนไทป์ GG ของ SNP ตำแหน่ง rs9340799 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 1.98, 95% CI = 1.13-4.20, $p = 0.036$) (Lui et al., 2014) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากจำนวนประชากรกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ผู้วิจัยใช้มีจำนวนน้อยเกินไป

นอกจากนี้ผลความสัมพันธ์ของการศึกษานี้ ยังแตกต่างกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ห่อภิมาณก่อนหน้านี้ โดยการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ Hu ไม่พบความสัมพันธ์ของ SNP ตำแหน่ง rs2234693 และ ตำแหน่ง rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเสื่อมในประชากรทั้งหมด แต่เมื่อศึกษาในประชากรย่อย พบว่าจีโนไทป์ TC ของ SNP ตำแหน่ง rs2234693 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อมที่ลดลงในประชากรจีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (TC Vs. CC : OR = 0.73, 95%CI = 0.54-0.99, $p = 0.498$) และจีโนไทป์ AA ของ SNP ตำแหน่ง rs9340799 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อมที่ลดลงเมื่อขนาดของประชากรน้อยกว่าหรือเท่ากับ 500 คน (AA Vs. GG : OR = 2.60, 95%CI = 1.10-6.18, $p = 0.135$) (Hu et al., 2015) การวิเคราะห์ห่อภิมาณของ Ren พบว่า SNP ตำแหน่ง rs2234693 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด แต่ SNP ตำแหน่ง rs9340799 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อมในชาวคอเคเซียน (AA Vs. AG+GG : OR = 1.17, 95%CI = 1.02-1.34, $p = 0.030$), (AG Vs. AA+GG : OR = 0.86, 95%CI = 0.75-0.99, $p = 0.040$) แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อมในชาวเอเชีย (Ren, 2015) และการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ Yazdi ไม่พบความสัมพันธ์ของ SNP ตำแหน่ง rs2234693 และ ตำแหน่ง rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด แต่ในประชากรย่อย พบว่าที่ SNP ตำแหน่ง rs2234693 จีโนไทป์ TC มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่ลดลงในชาวเอเชีย (OR = 0.75, 95%CI = 0.59-0.96, $p = 0.0222$) และ SNP ตำแหน่ง rs9340799 จีโนไทป์ GG (OR = 0.57, 95%CI = 0.41-0.80, $p = 0.001$), และแอลลีล G (OR = 0.72, 95%CI = 0.62-0.83, $p < 0.001$) มีความสัมพันธ์กับการ

เกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่ลดลงในชาวคอเคเซียน (Yazdi, 2017) โดยความแตกต่างของผลการศึกษาในครั้งนี้ก็กับการวิเคราะห์อภิมานอาจมีสาเหตุมาจากการวิเคราะห์อภิมานส่วนใหญ่ ไม่มีข้อมูลของประชากรไทยถูกรวบรวมในการวิเคราะห์ เป็นไปได้ว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจาก genetic background ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ประชากรมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันได้ นอกจากนี้การศึกษาแบบการวิเคราะห์อภิมานของ Yazdi ประชากรส่วนใหญ่มาจากเอเชีย รวมถึงข้อมูลของประชากรที่นำมาศึกษาได้มาจากการวิจัยตีพิมพ์ที่เป็นภาษาอังกฤษเท่านั้น ซึ่งทำให้ข้อมูลสำคัญจากงานวิจัยภาษาอื่นหรืองานวิจัยที่ยังไม่มีการตีพิมพ์ไม่ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ดังกล่าว ซึ่งอาจทำให้เกิดอคติกับผลการทดลองได้

SNP ตำแหน่ง rs2234693 และ rs9340799 ทั้งสองตำแหน่งอยู่บนอินทรอน 1 ของยีน *ESR1* ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบรายงานว่ามี SNPs ทั้งสองมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *ESR1* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีการกลายพันธุ์ระดับยีน (point mutation) บนอินทรอน 1 ซึ่งประกอบด้วยบริเวณที่เป็น enhancer มีผลต่อการทำงานของเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ โดยมีอิทธิพลด้านพฤติกรรมทางชีวภาพ (Eric et al., 1994) เนื่องจากบริเวณ enhancer เป็นบริเวณที่ช่วยกระตุ้นการถอดรหัส ซึ่งแสดงให้เห็นว่า SNPs ทั้งสองตำแหน่งอาจมีบทบาทต่อการแสดงออกของยีน *ESR1* ที่อาจส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ อีกการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของจีโนมโพลีบริเวณอินทรอนในยีน *ESR1* ส่งผลต่อกระบวนการถอดรหัส ซึ่งเป็นไปได้ว่า haplotypes ในยีน *ESR1* อาจเชื่อมโยงกับการทำงานของยีน *ESR1* นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณ variable-number tandem repeat (VNTR) ใน promoter มีความเป็น linkage disequilibrium กันกับ haplotypes ของยีน *ESR1* (Albagha et al., 2001; Becherini et al., 2000; Langdahl et al., 2000) และ VNTR อาจผลักดันความสัมพันธ์ที่เราพบในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจาก promoter เป็นบริเวณที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเป็นบริเวณที่ transcription factor ลงมาจับเพื่อเกิดการถอดรหัส ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ นอกจากนี้เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ชนิดแอลฟายังเป็นกุญแจสำคัญในกระบวนการถ่ายทอดสัญญาณ (Cheung et al., 2003) ซึ่งเป็นไปได้ว่าจีโนมโพลีของ *ESR1* อาจมีอิทธิพลต่อการแสดงออกในเซลล์กระดูกอ่อนผ่านกระบวนการถอดรหัส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโรคข้อเข่าเสื่อมได้ และจากหลักฐานล่าสุดในจีโนมมนุษย์ที่พบว่าความหนาแน่นของ SNPs บริเวณอนุรักษ์ของจีโนมลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในระดับที่เท่ากันทั้งในส่วนของอินทรอน และเอ็กซอน แสดงให้เห็นว่าบริเวณอินทรอนมีความสำคัญต่อการทำงานของเอ็กซอน (Davidson et al. 2009) ดังนั้น SNP ในอินทรอนอาจมีผลต่อการเกิดข้อเข่าเสื่อมได้ จากเหตุผลดังกล่าวทั้งหมด SNPs ทั้งสองตำแหน่งจึงควรได้รับการในการศึกษาในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อไป

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จีโนไทป์ CC และแอลลีล C ของ SNP ตำแหน่ง rs2234693 มีความสัมพันธ์กับความไวในการเกิดข้อเข่าเสื่อมที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบความสัมพันธ์แบบเดียวกันนี้เฉพาะในเพศหญิงเท่านั้น สำหรับ SNP ตำแหน่ง rs9340799 พบว่าทุกจีโนไทป์ และแอลลีล G มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเดียวกันนี้เฉพาะในเพศหญิงเท่านั้น ซึ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอาจแปรผันในประชากรอื่น ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถช่วยตรวจหาและป้องกันการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมในระยะเริ่มต้น และเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม เพื่อใช้คัดคะแนนและประเมินโอกาสการเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม

เอกสารอ้างอิง

- ทวีพร เตชรัตน์มณี. ความสามารถในการดูแลตนเองและการรับรู้สุขภาพของผู้สูงอายุข้อเข่าเสื่อม ในจังหวัดภูเก็ต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาการพยาบาลผู้ใหญ่ คณะพยาบาลศาสตร์มหาลัษมีหิตล, 2547.
- สมาคมเพื่อการศึกษาเรื่องความเจ็บปวด. 2559. ระบาดวิทยาของอาการปวดข้อ. *วารสารสมาคมเพื่อการศึกษาเรื่องความเจ็บปวด* : 1-3.
- สมาคมรูมาติสซั่มแห่งประเทศไทย. 2550. แนวทางเวชปฏิบัติการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม. *วารสารโรคข้อ* 68 : 83.
- สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก. 2553. โรคข้อเสื่อมอักเสบ. *ชีววิทยาของกระดูก* : 191-224.
- วัชรภรณ์ สุริยาภิญญ์. 2552. สถิติสำหรับวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : 26-103.
- Albagha, O.M., McGuigan F.E., Reid D.M., and Ralston S.H. 2001. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and bone mineral density: haplotype analysis in women from the United Kingdom. *The Journal of Bone and Mineral Research* 16 : 128–34.
- Becherini, L., et al. 2000. Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Human Molecular Genetics* 13 : 2043–2050.
- Borgonio-Cuadra, V.M., et al. 2012. Analysis of estrogen receptor alpha gene haplotype in Mexican mestizo patients with primary osteoarthritis of the knee. *Rheumatology International* 32 : 1425–1430.
- Cheung, E., Schwabish, M.A., and Kraus, W. L. 2003. Chromatin exposes intrinsic differences in the transcriptional activities of estrogen receptors α and β . *The EMBO Journal* 22 : 600–611.
- Chuang, Y.L., et al. 2008. Restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *Anticancer Research* 28 : 2001-2008.
- Dai, X., et al. 2014. Association of single nucleotide polymorphisms in estrogen receptor alpha gene with susceptibility to knee osteoarthritis : a case-control study in a Chinese Han population. *BioMed Research International* 2014 : 1-12. DOI 151457.
- Davidson, S., Starkey, A., and MacKenzie. A. 2009. Evidence of uneven selective pressure on different subsets of the conserved human genome; implications for the significance of intronic and intergenic DNA. *Bio Med Central Genomics* 10: 614-20.

- Eric, P., et al. 1994. Estrogen Resistance Caused by a Mutation in the Estrogen-Receptor Gene in a Man. *The New England Journal of Medicine* 331 : 1056-1061.
- Haq, S.A., and Davatchi, F. 2011. Osteoarthritis of the knees in the COPCORD world. *International Journal of Rheumatic Diseases* 14 : 122-129.
- Haidich, A.B. 2010. Meta-analysis in medical research. *Hippokratia* 14: 29-37.
- Hu, W., Shuang, F., Zou, H.X., and Yang, H.H. 2015. Association between estrogen receptor-alpha gene *PvuII* and *XbaI* polymorphisms and osteoarthritis risk: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 : 1956–1965.
- Ikegawa, S. 2007. New gene associations in osteoarthritis: what do they provide, and where are we going. *Current Opinion in Rheumatology* 19 : 429–434.
- Kang, S.C., Lee, D.G., Choi, J.H., Kim, S.T., Kim, Y.K., and Ahn, H.J. 2007. Association between estrogen receptor polymorphism and pain susceptibility in female temporomandibular joint osteoarthritis patients. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 5 : 391–394.
- Kellgren, J.H., and Lawrence, J.S. 1957. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 16: 494-502.
- Kuptniratsaikul, V., Tosayanonda, O., Nilganuwong, S., and Thamalikitkul, V. 2002. The epidemiology of osteoarthritis of the knee in elderly patients living an urban area of Bangkok. *Journal of Medical Association of Thailand* 2 : 154-61.
- Langdahl B.L., Lokke E., Carstens M., Stenkjaer L.L., and Eriksen E.F. 2000. A TA repeat polymorphism in the estrogen receptor gene is associated with osteoporotic fractures but polymorphisms in the first exon and intron are not. *The Journal of Bone and Mineral Research* 15 : 2222–2230.
- Lementowski, P.W. and Zelicof, S.B. 2008. Obesity and osteoarthritis. *American Journal of Orthopedics* 37 : 148-151.
- Loeser, R., et al. 2005. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products. *Arthritis Rheum* 52 : 2376-2385.
- Liu, W., Shao, F.M., Yan, L., Cao, H.X. and Qiu, D. 2014. Polymorphisms in the gene encoding estrogen receptor alpha are associated with osteoarthritis in Han Chinese women. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7 : 5772–5777.

- Lian, K., et al. 2007. Estrogen receptor alpha genotype is associated with a reduced prevalence of radiographic hip osteoarthritis in elderly Caucasian women. *Osteoarthritis Cartilage* 18 : 972-978.
- Ma, H., Wu, W., Yang, X., Liu, J., and Gong, Y. 2015. Genetic effects of common polymorphisms in estrogen receptor alpha gene on osteoarthritis: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8 : 13446–13454.
- Murphy, L., et al. 2008. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 9 : 1207-13.
- Neogi, T. and Zhang, Y. 2013. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 39 : 1-19.
- Pereira, D., Peleteiro, B., Araújo, J., Branco, J., Santos, R.A., and Ramos, E. 2011. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 19 : 1270-1285.
- Riancho, J.A., et al. 2010. Common variations in estrogen-related genes are associated with severe large-joint osteoarthritis: a multicenter genetic and functional study. *Osteoarthritis and Cartilage* 7 : 927–933.
- Ren, Y., et al. 2015. Association between polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and osteoarthritis susceptibility: a meta-analysis. *BMC Musculoskeletal Disorders* 16 : 44.
- Robinson, J.L., et al. 2017. Sex differences in the estrogen-dependent regulation of temporomandibular joint remodeling in altered loading. *Osteoarthritis and Cartilage* 4 : 533–543.
- Roman-Blas, J.A., Castaneda, S., Largo, R., and Herrero-Beaumont, G. 2009. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Research & Therapy* 11 : 241.
- Schuelert, N., Johnson, M.P., Oskins, J.L., Jassal, K., Chambers, M.G., and McDougall J.J. 2011. Local application of the endocannabinoid hydrolysis inhibitor URB597 reduces nociception in spontaneous and chemically induced models of osteoarthritis. *Pain* 152 : 975–981.
- Stemig, M., Myers, S.L., Kaimal, S. and Islam, M.S. 2015. Estrogen receptor-alpha polymorphism in patients with and without degenerative disease of the temporomandibular joint. *The Journal of Craniomandibular & Sleep Practice* 33 : 129-133.

- Spector, D. T., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J., and Hart, D. 1996. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *British Medical Journal* 312 :940-944.
- Szumilas, M., 2010. Explaining odds ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 19 : 227-229.
- Tammachote, R. 2011. The genetics behind osteoarthritis: Asian focus. *Asian Biomedicine* 5 : 23-36.
- Valdes, A.M. and Spector, T.D. 2011. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 7 : 23-32.
- Wiik, A., Ekman, M., Johansson, O., Jansson, E., and Esbjornsson, M. 2009. Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochemistry and Cell Biology* 131 : 181-189.
- Wise, B.L., et al. 2009. The relationship of estrogen receptor-alpha and -beta genes with osteoarthritis of the hand. *Journal of Rheumatology* 36 : 2772-2779.
- Yazdi, M.M., et al. 2017. Association of ESR α Gene Pvu II T>C, XbaI A>G and BtgI G>A Polymorphisms with Knee Osteoarthritis Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on 22 Case-Control Studies. *Archives of Bone and Joint Surgery* 5 : 351-362.
- Yurkow, J. and Yudin, J. 2002. Musculoskeletal problems. In Cotter V. and Strumpf N. *Advanced Practice Nursing with Older Adults*, pp. 229-242. New York : McGraw-Hill.
- Zhang, Y., et al. 2003. Lower prevalence of hand osteoarthritis among Chinese subjects in Beijing compared with white subjects in the United States : The Beijing osteoarthritis study. *Arthritis and Rheumatism* 48 : 1034-1040.
- Zhang, Y. and Jordan, M.J. 2010. Epidemiology of osteoarthritis. *Clinics Geriatric Medicine* 26 : 355-369.

ภาคผนวก

ตารางที่ 17 ข้อมูลผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ลำดับ ที่	P	เพศ	อายุ (ปี)	น้ำหนัก (กก.)	ส่วนสูง (ซม.)	ค่าดัชนี มวลกาย	จีโนไทป์ rs2234693	จีโนไทป์ rs9340799
1	1	หญิง	68	55	157	157	TT	AA
2	4	หญิง	65	60	155	155	TC	AG
3	5	ชาย	63	55	150	150	TT	AA
4	7	หญิง	74	50	153	153	TC	AG
5	8	หญิง	74	68	158	158	TT	AA
6	9	หญิง	68	46	150	150	TC	AG
7	10	หญิง	57	62	160	160	TT	AA
8	11	ชาย	82	73	170	170	TC	AG
9	12	หญิง	83	48	155	155	TT	AA
10	13	หญิง	74	62	165	165	TT	AA
11	15	หญิง	65	65	155	155	TC	AA
12	16	หญิง	58	63	155	155	TC	AA
13	17	ชาย	67	71	173	173	TT	AA
14	18	หญิง	80	65	155	155	TT	AA
15	19	ชาย	63	77	157	157	TT	AA
16	20	หญิง	71	83	156	156	TT	AA
17	21	หญิง	58	46	150	150	CC	AA
18	23	หญิง	76	65	155	155	CC	AG
19	24	หญิง	70	75	155	155	TC	AA
20	25	ชาย	80	73	170	170	TC	AA
21	26	หญิง	74	60	155	155	TT	AA
22	27	หญิง	68	55	152	152	TT	GG
23	28	หญิง	78	50	142	142	TC	AG
24	29	หญิง	80	59	155	155	TC	AG
25	30	หญิง	71	50	155	155	CC	AG
26	31	หญิง	78	65	150	150	CC	AG
27	32	หญิง	79	55	153	153	TC	AA
28	33	หญิง	51	65	179	179	TC	AG
29	34	หญิง	75	60	155	155	TC	AG
30	35	หญิง	75	80	155	155	TC	AA
31	36	หญิง	74	66	158	158	TC	AA

32	37	หญิง	79	55	154	154	TC	AA
33	38	หญิง	79	59	145	145	TT	AA
34	39	หญิง	70	50	148	148	TC	AA
35	43	หญิง	69	75	155	155	TC	AG
36	44	หญิง	60	68	158	158	CC	GG
37	46	หญิง	77	55.8	154	154	TC	AA
38	47	หญิง	77	72	153	153	TC	AA
39	48	หญิง	78	56	146	146	TC	AG
40	50	หญิง	84	50	150	150	TT	AA
41	51	หญิง	67	40	150	150	TC	AA
42	52	หญิง	82	65	155	155	TT	AA
43	53	หญิง	69	62	154	154	TC	AA
44	56	หญิง	57	63	157	157	TC	AG
45	57	หญิง	73	49.5	150	150	TT	AA
46	62	ชาย	75	80.5	157	157	TT	AA
47	63	หญิง	68	61.5	160	160	TC	AG
48	65	ชาย	84	60	152	152	CC	GG
49	67	หญิง	72	75	157	157	TC	AG
50	70	ชาย	65	90	180	180	CC	GG
51	71	หญิง	70	77	160	160	TC	AG
52	72	หญิง	65	60	165	165	TT	AA
53	73	ชาย	87	66	165	165	TT	AA
54	74	หญิง	78	65	155	155	TC	AG
55	75	หญิง	86	52.2	155	155	TT	AA
56	76	ชาย	71	59	150	150	TC	AA
57	77	หญิง	58	66	142	142	TC	AG
58	78	ชาย	67	51	160	160	TT	AA
59	79	ชาย	73	73	180	180	TT	AA
60	80	หญิง	72	65	150	150	CC	GG
61	81	หญิง	89	57.7	143.5	143.5	TC	AA
62	82	หญิง	76	52	150	150	CC	AG
63	83	หญิง	81	65	155	155	TC	AG
64	85	หญิง	76	65	149.5	149.5	TT	AA
65	87	หญิง	69	65	155	155	TC	AG

66	88	หญิง	74	65	145	145	TT	AA
67	89	ชาย	83	73	160	160	TC	AG
68	92	หญิง	75	52	148.5	148.5	TT	AA
69	93	หญิง	69	48.5	150	150	TC	AA
70	94	หญิง	59	71	155	155	TT	AA
71	96	หญิง	71	54	147	147	TT	GG
72	97	หญิง	79	39	145	145	TT	AA
73	98	หญิง	78	68	150	150	TC	AG
74	100	หญิง	84	58.6	148	148	TT	GG
75	101	ชาย	75	75	165	165	CC	GG
76	102	หญิง	59	84	153	153	TT	GG
77	103	หญิง	67	72	155	155	TC	AA
78	105	หญิง	59	50	160	160	TC	AA
79	106	ชาย	80	64	163	163	TC	AA
80	107	หญิง	75	61	150	150	CC	AG
81	108	หญิง	54	63	150	150	TC	AG
82	110	ชาย	91	50	160	160	TT	AA
83	111	หญิง	63	50	157	157	TT	AA
84	113	หญิง	82	58	155	155	TC	AA
85	114	หญิง	65	61	156	156	TC	AA
86	116	หญิง	66	52.3	148	148	TT	AA
87	117	หญิง	71	80	158	158	TT	AA
88	118	หญิง	55	66	154	154	TC	AG
89	119	หญิง	65	82	152	152	CC	AG
90	120	หญิง	71	58	142	142	TC	AA
91	121	หญิง	61	86	148	148	TT	AA
92	123	หญิง	69	59	155	155	CC	AG
93	124	หญิง	72	55	155	155	TT	AA
94	125	หญิง	67	51	149	149	CC	GG
95	126	หญิง	74	66	152	152	TC	AA
96	127	หญิง	66	59	154	154	TC	AA
97	128	หญิง	74	65	150	150	TC	AA
98	129	หญิง	51	90	155	155	TT	AA
99	131	หญิง	62	69	166	166	TT	AA

100	132	หญิง	79	45	155	155	TT	AA
101	133	หญิง	82	34	155	155	TC	AG
102	134	หญิง	62	64	157	157	TC	AG
103	135	หญิง	74	66	158	158	TT	AA
104	137	หญิง	67	50	146.5	146.5	TC	AG
105	138	หญิง	60	80	156	156	TC	AG
106	139	หญิง	85	51.3	144.5	144.5	CC	AA
107	140	หญิง	61	59	155	155	TC	AG
108	150	หญิง	73	47	150	150	TC	AG
109	156	หญิง	75	58.7	150	150	TT	AA
110	169	หญิง	66	47	150	150	CC	AG
111	171	หญิง	70	74	150	150	TT	AA
112	174	หญิง	62	66	155	155	TC	AA
113	175	หญิง	57	79	159	159	TT	AA
114	180	หญิง	76	49	148	148	TC	AG
115	183	หญิง	84	52.4	150	150	TT	AA
116	186	หญิง	79	54	146	146	TT	AA
117	187	หญิง	72	60	160	160	TT	AA
118	190	หญิง	67	58	155	155	TC	AG
119	192	ชาย	82	56	148	148	TC	AG
120	196	หญิง	66	90	158	158	TC	AG
121	197	หญิง	66	70	160	160	TC	AG
122	198	หญิง	56	67	155	155	TC	AG
123	199	หญิง	59	72	150	150	TC	AG
124	200	ชาย	69	39.5	159	159	CC	AG
125	201	หญิง	79	54	164	164	TC	AG
126	202	หญิง	90	55	149	149	TT	AA
127	203	หญิง	69	59	162	162	TC	AG
128	204	ชาย	74	67	163	163	TC	AG
129	205	หญิง	61	50	167	167	TC	AG
130	206	หญิง	66	51	150	150	TC	AA
131	207	หญิง	70	53	149	149	TT	AG
132	208	หญิง	66	65	160	160	TC	AA
133	209	หญิง	82	60	155	155	TT	AA

134	210	หญิง	86	52	152	152	TT	AA
135	211	หญิง	71	50	150	150	TC	AA
136	214	หญิง	62	44	154	154	TC	AA
137	215	หญิง	60	49	150	150	TT	AA
138	216	หญิง	63	85	162	162	TT	AA
139	217	หญิง	71	80	156	156	TC	AA
140	219	ชาย	62	83	173	173	TC	AG
141	221	ชาย	87	50	155	155	TT	AA
142	222	หญิง	77	67	155	155	TC	AG
143	223	หญิง	71	58	150	150	TC	AG
144	224	หญิง	62	58	155	155	TC	AA
145	225	หญิง	66	50	156	156	TT	AA
146	226	หญิง	75	58	160	160	CC	AG
147	227	หญิง	65	62	157	157	TC	AG
148	228	หญิง	66	55.2	167	167	TC	AG
149	229	หญิง	81	55.5	155	155	TC	AA
150	232	หญิง	65	60	142	142	TC	AG
151	233	หญิง	75	60	155	155	CC	GG
152	234	หญิง	82	58	165	165	CC	AG
153	235	หญิง	69	64	150	150	TC	AA
154	237	หญิง	67	53	146	146	TC	AA
155	238	หญิง	56	73	150	150	TC	AA
156	239	ชาย	74	56	159	159	TC	AA
157	244	ชาย	57	110	163	163	TC	AG
158	246	หญิง	82	50	150	150	TC	AG
159	247	หญิง	57	57	166	166	TC	AG
160	248	หญิง	57	52	150	150	TC	AA
161	252	ชาย	84	65	175	175	TT	AA
162	253	หญิง	76	62	154	154	TT	AA
163	254	หญิง	54	55	161	161	TC	AG
164	255	ชาย	59	67	175	175	TC	AA
165	257	ชาย	67	60	170	170	TC	AG
166	259	ชาย	50	55	165	165	TC	AA
167	260	หญิง	76	52	150	150	TC	AG

168	261	ชาย	67	80	172	172	TC	AA
169	262	หญิง	83	58	148	148	TC	GG
170	268	ชาย	67	94	172	172	CC	AG
171	269	หญิง	71	59	146	146	TC	GG
172	270	หญิง	62	67	154	154	TC	GG
173	271	หญิง	62	54	150	150	TC	AA

ตารางที่ 18 ข้อมูลกลุ่มควบคุม

ลำดับ ที่	P	เพศ	อายุ (ปี)	น้ำหนัก (กก.)	ส่วนสูง (ซม.)	ค่าดัชนี มวลกาย	จีโนไทป์ rs2234693	จีโนไทป์ rs9340799
1	1	หญิง	54	57.9	156	23.8	TT	GG
2	2	หญิง	54	57.2	152	24.8	TC	AG
3	3	หญิง	53	52.5	150	23.3	TC	AG
4	4	หญิง	54	58	156	23.8	CC	GG
5	5	หญิง	53	64	156	26.3	TC	AA
6	6	หญิง	53	60.5	159	23.9	TC	AA
7	7	หญิง	52	61	163	23.0	CC	AA
8	14	หญิง	51	53	152	22.9	TC	AG
9	15	หญิง	54	71	156	29.2	TC	AA
10	18	หญิง	53	70.8	154	29.9	TC	GG
11	19	หญิง	52	56.3	162	21.5	TC	AG
12	21	หญิง	52	72	148	32.9	TC	GG
13	22	หญิง	52	74.6	162	28.4	CC	AG
14	23	หญิง	52	55	160	21.5	CC	GG
15	24	หญิง	52	60.5	160	23.6	TC	AG
16	25	หญิง	54	59.9	155	24.9	TC	GG
17	26	หญิง	53	75	155	31.2	TC	GG
18	29	หญิง	54	58.9	154	24.8	TC	AG
19	30	หญิง	54	46.9	149	21.1	TC	GG
20	33	หญิง	52	57	148	26.0	CC	AA
21	34	หญิง	53	58.5	154	24.7	TC	AG
22	38	หญิง	54	55.4	156	22.8	TC	AG
23	40	หญิง	50	67.5	169	23.6	CC	AG
24	42	หญิง	54	64.7	160	25.3	TT	AG
25	43	หญิง	53	53	153	22.6	CC	AA
26	44	หญิง	54	56.6	155	23.6	TT	GG
27	45	หญิง	53	54	160	21.1	CC	AA
28	47	หญิง	54	54.8	155	22.8	CC	AG
29	48	หญิง	54	84.9	153	36.3	TT	GG
30	49	หญิง	52	63.5	153	27.1	TC	AG
31	50	หญิง	52	60	158	24.0	TT	GG

32	51	หญิง	53	72	150	32.0	TC	GG
33	52	หญิง	53	67	149	30.2	TC	AG
34	53	หญิง	53	63.2	152	27.4	TC	AG
35	54	หญิง	54	50.9	150	22.6	TC	AG
36	55	หญิง	54	76	157	30.8	TC	GG
37	56	หญิง	54	53	154	22.3	TC	AG
38	57	หญิง	54	57.3	157	23.2	TT	AG
39	59	หญิง	54	63	155	26.2	CC	AG
40	60	หญิง	54	53.2	162	20.3	TC	AG
41	61	หญิง	53	84.5	156	34.7	TC	AG
42	62	หญิง	53	59.2	156	24.3	TC	AG
43	63	หญิง	54	55	151	24.1	CC	AG
44	64	หญิง	53	57	160	22.3	TC	GG
45	65	หญิง	52	84.2	163	31.7	CC	AA
46	66	หญิง	53	60.2	163	22.7	TC	AG
47	67	หญิง	52	60	150	26.7	TT	AG
48	69	หญิง	53	56.4	155	23.5	TC	AG
49	70	หญิง	53	52.9	157	21.5	TT	AG
50	71	หญิง	52	78	161	30.1	TT	AG
51	72	หญิง	52	64.4	151	28.2	CC	GG
52	73	หญิง	52	78	153	33.3	TC	AG
53	74	หญิง	52	47	149	21.2	TC	AG
54	75	หญิง	51	55	153	23.5	TT	AG
55	77	หญิง	52	48.4	149	21.8	TT	AG
56	78	หญิง	53	56.8	157	23.0	CC	AG
57	79	หญิง	51	67.4	165	24.8	CC	AG
58	80	หญิง	52	43.9	164	16.3	TC	AG
59	81	หญิง	51	73.6	162	28.0	CC	AG
60	82	หญิง	52	57.3	152	24.8	TC	AG
61	83	หญิง	51	66	162	25.1	TT	GG
62	84	หญิง	51	64.4	158	25.8	TC	GG
63	85	หญิง	51	57	158	22.8	TC	AA
64	87	หญิง	51	67	158	26.8	CC	AG
65	88	หญิง	51	58	148	26.5	TC	AG

66	90	หญิง	51	52	154	21.9	CC	AA
67	91	หญิง	51	57	152	24.7	CC	AG
68	93	หญิง	55	58.7	155	24.4	TT	AG
69	94	หญิง	55	68	149	30.6	TC	AG
70	98	หญิง	56	53	154	22.3	TC	AA
71	187	ชาย	58	70.9	162	27.0	TT	AG
72	188	ชาย	58	67.5	159	26.7	TC	AG
73	189	หญิง	59	50	148	22.8	TT	AG
74	193	หญิง	59	51	155	21.2	TC	AG
75	195	หญิง	59	99	152	42.8	TC	AG
76	201	หญิง	58	59.7	160	23.3	CC	AA
77	202	หญิง	59	62	156	25.5	TT	AA
78	203	หญิง	58	52.2	155	21.7	CC	GG
79	204	หญิง	58	87.4	156	35.9	TT	AG
80	205	หญิง	59	72	155	30.0	CC	AG
81	206	หญิง	59	68.3	150	30.4	CC	AA
82	207	หญิง	59	60.4	155	25.1	TC	AG
83	213	ชาย	59	48.7	169	17.1	CC	AG
84	214	ชาย	57	68	161	26.2	TC	AA
85	215	ชาย	59	51.5	156	21.2	TC	AA
86	216	ชาย	57	55	163	20.7	TC	GG
87	217	ชาย	59	68	168	24.1	TC	AG
88	218	หญิง	59	50	157	20.3	CC	GG
89	219	หญิง	59	75.5	150	33.6	TC	AA
90	220	ชาย	56	67	165	24.6	TC	AA
91	221	ชาย	56	79.4	168	28.1	CC	AA
92	222	ชาย	56	97	167	34.8	CC	AA
93	223	ชาย	56	79	166	28.7	TT	AG
94	224	ชาย	56	70.8	161	27.3	TT	AG
95	225	ชาย	56	61	160	23.8	TC	AA
96	226	ชาย	56	126	180	38.9	CC	AA
97	228	ชาย	55	88.8	175	29.0	TC	AA
98	230	ชาย	55	61.7	158	24.7	TC	AA
99	231	ชาย	55	81	168	28.7	TC	AA

100	232	ชาย	55	66	161	25.5	TT	AG
101	234	ชาย	54	64	164	23.8	TC	AG
102	235	ชาย	54	70.6	164	26.2	TT	AG
103	239	ชาย	56	58.9	158	23.6	TC	AA
104	240	ชาย	56	75	165	27.5	CC	AG
105	244	หญิง	59	58.4	161	22.5	TC	AA
106	245	หญิง	59	58.3	147	27.0	CC	AG
107	246	หญิง	60	52.1	149	23.5	TT	AG
108	247	หญิง	59	55	150	24.4	TC	AG
109	257	หญิง	60	70.6	151	31.0	TC	AG
110	261	ชาย	53	64	164	23.8	CC	AA
111	266	ชาย	53	67.2	171	23.0	CC	GG
112	268	ชาย	53	62.3	157	25.3	TC	GG
113	AU002	หญิง	58	62	155	25.8	CC	AG
114	AU004	หญิง	55	65	155	27.1	TC	AA
115	AU012	หญิง	60	60	153	25.6	TC	GG
116	AU013	ชาย	50	85	170	29.4	TC	GG
117	AU015	หญิง	67	70	158	28.0	CC	AA
118	AU018	หญิง	70	64	160	25.0	TC	AG
119	AU022	หญิง	70	49	155	20.4	CC	AG
120	AU023	หญิง	59	49	160	19.1	TT	AG
121	AU029	หญิง	73	51	148	23.3	TC	AG
122	AU035	ชาย	74	80	165	29.4	TT	AG
123	AU036	หญิง	64	54	152	23.4	CC	AG
124	AU037	ชาย	72	75	167	26.9	TC	AG
125	AU039	หญิง	74	49	158	19.6	TC	AA
126	AU042	หญิง	50	53	163	19.9	CC	AA
127	AU043	หญิง	66	76	157	30.8	TC	GG
128	AU045	ชาย	63	85	164	31.6	TT	AA
129	AU048	หญิง	71	65	160	25.4	TC	AG
130	AU049	หญิง	52	81	155	33.7	TC	AG
131	AU050	หญิง	62	58	155	24.1	TT	AG
132	AU051	หญิง	70	60	158	24.0	TC	AG
133	AU052	หญิง	79	74	160	28.9	TT	AG

134	AU055	ชาย	50	81	165	29.8	CC	AG
135	AU061	หญิง	53	64	153	27.3	TT	AG
136	AU073	หญิง	60	54	164	20.1	TC	AG
137	AU076	หญิง	51	60	157	24.3	TC	GG
138	AU078	หญิง	56	50	162	19.1	TC	GG
139	AU080	ชาย	59	79	172	26.7	TC	GG
140	AU085	ชาย	65	80	165	29.4	CC	AG
141	AU091	ชาย	63	78	161	30.1	TC	AA
142	AU092	หญิง	69	76	156	31.2	TC	GG
143	AU098	หญิง	78	48	155	20.0	CC	GG
144	AU099	หญิง	84	54	148	24.7	TC	GG
145	AU100	หญิง	73	50	154	21.1	TC	AG
146	AU101	หญิง	76	45	160	17.6	CC	AA
147	AU103	หญิง	52	49	155	20.4	CC	AA
148	AU104	หญิง	67	58	163	21.8	CC	GG
149	AU105	หญิง	85	51	148	23.3	TC	GG
150	AU106	หญิง	63	60	159	23.7	TC	GG
151	AU108	หญิง	67	52	160	20.3	TC	AG
152	AU109	หญิง	74	50	153	21.4	TT	AG
153	AU110	ชาย	59	81	171	27.7	TT	AA
154	AU111	ชาย	73	76	162	29.0	TC	AG