

ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานร่วมกับการแสดงออกของยีน CALM1 กับโรคข้อเข่าเสื่อม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS TOGETHER WITH EXPRESSION OF THE  
CALM1 GENE AND KNEE OSTEOARTHRITIS



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

Department of Botany

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณร่วมกับการแสดงออกของยีน CALM1 กับโรคข้อเข่าเสื่อม
โดย	นายศุภวุฒิ เหล่าชัยเจริญผล
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรัสวดี อัครรัตน์)	

ศุภวุฒิ เหล่าชัยเจริญผล : ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานร่วมกับการแสดงออกของยีน *CALM1* กับโรคข้อเข่าเสื่อม. ( ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS TOGETHER WITH EXPRESSION OF THE *CALM1* GENE AND KNEE OSTEOARTHRITIS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคเกี่ยวกับกระดูกที่พบได้มากในกลุ่มผู้สูงอายุ โดยผิวของข้อถูกทำลาย และมีปุ่มกระดูกงอก โรคข้อเข่าเสื่อมสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ อายุ เพศ น้ำหนักและพันธุกรรม โดยปัจจัยพันธุกรรมเป็นบทบาทสำคัญในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม งานวิจัยนี้ จึงศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่อาจใช้ทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษายีน *CALM1* ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสลายกระดูกอ่อนและการส่งสัญญาณของแคลเซียม โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากประชากรไทยที่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อมจำนวน 170 คน และประชากรไทยที่ไม่ได้เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม จำนวน 150 คน ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด ศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีน *CALM1* ด้วยวิธี high-resolution melting (HRM) analysis และวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย odds ratio ผลการทดลองพบความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัณฐานตำแหน่ง rs12885713 ในประชากรทั้งหมด และเพศหญิง พบว่า แอลลีล T (OR = 0.64, 95% CI = 0.49 – 0.87,  $P = 0.005$ ), (OR = 0.65, 95% CI = 0.45 – 0.91,  $P = 0.015$ ) ตามลำดับ และจีโนไทป์ TT (OR = 0.3, 95% CI = 0.14 – 0.63,  $P = 0.0014$ ), (OR = 0.28, 95% CI = 0.12 – 0.66,  $P = 0.003$ ) ตามลำดับ มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไม่พบความสัมพันธ์ของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมของภาวะพหุสัณฐานตำแหน่ง rs2300496 ในประชากรทั้งหมด ผลการทดลองวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่าจีโนไทป์ CC และ CT มีการแสดงออกของยีน ในกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอาจแปรผันกับจำนวนประชากร การศึกษาต่อไปในอนาคต ควรเพิ่มขนาดประชากรในการศึกษาให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

สาขาวิชา พันธุศาสตร์  
ปีการศึกษา 2564

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

# # 6072111523 : MAJOR GENETICS

KEYWORD: KNEE OSTEOARTHRITIS, THAI POPULATION, GENETIC MARKER

Supawut Loachaijareanpool : ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS TOGETHER WITH EXPRESSION OF THE *CALM1* GENE AND KNEE OSTEOARTHRITIS. Advisor: Assoc. Prof. Rachaneekorn Tammachote

Knee osteoarthritis is a common bone disease among the elderly, the surface of the joints being destroyed and a spurs. Knee osteoarthritis can be caused by a many factors, including age, sex, weight, and genetics. The genetics is a risk factor of knee osteoarthritis. In this study, we aimed to identify genetic markers that may be used to predict knee osteoarthritis The *CALM1* gene, which is associated with cartilage breakdown and calcium signaling. Blood samples were collected from 170 Thai patients with knee osteoarthritis and 150 Thai normal controls without knee osteoarthritis. DNA was extracted from blood samples. Three polymorphisms on the *CALM1* gene were studied by high-resolution melting (HRM) analysis and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), then were statistical analysis by Odds ratio. The results showed that the rs12885713 that allele T (OR = 0.64, 95% CI = 0.49 – 0.87,  $P = 0.005$ ), (OR = 0.65, 95% CI = 0.45 – 0.91,  $P = 0.015$ ) and genotype TT (OR = 0.3, 95% CI = 0.14 – 0.63,  $P = 0.0014$ ), (OR = 0.28, 95% CI = 0.12 – 0.66,  $P = 0.003$ ) were significantly associated with knee OA. The rs2300496 was not significantly associated with knee OA. The results showed that the genotype CC and CT that the decrease in gene expression. The present study suggests that there might be variability in association with knee OA in the Thai populations. Further studies with larger sample size should be investigated in order to confirm the association between these genetic markers and knee OA.

Field of Study: Genetics

Student's Signature .....

Academic Year: 2021

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คอยช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ โดยมีรองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง อาจารย์ผู้เป็นกรรมการภายใน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรัสวดี อิศวรรตน์ จากภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล อาจารย์ผู้เป็นกรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นรวมทั้งกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐพล ธรรมโชติ จากภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แอนนา วงษ์กุล จากภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเพื่อการรวบรวมตัวอย่างเลือดและข้อมูลทางคลินิกของประชากรที่ใช้ศึกษาในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยในทุก ๆ เรื่องด้วยความยินดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ นิสิตทุกคนในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยทางพันธุศาสตร์มนุษย์และการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดการดำเนินงานวิจัย รวมไปถึงขอขอบคุณทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเสริมสร้างกำลังใจให้แก่ผู้วิจัย สุดท้ายนี้คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ศุภาวุฒิ เหล่าชัยเจริญผล

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร .....	4
โรคข้อเข่าเสื่อม.....	4
การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับโรคข้อเข่าเสื่อม .....	5
ยีน Calmodulin 1 (CALM1).....	6
วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) .....	7
วิธี high resolution melting (HRM) .....	8
วิธี real-time polymerase chain reaction (qPCR) .....	8
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา .....	9
อุปกรณ์ .....	9
สารเคมี.....	9

วิธีดำเนินการศึกษา.....	10
การรวบรวมเก็บข้อมูลทางด้านคลินิกและเก็บตัวอย่างเลือด .....	10
การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเลือด .....	11
การออกแบบไพรเมอร์.....	11
การระบุจีโนไทป์.....	11
ยีน <i>CALM1</i> ตำแหน่ง rs12885713 .....	11
ยีน <i>CALM1</i> ตำแหน่ง rs2300496 .....	12
ยีน <i>CALM1</i> ตำแหน่ง rs3814843 .....	12
การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน.....	13
การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	13
การวิเคราะห์อภิมาน .....	14
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	15
การรวบรวมตัวอย่าง .....	15
การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเลือด .....	15
การออกแบบไพรเมอร์.....	16
การระบุจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละตำแหน่ง .....	17
rs12885713.....	17
rs2300496 .....	17
rs3814843 .....	18
การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	19
การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน .....	26
การวิเคราะห์อภิมาน.....	27
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา.....	30
บรรณานุกรม.....	32



ภาคผนวก..... 35

ประวัติผู้เขียน..... 64



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับโรคข้อเสื่อม.....	6
ตารางที่ 2 ข้อมูลทางคลินิกของประชากร .....	15
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการระบุจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรม .....	16
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบสมดุของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก .....	19
ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของ rs12885713 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด.....	20
ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ของ rs12885713 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในเพศหญิง.....	21
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของ rs12885713 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย.....	22
ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ของ rs2300496 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด.....	23
ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ของ rs2300496 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในเพศหญิง.....	24
ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ของ rs2300496 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย.....	25
ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ของยีน <i>CALM1</i> ในแต่ละภาวะพหุสัณฐานกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ....	28
ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs12885713.....	29
ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs2300496.....	29
ตารางที่ 14 เทคนิคการระบุจีโนไทป์ .....	30
ตารางที่ 15 ข้อมูลจีโนไทป์ของ rs12885713 ในกลุ่มควบคุม .....	44
ตารางที่ 16 ข้อมูลจีโนไทป์ของ rs12885713 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม.....	48
ตารางที่ 17 ข้อมูลจีโนไทป์ของ rs2300496 ในกลุ่มควบคุม .....	53
ตารางที่ 18 ข้อมูลจีโนไทป์ของ rs2300496 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม.....	56
ตารางที่ 19 ข้อมูลการแสดงออกของยีน <i>CALM1</i> ตำแหน่ง rs12885713.....	60
ตารางที่ 20 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ rs12885713 .....	61

ตารางที่ 21 ข้อมูลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ rs2300496.....	62
ตารางที่ 22 ข้อมูลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ rs3814843.....	63



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ภาพถ่ายรังสีของข้อเข่าที่ระดับความรุนแรงเกรด 0 ถึงเกรด 4 .....	4
รูปที่ 2 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของโปรตีน CaM.....	7
รูปที่ 3 ยีน <i>CALM1</i> และตำแหน่งของภาวะพหุสัญญาณ.....	7
รูปที่ 4 รูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) ของ rs12885713 .....	17
รูปที่ 5 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs2300496 จากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	17
รูปที่ 6 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ PCR-RFLP ตำแหน่ง rs2300496.....	18
รูปที่ 7 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs3814843 จากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	18
รูปที่ 8 ผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ PCR-RFLP ตำแหน่ง rs3814843.....	18
รูปที่ 9 การแสดงออกของยีน <i>CALM1</i> ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจีโนไทป์ต่างๆ ตำแหน่ง rs12885713 .....	26
รูปที่ 10 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C1 – C15 .....	35
รูปที่ 11 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C16 - C35.....	35
รูปที่ 12 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C36 – C55.....	35
รูปที่ 13 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C56 – C75.....	36
รูปที่ 14 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C76 – C95.....	36
รูปที่ 15 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C96 – C115.....	36
รูปที่ 16 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C116 – C130.....	36
รูปที่ 17 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C131 – C146.....	37
รูปที่ 18 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C147 – C150.....	37
รูปที่ 19 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P1 - P21.....	37
รูปที่ 20 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P22 – P41 .....	37

รูปที่ 21 ภาพเจสของ rs2300496 ของตัวอย่าง P42 – P62 .....	38
รูปที่ 22 ภาพเจสของ rs2300496 ของตัวอย่าง P63 – P83 .....	38
รูปที่ 23 ภาพเจสของ rs2300496 ของตัวอย่าง P84 – P99 .....	38
รูปที่ 24 ภาพเจสของ rs2300496 ของตัวอย่าง P100 – P114 .....	38
รูปที่ 25 ภาพเจสของ rs2300496 ของตัวอย่าง P115 – P130 .....	39
รูปที่ 26 ภาพเจสของ rs2300496 ของตัวอย่าง P131 – P143 .....	39
รูปที่ 27 ภาพเจสของ rs2300496 ของตัวอย่าง P144 – P157 .....	39
รูปที่ 28 ภาพเจสของ rs2300496 ของตัวอย่าง P158 – P170 .....	40
รูปที่ 29 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง P1 – P20.....	40
รูปที่ 30 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง P21 – P40 .....	40
รูปที่ 31 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง P61 – P80 .....	40
รูปที่ 32 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง P81 – P96 .....	40
รูปที่ 33 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง P97 – P116 .....	41
รูปที่ 34 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง P117 – P136.....	41
รูปที่ 35 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง P137 – P150.....	41
รูปที่ 36 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง P151 – P160.....	41
รูปที่ 37 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง P161 – P170.....	41
รูปที่ 38 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง C1 – C20 .....	42
รูปที่ 39 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง C21 – C41 .....	42
รูปที่ 40 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง C42 – C62.....	42
รูปที่ 41 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง C78 – C98.....	42
รูปที่ 42 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง C99 – C118.....	42
รูปที่ 43 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง C119 – C139.....	43
รูปที่ 44 ภาพเจสของ rs3814843 ของตัวอย่าง C140 – C150.....	43



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคข้อเข่าเสื่อม (knee osteoarthritis) เป็นโรคเกี่ยวกับกระดูกที่พบได้มากในกลุ่มผู้สูงอายุ โดยผิวของข้อถูกทำลาย และปุ่มกระดูกงอก (osteophyte) ซึ่งโรคนี้สามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น อายุ พันธุกรรม (Shi et al., 2008) ความอ้วน การบาดเจ็บที่เนื้อเยื่อ และเพศ (Mishra et al., 2017) ซึ่งแต่ละปัจจัยมีความสำคัญต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีความสำคัญต่อการเกิดข้อเข่าเสื่อมเป็นอย่างมาก (Fernandez-Moreno et al., 2008) นอกจากข้อเข่า ข้อสะโพก ข้อมือ และกระดูกสันหลังก็สามารถเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมได้เช่นกัน (Spector and MacGregor, 2004) ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อมสามารถทำได้จากการวิเคราะห์ระยะของพื้นที่ระหว่างข้อเข่าและการปรากฏของปุ่มกระดูกงอก จากภาพถ่ายรังสีของข้อเข่า (Sinusas, 2012) การวินิจฉัยจากภาพถ่ายรังสี สามารถแบ่งความรุนแรงของการเสื่อมของข้อเข่าออกได้เป็น 5 เกรด นับจาก 0 ถึง 4 เรียงลำดับตามความรุนแรงจากน้อยไปมาก โดยเกรด 0 คือ ไม่มีการเสื่อมของข้อเข่า ในขณะที่เกรด 4 คือ มีการเสื่อมของข้อเข่ารุนแรงมากที่สุด (Kellgren and Lawrence, 1957) ด้วยเหตุที่ข้อเข่าเสื่อมมีปัจจัยเสี่ยงหลายสาเหตุ จึงทำให้นักวิจัยพยายามศึกษาปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม เพื่อให้การวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อมให้มีความไวและจำเพาะมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยพิจารณาจากภาวะพหุสัญญาณของยีนบางชนิด ร่วมกับข้อมูลทางคลินิก (Mishra et al., 2017)

โรคข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคทางพันธุกรรมที่ซับซ้อน ซึ่งไม่เป็นไปตามการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบเมนเดล และอาจเกี่ยวข้องข้องกับการถ่ายทอดแบบมัลติเปิลยีน (Fernandez-Moreno et al., 2008) ความรุนแรงของโรค ได้รับอิทธิพลจากหลายยีน โดยอิทธิพลของยีนที่ส่งผลต่อโรคข้อเข่าเสื่อมอยู่ระหว่างร้อยละ 35 ถึง 65 (Fernandez-Moreno et al., 2008)

ยีน *CALM1* ถูกถอดรหัสได้เป็น calmodulin เป็นโปรตีนที่พบได้ในเซลล์หลายชนิด ทำหน้าที่จับกับแคลเซียม ซึ่งส่งผลต่อการส่งสัญญาณของแคลเซียม (Carafoli, 1987) calmodulin มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสลายกระดูกอ่อน (Valhmu and Raia, 2002) จากการศึกษาพบว่าการแสดงของยีน *CALM1* ในกระดูกอ่อนข้อต่อในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมและกระดูกอ่อนข้อต่อของคนปกติในสภาพเพาะเลี้ยง และการศึกษา microarray พบว่าการแสดงออกของยีน *CALM1* ในกระดูกสะโพกและเข่าจากผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมสูงกว่าในกระดูกอ่อนจากคนปกติ (Mototani et al., 2005)

นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับยีน *CALM1* ในโรคข้อเข่าเสื่อม เช่น มีการศึกษาภาวะพหุสัญญาณตำแหน่ง rs12885713 (ในบริเวณโพรโมเตอร์) rs2300496 (ในเอ็กซอน 1) rs2300500 (ในอินทรอน 1) rs3213718 (ในอินทรอน 3) และ rs3814843 (ในเอ็กซอน 6) และศึกษาการแสดงออกของยีน *CALM1* ในชาวอินเดียประกอบไปด้วยกลุ่มควบคุม 500 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 500 ราย โดยใช้วิธี PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) พบว่าภาวะพหุสัญญาณตำแหน่ง rs12885713 และตำแหน่ง rs3814843 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.038 และ odds ratio (OR) เท่ากับ 1.28 และ p-value

เท่ากับ 0.011 และOR เท่ากับ 2.10 ตามลำดับ และยืนยันมีการแสดงออกลดลงในเลือดของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม (Mishra et al., 2017) ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานเดียวที่มีการรายงานเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนนี้ในโรคข้อเสื่อม ส่วนการศึกษาภาวะพหุสัณฐานในชนชาติต่าง ๆ นั้น ให้ผลที่ยังขัดแย้งกัน เช่น การศึกษาในชาวญี่ปุ่นซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มควบคุม 375 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อสะโพกเสื่อม 334 ราย ด้วยวิธี *TaqMan SNP Genotyping* พบว่าภาวะพหุสัณฐานในยีน *CALM1* มีความสัมพันธ์ในการเกิดโรคข้อสะโพกเสื่อม โดยตำแหน่ง rs12885713 มีค่า p-value เท่ากับ 0.00036 และ OR เท่ากับ 2.56 และตำแหน่ง rs2300496 มีค่า p-value เท่ากับ 0.00061 และOR เท่ากับ 2.44 ส่วน rs2300500 มีค่า p-value เท่ากับ 0.00040 และ OR เท่ากับ 2.51 ตำแหน่ง rs3213718 มีค่า p-value เท่ากับ 0.00065 และOR เท่ากับ 2.40 และตำแหน่ง rs3179089 มีค่า p-value เท่ากับ 0.00018 และ OR เท่ากับ 2.76 (Mototani et al., 2005) การศึกษาในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชาวกรีกประกอบไปด้วยกลุ่มควบคุม 186 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 154 ราย โดยใช้วิธี PCR-Amplification Refractory Mutation System (PCR-ARMS) ที่ตำแหน่ง rs12885713 ไม่พบความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.581 และ OR เท่ากับ 1.12 (Poulou et al., 2008) สอดคล้องกับผลการศึกษาในสหราชอาณาจักรและจีน โดยการศึกษาในสหราชอาณาจักรประกอบไปด้วยกลุ่มควบคุม 752 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 920 ราย ด้วยวิธี PCR-RFLP ที่ตำแหน่ง rs12885713 ก็ไม่พบความสัมพันธ์กับโรคข้อเข่าเสื่อมเช่นกัน โดยมีค่า p-value เท่ากับ 0.84 และ OR เท่ากับ 1.01 (Loughlin et al., 2006) ส่วนการศึกษาของ Shi และคณะในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมชาวจีน 183 ราย และกลุ่มควบคุม 210 ราย ที่ตำแหน่ง rs12885713 ด้วยวิธี PCR-RFLP มีค่า p-value เท่ากับ 0.802 และ OR เท่ากับ 1.02 (Shi et al., 2008)

ในปัจจุบัน การศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศไทยมีอยู่ไม่มาก และยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *CALM1* กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศไทย ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัณฐานและการแสดงออกในยีน *CALM1* rs12885713 rs2300496 และrs3814843 ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศไทย โดยงานวิจัยนี้เป็นวิจัยย่อยในโครงการวิจัยที่ตรวจสอบพันธุกรรมของโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศไทย ซึ่งผู้วิจัยคาดหวังว่าการวิเคราะห์ภาวะพหุสัณฐานและการแสดงออกของยีน *CALM1* จะสร้างองค์ความรู้ที่อาจสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพในการตรวจคัดกรองหรือทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ต่อไป



### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณร่วมกับการแสดงออกของยีนโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณร่วมกับการแสดงออกของยีน CALM1 กับโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย



## บทที่ 2

### ตรวจสอบเอกสาร

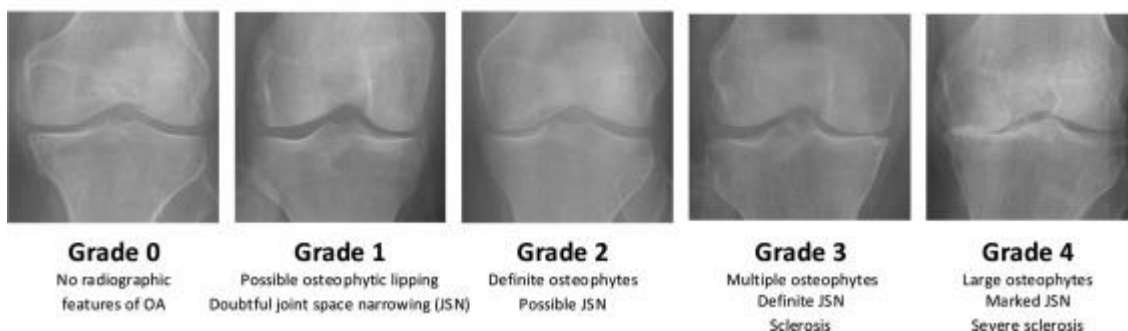
#### โรคข้อเข่าเสื่อม

ข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่ข้อต่อของเข่าเสื่อมสภาพ (Sinusas, 2012) เป็นโรคที่สามารถพบได้ทั่วไปในประชากรผู้สูงอายุ โรคนี้มีลักษณะการเสื่อมของพื้นผิวกระดูกอ่อนข้อต่อ โดยเกิดจากบาดแผล หรือรอยแยก ที่ทำให้พื้นผิวกระดูกอ่อนข้อต่อเป็นหลุมหรือสึกกร่อน และความเสียหายของกระดูกอ่อน ส่งผลให้มีการลดลงของ proteoglycan ทำให้กระดูกอ่อนไม่มีความแข็งแรง และกระดูกอ่อนที่ได้รับความเสียหาย จะมีการปลดปล่อยเอนไซม์ทำให้เกิดการสูญเสียกระดูกอ่อนอย่างต่อเนื่อง รวมไปถึงการเกิดเยื่อหุ้มข้อเข่าหนาขึ้น และเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อไขข้อได้ เมื่อกระดูกอ่อนบางลงจนถึงกระดูกที่อยู่ใต้กระดูกอ่อน (subchondral bone) จะเกิดสร้างเนื้อกระดูกมากเกินปกติ (subchondral bone sclerosis) ทำให้เกิดปุ่มงอก (osteophyte) ขึ้นที่ขอบของกระดูกแข็ง และระยะห่างระหว่างข้อเข่าจะลดน้อยลง (Martin, 1994) หากมีการรับน้ำหนักมากเกินไป ข้อเข่าที่ผิดปกติจะเกิดความเสียหายอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้กระดูกอ่อนเสียหายขั้นรุนแรง และสามารถนำไปสู่ความเจ็บปวด หรือเกิดเสียงในข้อเมื่อผู้ป่วยเคลื่อนไหว (crepitus) ไปจนถึงการสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนไหว และอาจส่งผลให้พิการได้ (Brandt et al., 2008)

ในปัจจุบันการวินิจฉัยข้อเข่าเสื่อมทำได้จากการพิจารณาระยะของพื้นที่ระหว่างข้อเข่าและการปรากฏของปุ่มงอกของกระดูกจากภาพถ่ายรังสีของข้อเข่า (Sinusas, 2012) จากการวินิจฉัยภาพถ่ายรังสี ทำให้สามารถแบ่งความรุนแรงของการเสื่อมของข้อเข่าออกได้เป็น 5 เกรด นับจาก 0 ถึง 4 เรียงลำดับตามความรุนแรงจากน้อยไปมาก (รูปที่ 1) โดยเกรด 0 คือ ไม่มีการเสื่อมของข้อเข่า ในขณะที่ เกรด 4 คือ มีการเสื่อมของข้อเข่ารุนแรงมากที่สุด (Kellgren and Lawrence, 1957)

#### จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### Kellgren and Lawrence (KL) Grading System



รูปที่ 1 ภาพถ่ายรังสีของข้อเข่าที่ระดับความรุนแรงเกรด 0 ถึงเกรด 4

(Kellgren and Lawrence, 1957)

การวินิจฉัยข้อเข่าเสื่อมด้วยวิธีภาพถ่ายรังสีของข้อเข่านี้เป็นวิธีที่มีความไวต่ำ ไม่สามารถตรวจพบการเสื่อมของข้อเข่าตั้งแต่ระยะแรกเริ่มได้ (Stachowiak et al., 2016) และข้อเข่าเสื่อมยังเป็นโรคที่มีความแปรผันสูง กล่าวคือ ผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมบางรายไม่มีการสูญเสียการทำงานของข้อเข่าสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้หลายปี ในขณะที่ผู้ป่วยบางรายไม่กี่ปีหลังได้รับการวินิจฉัย ต้องได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่า (Blanco et al., 2015) ด้วยเหตุนี้ โรคข้อเข่าเสื่อมจึงเป็นโรคที่ไม่สามารถทำการรักษาผู้ป่วยในระยะแรกเริ่มได้

โรคข้อเข่าเสื่อม มีสาเหตุการเกิดโรคได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ อายุ ซึ่งโรคข้อเข่าเสื่อม พบได้มากในประชากร เมื่อประชากรมีอายุเพิ่มมากขึ้น จะมีโอกาสการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมสูงขึ้น (Fransen et al., 2011) จากการสำรวจในประชากรสหรัฐอเมริกา พบว่า เกือบครึ่งหนึ่งของประชากรผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นผู้ที่มีอายุอยู่ในช่วง 45 ถึง 64 ปี และมีแค่ 1 ใน 8 ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีอายุน้อยกว่า 45 ปี (Deshpande et al., 2016) และจากการสำรวจในประชากรผู้สูงอายุของไทย มีความชุกของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมร้อยละ 34.5 ถึง 45.6 (Kuptniratsaikul et al., 2002) อายุที่สูงมากขึ้นก็สามารถส่งผลให้การทำงานของข้อเข่าแย่ลง และเพิ่มอัตราการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Blagojevic et al., 2010) อีกทั้งอายุยังสัมพันธ์กับระดับการเสื่อมที่เพิ่มมากขึ้นของข้อเข่าอีกด้วย (Pereira et al., 2017) อีกปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมคือ พันธุกรรม จากการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมพบว่าปัจจัยทางพันธุกรรมมีผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ประมาณร้อยละ 40 ถึง 60 (Gardiner et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของภูมิหลังพันธุกรรม (genetic background) ในแต่ละเชื้อชาติ สามารถส่งผลต่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ นอกจากนี้ปัจจัยที่กล่าวไปข้างต้นแล้ว ปัจจัยของเพศ การเป็นโรคอ้วน และการบาดเจ็บที่ข้อเข่า สามารถส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้เช่นกัน (Haidich, 2010)

### การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับโรคข้อเข่าเสื่อม

โรคข้อเข่าเสื่อม เป็นโรคที่มีความซับซ้อน เนื่องจากไม่เป็นตามรูปแบบการถ่ายทอดพันธุกรรมของเมนเดล ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดแบบมัลติเปิลยีน ความรุนแรงของโรค ได้รับอิทธิพลจากหลายยีน โดยอิทธิพลของยีนที่ส่งผลต่อโรคข้อเข่าเสื่อมอยู่ระหว่าง 35% ถึง 65 % จากการศึกษาวิจัยพบว่ายีนหลายตัวมีความเกี่ยวข้องกับโรคข้อเข่าเสื่อม (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** ข้อมูลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับโรคข้อเสื่อม

Gene	Phenotypic Manifestation
<i>COL11A1</i>	Reduction in osteoarthritis in female hips
<i>COMP</i> (Cartilage oligomeric matrix protein gene)	Early apparition of hip osteoarthritis
<i>IL-1</i> (Interleukin 1)	Knee and hip osteoarthritis
<i>CALM1</i> (Calmodulin)	Knee and hip osteoarthritis
<i>CLIP</i> (Cartilage intermediate protein)	Knee osteoarthritis in males
<i>TNA</i> (Tetranectin)	Knee osteoarthritis
<i>BMP2</i> (bone morphogenic protein 2)	Reduction in osteoarthritis in female knees
<i>ASP</i> (Asporin)	Knee and hip osteoarthritis

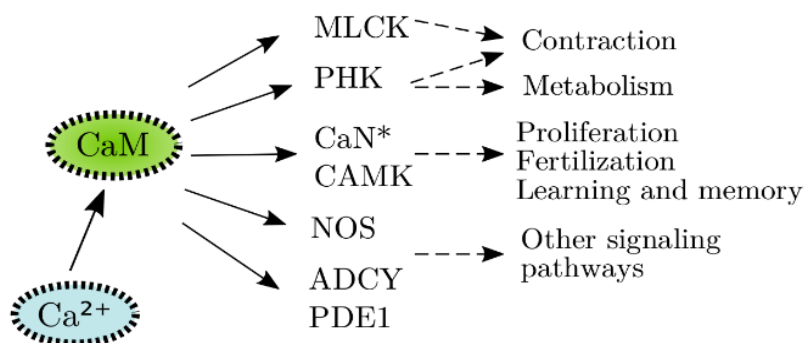
จากการศึกษาพบว่า chondrocyte มีบทบาทสำคัญในการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อน ซึ่งการแสดงออกของยีนของผู้ป่วย จะตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมทั้งภายนอกและภายใน หลังจากวิเคราะห์ 10000 EST (expressed sequence tags) พบว่ามีโปรตีน PCPE-2 และ GalNAC transferase มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของกระดูกอ่อน (Fernandez-Moreno et al., 2008)

#### **ยีน Calmodulin 1 (*CALM1*)**

ยีน Calmodulin 1 (*CALM1*) อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 14q32.11 มีทั้งหมด 6 exon ทำหน้าที่ผลิตโปรตีน CaM ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มโปรตีน Zn-dependent metzincin

โดยหน้าที่โปรตีน CaM จะเกี่ยวข้องกับ  $Ca^{2+}$  โดยจะกระตุ้นโปรตีน CaM ทำให้ the myosin light chain kinase IV (MLCK) ซึ่งจะส่งผลเกิดการหดตัวของ phosphorylase kinase (PHK) เกิดการเผาผลาญพลังงาน calcineurin (CaN),  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CAMK), nitric oxide synthase 1 (NOS), adenylyate cyclase 1 (ADCY) and phosphodiesterase 1A (PDE1) ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวน และ เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ (Westerlund and Delemotte, 2018)

### CaM role in Ca<sup>2+</sup>-signaling pathway



### รูปที่ 2 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของโปรตีน CaM

จากการศึกษาของ Valdes และคณะ พบว่ายีน *CALM1* ทำหน้าที่ผลิตโปรตีน CaM ซึ่งเกี่ยวข้องกับการส่งทอดสัญญาณที่ส่งผลกับกระดูกอ่อนผิวข้อโดยเกี่ยวข้องกับโปรตีน aggrecan โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะขึ้นกับ การส่งสัญญาณของ calmodulin (Valdes et al., 2007)

โดยทำการศึกษาทั้งหมด 3 ภาวะพหุสัณฐาน ได้แก่ rs12885713 อยู่บริเวณ promoter ของยีน *CALM1* rs2300496 อยู่บริเวณ intron 1 และ rs3814843 อยู่บริเวณ exon 6



### รูปที่ 3 ยีน *CALM1* และตำแหน่งของภาวะพหุสัณฐาน

วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

วิธี PCR-RFLP มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งจดจำของ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ มีขั้นตอนเริ่มจากการทำพีซีอาร์เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการศึกษา ก่อน แล้วจึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แอลลีลที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะถูกตัด ในขณะที่แอลลีลที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน ไม่สามารถจดจำด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ จะไม่ถูกตัด เมื่อแยกขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะได้แถบที่มีขนาดต่างกัน โดยเทคนิค PCR-RFLP ใช้ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ในการระบุจีโนไทป์ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ถูก และมีผลความเที่ยงตรงที่ต่ำ

### วิธี high resolution melting (HRM)

HRM เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหามิวเทชันและพอลิมอร์ฟิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำได้รวดเร็ว โดยอาศัยการตรวจสอบ melting temperature ของดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันก็จะมี melting temperature ที่แตกต่างกันด้วย สำหรับการทำให้ HRM จะใช้สารฟลูออเรสเซนต์ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอสายคู่ สารนี้จะเรืองแสงเมื่อจับกับดีเอ็นเอเท่านั้น เมื่อดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันที่ melting temperature ระดับแสงฟลูออเรสเซนต์ก็จะลดลง ทำให้เครื่องตรวจจับการเปลี่ยนแปลงของระดับฟลูออเรสเซนต์ได้ จึงสามารถระบุจีโนไทป์ของดีเอ็นเอได้ โดยเทคนิค HRM ใช้ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ในการระบุจีโนไทป์ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่แพง และมีผลความเที่ยงตรงที่สูง

### วิธี real-time polymerase chain reaction (qPCR)

Real-time PCR หรือ quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะและสามารถติดตามวัดปริมาณการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุก ๆ รอบของการเพิ่มจำนวนในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (real-time detection) เทคนิคนี้ทำได้โดยอาศัยการตรวจวัดสัญญาณเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมา ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาในแต่ละรอบ

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา

##### อุปกรณ์

- ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด P2 (0.2-2  $\mu$ l), P20 (2-20  $\mu$ l), P100 (10-100  $\mu$ l), P200 (20-200  $\mu$ l) และ P1000 (100-1000  $\mu$ l) (Gilson, France)
- ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip) ขนาด 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l และ 1000  $\mu$ l (ExtraGene Inc., Taiwan)
- หลอด microcentrifuge ขนาด 0.2 ml และ 1.5 ml (ExtraGene Inc., Taiwan)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง MIKRO 120 MICROLITER CENTRIFUGE (Hettich Lab Technology, USA)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Heat block ALB64 (FINEPCR, Korea)
- Submerge-Mini Gel Electrophoresis System WSE-1710 (ATTO, Japan)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ GenePro Thermal cycler (Bioer Technology, China)
- เต้าอบไมโครเวฟ (SHARP, Thailand)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C

##### สารเคมี

- AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)
- RNA/DNA Extraction Kit (Norgen Biotek, Korea)
- Green PCR Master Mix Direct-Load, 2x (Biotechrabbit, Germany)
- SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Taq DNA Polymerase Recombinant, 5 U/ $\mu$ l (Apsalagen, Thailand)
- cDNA synthesis (Apsalagen, Thailand)
- 10X reaction buffer (Apsalagen, Thailand)
- 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Apsalagen, Thailand)
- 10 mM dNTP Mix, PCR Grade (Invitrogen, USA)
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* (New England BioLabs, USA)
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApeKI* (New England BioLabs, USA)
- 10X CutSmart® buffer (New England BioLabs, USA)

- Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen, Thailand)
- Agarose Vetec™ reagent grade (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris (Bio Basic Inc., Canada)
- Boric acid (Bio Basic Inc., Canada)
- EDTA, disodium salt, dihydrate (Bio Basic Inc., Canada)
- 100 bp DNA Ladder OneMARK 100 (GeneDireX, Taiwan)
- 6X loading dye (Biotechrabbit, Germany)
- RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000X) (iNtRON Biotechnology, USA)

### วิธีดำเนินการศึกษา

#### การรวบรวมเก็บข้อมูลทางด้านคลินิกและเก็บตัวอย่างเลือด

ได้รับอนุมัติจากการรับรองพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 (คณะแพทยศาสตร์) เลขที่ MTU-EC-OT-4-193/60 ในการศึกษาประกอบด้วยอาสาสมัคร 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม กลุ่มละอย่างน้อย 150 ราย ในการศึกษา ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม หมายถึง ผู้ป่วยที่เป็นประชากรไทย อายุ 50 ปีขึ้นไป คัดเลือกเฉพาะผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของการเสื่อมของข้อเข่าอยู่ในช่วงเกรด 3 ถึง 4 ตามเกณฑ์ของ Kellgren และ Lawrence (1957) ซึ่งพิจารณาจากการตรวจทางรังสีวิทยาโดยแพทย์เฉพาะทาง เพื่อให้ได้ฟีโนไทป์ที่แสดงความเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมแบบรุนแรง กลุ่มควบคุม หมายถึง อาสาสมัครที่เป็นประชากรไทยอายุ 50 ปีขึ้นไป ที่ได้รับการซักประวัติ สอบถามอาการ และการตรวจทางรังสีวิทยาโดยแพทย์เฉพาะทาง เพื่อสรุปว่า อาสาสมัครไม่ได้เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม และไม่มีประวัติอุบัติเหตุ หรือทำกิจกรรม/เล่นกีฬาที่ทำให้เข่าเสื่อม โดยอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ไม่ถูกคัดเข้าในการศึกษา

รวบรวมข้อมูลทางคลินิก ได้แก่ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง การเสื่อมของข้อเข่า และการปรากฏของการเสื่อมที่ข้อต่ออื่น และรวบรวมตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 3 มิลลิลิตร โดยพยาบาลวิชาชีพของแผนกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ



### การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea) และสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อจากบริเวณข้อเข่า โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป RNA/DNA Extraction Kit (Norgen Biotek, Korea) โดยเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C และเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -80°C

วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร  $\times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{dilution factor}$  และคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่างอาร์เอ็นเอจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร  $\times 40 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{dilution factor}$  สำหรับการศึกษาขั้นต่อไป และคำนวณความบริสุทธิ์ของตัวอย่างดีเอ็นเอจากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร

### การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 (Untergasser et al., 2012) โดยออกแบบให้เหมาะสมกับพหุสัญญาณทั้ง 3 ตำแหน่ง และออกไพรเมอร์สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

### การระบุจีโนไทป์

#### ยีน *CALM1* ตำแหน่ง rs12885713

ระบุจีโนไทป์ด้วยวิธี HRM โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, USA) 10  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{M}$  primer ปริมาณ 0.7  $\mu\text{l}$  ทั้ง forward และ reverse primer, ดีเอ็นเอ 100 ng และปรับให้ได้ปริมาตรเป็น 20  $\mu\text{l}$  ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen, Thailand) ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 57°C เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 40 รอบ โดยกำหนดให้บันทึกการเรืองแสงในขั้น annealing หลังจากรอบการทำ denaturation และ annealing ครบ 40 รอบ ขั้นตอนต่อไปคือ การเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 98°C เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย 65°C เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนสุดท้ายคือการสร้าง melt curve ที่อุณหภูมิ 65 ถึง 90°C โดยเพิ่มอุณหภูมิทีละ 2°C แต่ละอุณหภูมิใช้เวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจึงใช้โปรแกรม Precision Melt Analysis™ software (Bio-Rad Laboratories, USA) ในการวิเคราะห์ melt profile และจัดกลุ่มตัวอย่างตามความแตกต่างกันของนิวคลีโอไทด์

### ยีน *CALM1* ตำแหน่ง rs2300496

ระบุจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยในปฏิกิริยา ประกอบด้วย 10X reaction buffer ปริมาณ 2  $\mu$ l, 50 mM  $MgCl_2$  ปริมาณ 0.8  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix ปริมาณ 0.4  $\mu$ l, 10  $\mu$ M primer ปริมาณ 0.4  $\mu$ l ทั้ง forward และ reverse primer, ดีเอ็นเอ 100 ng, *Taq* DNA Polymerase Recombinant, 5 U/ $\mu$ l (Apsalagen, Thailand) ปริมาณ 0.2  $\mu$ l และปรับให้ได้ปริมาตรเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen, Thailand) ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ ประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 55°C เป็นเวลา 15 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 40 วินาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% (w/v) ในการตรวจสอบนี้ใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5  $\mu$ l เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 100 bp DNA ladder และแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หลังจากตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้ว นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เหลือมาบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 15  $\mu$ l, 10X CutSmart® buffer ปริมาณ 2  $\mu$ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* และ *PvuII* (New England BioLabs, USA) ชนิดละ 4 U และปรับให้ได้ปริมาตรเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen, Thailand) จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5% (w/v) และแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที

### ยีน *CALM1* ตำแหน่ง rs3814843

ระบุจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-RFLP และ ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธี เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกับยีน *CALM1* ตำแหน่ง rs2300496 จากนั้นบ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApeKI* โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 15  $\mu$ l, 10X CutSmart® buffer ปริมาณ 2  $\mu$ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApeKI* และ *PvuII* (New England BioLabs, USA) ชนิดละ 4 U และปรับให้ได้ปริมาตรเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen, Thailand) จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยา ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่นเดียวกับยีน *CALM1* ตำแหน่ง rs2300496

### การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยสัคตีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป RNA/DNA Extraction Kit (Norgen Biotek, Korea) โดยเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นซีดีเอ็นเอด้วย cDNA synthesis (Apsalagen, Thailand) โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย ประกอบด้วย SCRIPT RT buffer 4  $\mu$ l, dNTP mix 1  $\mu$ l, DTT stock solution 1  $\mu$ l, RNase inhibitor 0.5  $\mu$ l, SCRIPT Reverse transcriptase 0.5  $\mu$ l, อาร์เอ็นเอ 100 ng และปรับให้ได้ปริมาตรเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen, Thailand) โดยใช้ไพรเมอร์ 5' GCGGCGGAGGGATACG 3' 5' TACGAGTAACGGCACGGC 3' ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 57°C เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 40 รอบ โดยกำหนดให้บันทึกการเรืองแสงในขั้น annealing หลังจากรอบการทำ denaturation และ annealing ครบ 40 รอบ ขั้นตอนต่อไปนำไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้  $\Delta\Delta CT$

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิกของประชากรด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2013 (USA) โดยใช้การทดสอบไคสแควร์ ( $\chi^2$  test) 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/hardy-weinberg.html>) (Rodriguez et al., 2009)

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

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย  $\Delta\Delta CT = \Delta CT$  ยีน *CALM1* -  $\Delta CT$  GAPDH และคำนวณการแสดงออกของยีนด้วย  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ถ้าค่าออกมาน้อยกว่าหนึ่งแสดงว่ามีการแสดงออกของยีนน้อยในทางกลับกันถ้ามากกว่าหนึ่งแสดงว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น

### การวิเคราะห์อภิธาน

ค้นหาฐานข้อมูลออนไลน์ที่มีความเกี่ยวข้องกับงานวิจัยโดยใช้คำสำคัญในการค้นหาคือ SNP, osteoarthritis และ CALM1 ได้ 38 งานวิจัย จากฐานข้อมูล PubMed 13 งานวิจัย จากฐานข้อมูล EMBASE 6 งานวิจัย และ จากฐานข้อมูล ISI Web of Science 19 งานวิจัย หลังจากนั้นนำมาคัดงานวิจัยที่ซ้ำออก 14 งานวิจัย และนำมาคัดจากหัวข้อเรื่อง และ บทคัดย่อ ที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อเสื่อม ภาวะพหุสัญญาณ ทำการศึกษาในมนุษย์ และ งานวิจัยที่ให้ข้อมูลไม่เพียงพอ 19 งานวิจัย เหลืองานวิจัย 5 งานวิจัยที่จะถูกนำมาวิเคราะห์ข้อมูล



## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

#### การรวบรวมตัวอย่าง

การศึกษานี้ได้รับอนุมัติ จากคณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 (คณะแพทยศาสตร์) โดยมีรหัสโครงการวิจัยคือ MTU-EC-OT-4-193/60 อาสาสมัครทั้งหมดของการศึกษานี้ มีจำนวนรวมทั้งสิ้น 320 ราย ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 170 ราย และกลุ่มควบคุม 150 ราย ข้อมูลสัดส่วนระหว่างเพศหญิงต่อเพศชาย อายุเฉลี่ย น้ำหนักเฉลี่ย ส่วนสูงเฉลี่ย และค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม แสดงดังตารางที่ 2 สัดส่วนระหว่างเพศหญิงต่อเพศชายในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และในกลุ่มควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับกับน้ำหนักเฉลี่ยและค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ยของทั้งสองกลุ่มที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ อายุเฉลี่ยและส่วนสูงเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### ตารางที่ 2 ข้อมูลทางคลินิกของประชากร

ข้อมูลทางคลินิก	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=170	กลุ่มควบคุม n=150	P-value*
เพศหญิง/เพศชาย	137/33	123/27	0.748
อายุ (ปี)	62.5±5.2	54.7±3.3	<0.001*
น้ำหนัก (กก.)	61.4±11.8	62.1±11.4	0.591
ส่วนสูง (ซม.)	154.9±7.1	157.3±6.1	0.0014
ค่าดัชนีมวลกาย (กก./ม <sup>2</sup> )	25.9±5.1	25.4±4.4	0.499

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### การสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง 0.0000725 – 0.49 และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง -0.007 – 0.27 โดยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.18 – 654.93 ng/μl และมีค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง -197.70 – 66.08

### การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์สำหรับการระบุจีโนไทป์ของ rs12885713 rs2300496 และ rs3814843 ออกแบบตามความเหมาะสมของวิธีการระบุจีโนไทป์ของแต่ละตำแหน่ง โดยใน rs2300496 ไม่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม จึงทำการออกแบบไพรเมอร์โดยทำการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ ทำให้มีบริเวณที่ถูกจดจำด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม

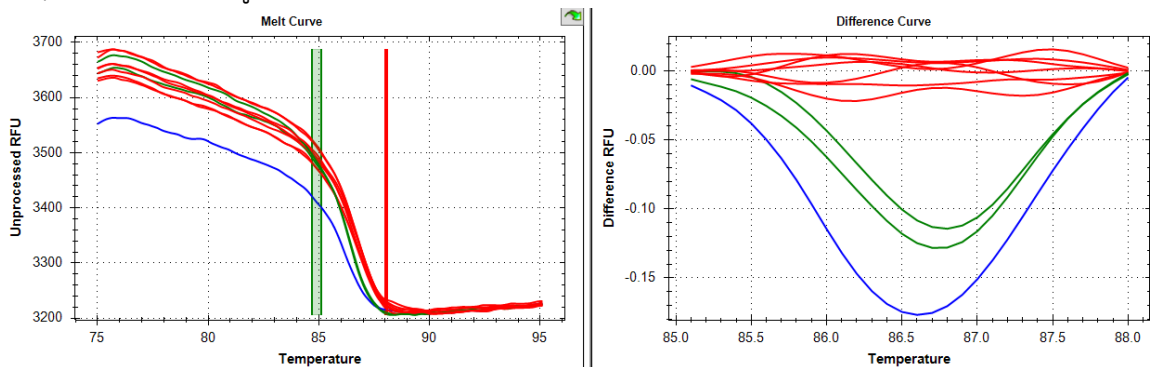
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการระบุจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรม

เครื่องหมายพันธุกรรม	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์		melting temperature (T <sub>m</sub> )	ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์
rs12885713	forward primer	5' GCGGCGGAGGGATACG 3'	59.6°C	101 bp
	reverse primer	5' TACGAGTAACGGCACGGC 3'	59.8°C	
rs2300496	forward primer	5' ATTGCCAGATGCGACTGTGCGCCTCGCTGGGTGTGTTTTCCACGG 3'	-	329 bp
	reverse primer	5' GTAACGCCAAGGCAACATCT 3'	60.1°C	
rs3814843	forward primer	5' CCAGGAACCCTATCTCACCA 3'	59.9°C	441 bp
	reverse primer	5' AATGAAGGCTGGAGATGTGC 3'	60.2°C	

## การระบุจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละตำแหน่ง

rs12885713

ผลที่ได้จากการทำ HRM ทำให้ระบุความแตกต่างของแต่ละจีโนไทป์ได้จากรูปแบบ melt curve ที่แตกต่างกันในแต่ละจีโนไทป์ รูปแบบ melt curve ได้จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Precision Melt Analysis™ software จากรูปที่ 4 เส้นกราฟแต่ละสี เป็นรูปแบบของแต่ละจีโนไทป์ โดย สีน้ำเงิน คือ TT สีแดง คือ CT และสีเขียว คือ CC หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธี sequencing พบว่ามีรูปแบบจีโนไทป์ตรงกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค HRM

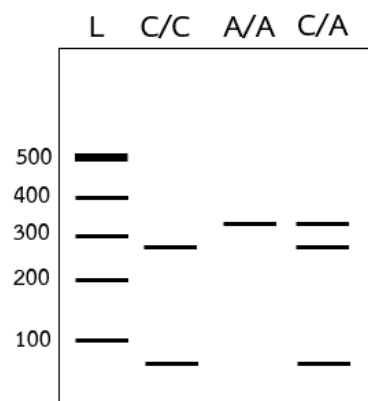


รูปที่ 4 รูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) ของ rs12885713

โดย สีน้ำเงิน คือ จีโนไทป์ TT สีแดง คือ จีโนไทป์ CT และสีเขียว คือ จีโนไทป์ CC

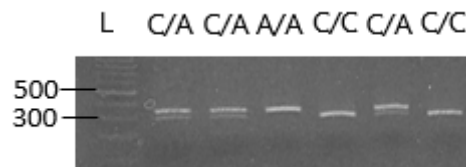
rs2300496

จากการทำพีซีอาร์และเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 329 bp ตามที่คาดหวังตามการออกแบบไพรเมอร์ และหลังจากการบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยเอนไซม์ *HaeIII* สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตำแหน่ง rs2300496 แอลลีล C ได้เป็นดีเอ็นเอขนาด 45 bp และ 284 bp เมื่อตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ได้รูปแบบจีโนไทป์ดังรูปที่ 5 และหลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธี sequencing พบว่ามีรูปแบบจีโนไทป์ตรงกับการตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส



รูปที่ 5 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs2300496 จากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

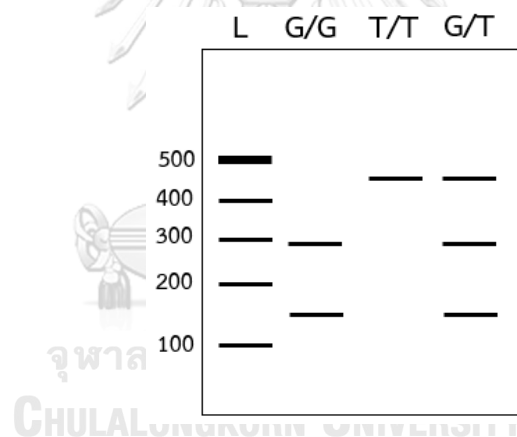
ผลการทำการทดลองจริง ให้ผลดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ผลเจลอิลีกโทรพอรีซิสของ PCR-RFLP ตำแหน่ง rs2300496

rs3814843

จากการทำพีซีอาร์และเจลอิลีกโทรพอรีซิส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 441 bp ถูกตัดตามการออกแบบไพรเมอร์ และหลังจากการบ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ApeKI* กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยเอนไซม์ *ApeKI* สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตำแหน่ง rs3814843 แอลลีล G ได้เป็นดีเอ็นเอขนาด 143 bp และ 298 bp เมื่อตรวจสอบด้วยเจลอิลีกโทรพอรีซิส ทำให้ได้รูปแบบจีโนไทป์ ดังรูปที่ 7 หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธี sequencing พบว่ามีรูปแบบจีโนไทป์ตรงกับการตรวจสอบด้วยเจลอิลีกโทรพอรีซิส



รูปที่ 7 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs3814843 จากเจลอิลีกโทรพอรีซิส

ผลการทำการทดลองจริง ให้ผลดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ผลเจลอิลีกโทรพอรีซิสของ PCR-RFLP ตำแหน่ง rs3814843



### การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการทดสอบสมมติฐานของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าการกระจายของจีโนไทป์ของ rs12885713 มีการกระจายอยู่ในสมมติฐานของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ส่วนจีโนไทป์ของ rs2300496 เบี่ยงเบนไปจากสมมติฐานของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4** ผลการทดสอบสมมติฐานของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

	Common homozygotes	Heterozygotes	Rare Homozygotes	Chi-squared	P-value*
<b>rs12885713</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>		
ประชากรทั้งหมด	83	185	52	8.94	0.003*
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	51	102	17	10.62	0.001*
กลุ่มควบคุม	32	83	35	1.72	0.18
<b>rs2300496</b>	<b>CC</b>	<b>CA</b>	<b>AA</b>		
ประชากรทั้งหมด	163	63	13	4.05	0.044*
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	92	32	5	1.04	0.31
กลุ่มควบคุม	71	31	8	2.86	0.09
<b>rs3814843</b>	<b>TT</b>	<b>GT</b>	<b>GG</b>		
ประชากรทั้งหมด	-	-	-	-	-
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	-	-	-	-	-
กลุ่มควบคุม	-	-	-	-	-

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ถูกวิเคราะห์ตาม genetic model ได้แก่ allele model (A vs. B) additive model (AA vs. BB และ AB vs. BB) dominant model (AA+AB vs. BB) และ recessive model (AA vs. AB+BB)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs12885713 ในประชากรทั้งหมด และเพศหญิง (ตารางที่ 5,6) พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมนี้กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่า ทั้งอัลลีล T (OR = 0.6405, 95% CI = 0.49 – 0.87,  $P = 0.0054$ ), (OR = 0.6486, 95% CI = 0.45 – 0.91,  $P = 0.0146$ ) ตามลำดับ และจีโนไทป์ TT (OR = 0.3048, 95% CI = 0.14 – 0.63,  $P = 0.0014$ ), (OR = 0.2807, 95% CI = 0.12 – 0.66,  $P = 0.0034$ ) ตามลำดับ มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด และเพศหญิง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของ rs12885713 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=170	กลุ่มควบคุม n=150	OR (95% CI)	P-value*
allele model	T	136	153	0.6405 (0.49 – 0.87)	0.0054*
	C <sup>a</sup>	204	147		
additive model	TT	17	35	0.3048 (0.14 – 0.63)	0.0014*
	CC <sup>a</sup>	51	32		
additive model	CT	102	83	0.7711 (0.45 – 1.31)	0.3350
	CC <sup>a</sup>	51	32		
dominant model	CT+TT	119	118	0.6328 (0.37 – 1.05)	0.078
	CC <sup>a</sup>	51	32		
recessive model	TT	17	35	0.3651 (0.19 – 0.68)	0.0017*
	(CT+CC) <sup>a</sup>	153	115		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ของ rs12885713 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในเพศหญิง

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=137	กลุ่มควบคุม n=123	OR (95% CI)	P-value*
allele model	T	111	126	0.6486 (0.45 – 0.91)	0.0146*
	C <sup>a</sup>	163	120		
additive model	TT	12	27	0.2807 (0.12 – 0.66)	0.0034*
	CC <sup>a</sup>	38	24		
additive model	CT	87	72	0.7632 (0.41 – 1.38)	0.3764
	CC <sup>a</sup>	38	24		
dominant model	CT+TT	99	99	0.6316 (0.35 – 1.13)	0.1218
	CC <sup>a</sup>	38	24		
recessive model	TT	12	27	0.3413	0.0039*
	(CT+CC) <sup>a</sup>	125	96	(0.16 – 0.71)	

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของ rs12885713 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม	OR (95% CI)	P- value*
		n=33	n=27		
allele model	T	35	27	1.1290 (0.55 – 2.32)	0.7411
	C <sup>a</sup>	31	27	1.25 (0.32 – 4.82)	
additive model	TT	10	8	1.3636 (0.39 – 4.77)	0.6271
	CC <sup>a</sup>	8	8	1.3158 (0.42 – 4.14)	
additive model	CT	15	11	1.0326 (0.34 – 3.13)	0.9548
	CC <sup>a</sup>	8	8		
dominant model	CT+TT	25	19		
	CC <sup>a</sup>	8	8		
recessive model	TT	10	8		
	(CT+CC) <sup>a</sup>	23	19		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs2300496 ในประชากรทั้งหมด และเพศหญิง (ตารางที่ 8,9) ไม่พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมนี้กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ของ rs2300496 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=129	กลุ่มควบคุม n=110	OR (95% CI)	P-value*
allele model	C	216	173	1.3972 (0.88 – 2.22)	0.1557
	A <sup>a</sup>	42	47		
additive model	CC	92	71	2.0732 (0.65 – 6.61)	0.2178
	AA <sup>a</sup>	5	8		
additive model	CA	32	31	1.6516 (0.49 – 5.6)	0.4208
	AA <sup>a</sup>	5	8		
dominant model	CA+CC	124	102	1.9451 (0.62 – 6.13)	0.2559
	AA <sup>a</sup>	5	8		
recessive model	CC	92	71	1.3658 (0.79 – 2.36)	0.2632
	(CA+AA) <sup>a</sup>	37	39		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ของ rs2300496 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในเพศหญิง

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม	OR	P-value*
		n=104	n=92	(95% CI)	
allele model	C	176	147	1.3844 (0.82 – 2.33)	0.2215
	A <sup>a</sup>	32	37		
additive model	CC	76	61	1.8689 (0.5 – 6.92)	0.3492
	AA <sup>a</sup>	4	6		
additive model	CA	24	25	1.44 (0.36 – 5.74)	0.6055
	AA <sup>a</sup>	4	6		
dominant model	CA+CC	100	86	1.7442 (0.48 – 6.38)	0.4008
	AA <sup>a</sup>	4	6		
recessive model	CC	76	61	1.3794 (0.75 – 2.54)	0.3030
	(CA+AA) <sup>a</sup>	28	31		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์ของ rs2300496 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=25	กลุ่มควบคุม n=18	OR (95% CI)	P-value*
allele model	C	40	26	1.5385 (0.56 – 4.21)	0.4013
	A <sup>a</sup>	10	10		
additive model	CC	16	10	3.2 (0.26 – 40.06)	0.367
	AA <sup>a</sup>	1	2		
additive model	CA	8	6	2.6667 (0.19 – 36.76)	0.4637
	AA <sup>a</sup>	1	2		
dominant model	CA+CC	24	16	3 (0.25 – 35.91)	0.3857
	AA <sup>a</sup>	1	2		
recessive model	CC	16	10	1.4222 (0.41 – 4.9)	0.5769
	(CA+AA) <sup>a</sup>	9	8		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์จีโนไทป์ของ rs3814843 พบว่ามีปัญหาในวิเคราะห์จีโนไทป์ เนื่องจากไม่สามารถระบุจีโนไทป์ของตัวอย่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมได้ จึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์จีโนไทป์ของ rs3814843 ได้

### การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

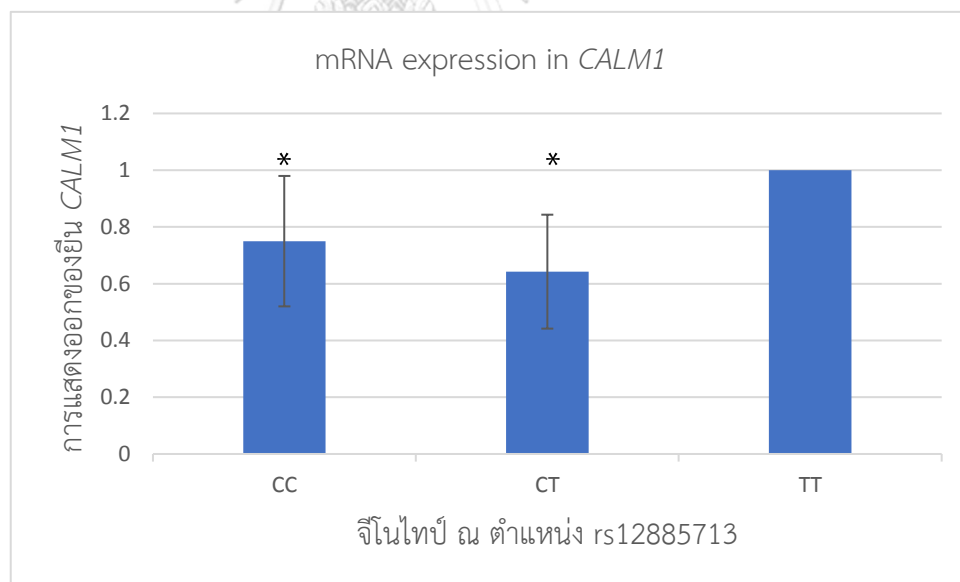
การวิเคราะห์การแสดงออกยีน *CALM1* ทำการศึกษาภาวะพหุสัณฐานตำแหน่ง rs12885713 บริเวณโปรโมเตอร์

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CALM1* ใน 30 ตัวอย่าง โดยมีจีโนไทป์ CC 19 คน จีโนไทป์ CT 3 คน และจีโนไทป์ TT 8 คน (รูปที่ 9) ด้วยสูตรคำนวณการแสดงออกของยีน

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (CALM1) - \Delta Ct(GADPH)$$

$$\text{Gene expression} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

พบว่าจีโนไทป์ CC และ CT มีการลดการแสดงออกของยีน ในกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 9 การแสดงออกของยีน *CALM1* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมจีโนไทป์ต่างๆ ตำแหน่ง rs12885713



### การวิเคราะห์ห่อภิมาณ

จากการวิเคราะห์ห่อภิมาณของยีน *CALM1* จากงานวิจัยทั้งหมด 5 งานวิจัย (ตารางที่ 11) โดยสรุปข้อมูลของจำนวนประชากรของแต่ละจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุมในแต่ละภาวะพหุสัณฐานและแสดงความสัมพันธ์ของ rs12885713 พบว่า จีโนไทป์ TT มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด และความสัมพันธ์ของ rs2300496 พบว่า จีโนไทป์ CC มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด และความสัมพันธ์ของ rs3814843 พบว่า จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด และความสัมพันธ์ของ rs3213718 พบว่า จีโนไทป์ TT มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด และความสัมพันธ์ของ rs2300500 พบว่า จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด และความสัมพันธ์ของ rs3179089 พบว่า จีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด



ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ของยีน *CALM1* ในแต่ละภาวะพหุสัณฐานกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

genetic model	แอลลีล		จีโนไทป์					ความสัมพันธ์	
	1	2	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม			กลุ่มควบคุม			
<b>rs12885713</b>	T	C	11	12	22	11	12	22	TT Ā
Mototani			46	128	160	22	154	199	
Loughlin			296	478	146	245	381	126	
Poulou			38	80	36	37	103	46	
Shi			9	57	117	8	70	132	
Mishra			158	240	102	142	233	125	
งานวิจัยนี้			17	102	51	35	83	32	
<b>rs2300496</b>	C	A							CC Ā
Mototani			46	129	159	23	155	197	
Mishra			132	221	147	113	220	167	
งานวิจัยนี้			92	32	5	71	31	8	
<b>rs3814843</b>	G	T							GG Ā
Mishra			0	56	444	0	23	477	
<b>rs3213718</b>	T	C							TT Ā
Mototani			65	163	198	79	435	492	
<b>rs2300500</b>	G	C							GG Ā
Mototani			47	128	159	23	156	196	
<b>rs3179089</b>	G	C							GG Ā
Mototani			45	131	158	20	160	195	

จากการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs12885713 จากงานวิจัยทั้งหมด 5 งานวิจัย (ตารางที่ 12) โดยสรุปข้อมูลของจำนวนประชากรของในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมนี้กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่ากลุ่มมีปัจจัยเสี่ยง (OR = 1.10, 95% CI = 0.64 – 1.25,  $P = 0.0352$ ) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 12** การวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs12885713

งานวิจัย	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม		กลุ่มควบคุม		Odds ratio (95% CI)
	มีปัจจัย	ทั้งหมด	มีปัจจัย	ทั้งหมด	
Loughlin, 2006	774	920	626	752	1.01 (0.88-1.17)
Mishra, 2017	398	500	375	500	1.06 (0.88-1.28)
Mototani, 2005	228	426	514	1006	1.05 (0.86- 1.27)
Poulou, 2008	118	154	140	186	1.02 (0.74- 1.41)
Shi, 2008	66	183	78	210	0.97 (0.66- 1.42)
งานวิจัยนี้	119	170	118	150	0.89 (0.64 – 1.25)
Total	1703	2353	1851	2804	1.10 (1.01 -1.19)

จากการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs2300496 จากงานวิจัยทั้งหมด 2 งานวิจัย (ตารางที่ 13) โดยสรุปข้อมูลของจำนวนประชากรของในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมนี้กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่ากลุ่มมีปัจจัยเสี่ยง (OR = 1.09, 95% CI = 0.94 – 1.25,  $P = 0.2434$ ) ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ 13** การวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs2300496

งานวิจัย	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม		กลุ่มควบคุม		Odds ratio (95% CI)
	มีปัจจัย	ทั้งหมด	มีปัจจัย	ทั้งหมด	
Mishra, 2017	353	500	333	500	1.06 (0.87 – 1.29)
Mototani, 2005	175	334	178	375	1.1 (0.86 – 1.42)
งานวิจัยนี้	124	129	102	110	1.04 (0.72 – 1.49)
Total	652	963	613	985	1.09 (0.94 – 1.25)

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการศึกษา

ในการศึกษานี้ ใช้วิธีการระบุจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรมถูกทำด้วยวิธี HRM หรือวิธี PCR-RFLP ซึ่งวิธี HRM ถูกทำการระบุจีโนไทป์มาจากการทำ real-time PCR ทำให้สามารถระบุจีโนไทป์ได้อย่างรวดเร็ว เหมาะสมกับการศึกษาประชากรที่มีขนาดใหญ่ แต่วิธีนี้จำเป็นต้องใช้โปรแกรมเฉพาะสำหรับการวิเคราะห์ melt profile ในขณะที่วิธี PCR-RFLP เป็นวิธีการที่ไม่จำเป็นต้องใช้โปรแกรมเฉพาะใด ๆ ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ แต่ข้อเสียของวิธีการนี้ คือ เป็นวิธีที่ต้องลงทุนด้วยแรงและเวลาเป็นอย่างมาก จึงไม่เหมาะสมกับการศึกษาประชากรที่มีขนาดใหญ่ (ตารางที่ 14) ซึ่งอุปสรรคในการระบุจีโนไทป์ตำแหน่ง rs12885713 คือ การระบุจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-RFLP ไม่ได้ ซึ่งเกิดจากการที่บริเวณตำแหน่ง rs12885713 ไม่มีบริเวณที่เอนไซม์ตัดจำเพาะจะทำปฏิกิริยาได้ จึงต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ โดยทำการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง rs12885713 ซึ่งทำให้เอนไซม์ตัดจำเพาะทำปฏิกิริยาได้ (Mototani et al., 2005) จากนั้นทำพีซีอาร์แล้วไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จึงทำการตรวจสอบแล้วทำซ้ำ พบว่าผลออกมาไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จึงทำการใช้วิธี HRM โดยการระบุจีโนไทป์ด้วยการทำ real-time PCR ทำให้สามารถระบุจีโนไทป์ได้ อุปสรรคในการระบุจีโนไทป์ตำแหน่ง rs2300496 คือ การระบุจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-RFLP ไม่ได้ ซึ่งเกิดจากการที่บริเวณตำแหน่ง rs2300496 ไม่มีบริเวณที่เอนไซม์ตัดจำเพาะจะทำปฏิกิริยาได้ จึงต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ โดยทำการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง rs2300496 ซึ่งทำให้เอนไซม์ตัดจำเพาะทำปฏิกิริยาได้ (Mototani et al., 2005) จากนั้นทำพีซีอาร์แล้วพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จึงสามารถทำการระบุจีโนไทป์ได้

#### ตารางที่ 14 เทคนิคการระบุจีโนไทป์

	PCR-RFLP	HRM	Sequencing
ระยะเวลา	6 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
ความเที่ยงตรง	ต่ำ	กลาง	สูง
ค่าใช้จ่าย	ต่ำ	กลาง	สูง
High throughput	ไม่ใช่	ใช่	ไม่ใช่

จากการทดลองการระบุจีโนไทป์ตำแหน่ง rs3814843 พบว่ามีปัญหาในวิเคราะห์จีโนไทป์ ซึ่งไม่สามารถระบุจีโนไทป์ของตัวอย่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมได้ เนื่องจากการระบุจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-RFLP ได้ผลเจลอออกมาไม่สามารถแยกแบนได้ชัดเจนจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ได้

จากการทดสอบสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก พบว่ามีเพียงการกระจายของจีโนไทป์ของ rs2300496 ที่เบี่ยงเบนไปจากสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก ส่วน rs12885713 อยู่ในสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์กตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ จึงมีความเป็นไปได้ว่า การเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากความผิดพลาดของการระบุจีโนไทป์ในเครื่องหมายพันธุกรรมนั้น ๆ มากกว่าการที่ประชากรมีเงื่อนไขแตกต่างไปจากเงื่อนไขของสมมูล (Hosking et al., 2004) การเบี่ยงเบนออกจากสมมติฐานดี-ไวน์เบิร์ก อาจบ่งชี้เป็นนัยว่า การระบุจีโนไทป์ควรได้รับการตรวจสอบหรือทำซ้ำ ก่อนการนำข้อมูลไปทดสอบทางสถิติอื่น ๆ ต่อไป

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs12885713 เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบว่าแอลลีล T และจีโนไทป์ TT มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคที่ลดลงเฉพาะในเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่แอลลีล T มีค่า (OR = 0.6486, 95% CI = 0.45 – 0.91, P = 0.0146) และจีโนไทป์ TT มีค่า (OR = 0.2807, 95% CI = 0.12 – 0.66, P = 0.0034) โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรม rs12885713 มีความสัมพันธ์แบบเดียวกันกับประชากรทั้งหมด จากการศึกษาของ Mishra และคณะ (2017) พบว่าความสัมพันธ์ของ rs12885713 มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคที่ลดลงในประชากรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลองวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่าจีโนไทป์ CC และ CT มีการลดการแสดงออกของยีน *CALM1* ในกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mishra และคณะ (2017) พบว่ามีการลดการแสดงออกของยีน *CALM1*

จากการวิเคราะห์อภิมานจากงานวิจัยทั้งหมด 5 งานวิจัย ของยีน *CALM1* ในพหุฐานฐานแต่ละตำแหน่ง พบว่า rs12885713 มีความสัมพันธ์แบบเดียวกันกับงานวิจัยทั้ง 5 งานวิจัย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย และการศึกษาต่อไปในอนาคต ควรเพิ่มขนาดประชากรให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมประชากรไทยมากขึ้น รวมไปถึงการรวบรวมผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เริ่มเป็นโรคตั้งแต่อายุยังน้อย (early-onset case) นอกจากนี้ ควรมีการศึกษากลไกเชิงการทำงานที่เชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมกับเพศ และการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมต่อไป เพราะผลการศึกษาที่ได้ในการศึกษานี้ ยังจำเป็นต้องมีข้อมูลยืนยันที่ละเอียดและชัดเจน เนื่องจากปัจจัยการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมมีมากมายและหลากหลาย

## บรรณานุกรม

- Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A., and Jordan, K. P. (2010). Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*, 18(1), 24-33.
- Blanco, F. J., Moller, I., Romera, M., Rozadilla, A., Sanchez-Lazaro, J. A., Rodriguez, A., Galvez, J., Fores, J., Monfort, J., Ojeda, S., et al. (2015). Improved prediction of knee osteoarthritis progression by genetic polymorphisms: the Arthrotest Study. *Rheumatology (Oxford)*, 54(7), 1236-1243.
- Brandt, K. D., Dieppe, P., and Radin, E. L. (2008). Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 34(3), 531-559.
- Carafoli, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 395-433.
- Deshpande, B. R., Katz, J. N., Solomon, D. H., Yelin, E. H., Hunter, D. J., Messier, S. P., Suter, L. G., and Losina, E. (2016). Number of Persons With Symptomatic Knee Osteoarthritis in the US: Impact of Race and Ethnicity, Age, Sex, and Obesity. *Arthritis Care & Research*, 68(12), 1743-1750.
- Fernandez-Moreno, M., Rego, I., Carreira-Garcia, V., and Blanco, F. J. (2008). Genetics in osteoarthritis. *Current Genomics*, 9(8), 542-547.
- Fransen, M., Bridgett, L., March, L., Hoy, D., Penserga, E., and Brooks, P. (2011). The epidemiology of osteoarthritis in Asia. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 14(2), 113-121.
- Gardiner, B. S., Woodhouse, F. G., Besier, T. F., Grodzinsky, A. J., Lloyd, D. G., Zhang, L., and Smith, D. W. (2016). Predicting Knee Osteoarthritis. *Annals of Biomedical Engineering* 44(1), 222-233.
- Haidich, A. B. (2010). Meta-analysis in medical research. *Hippokratia*, 14(Suppl 1), 29-37.
- Hosking, L., Lumsden, S., Lewis, K., Yeo, A., McCarthy, L., Bansal, A., Riley, J., Purvis, I., and Xu, C.-F. (2004). Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *European Journal of Human Genetics*, 12(5), 395-399.
- Kellgren, J. H., and Lawrence, J. S. (1957). Radiological assessment of osteoarthrosis.

*Annals of the Rheumatic Diseases*, 16(4), 494-502.

- Kuptniratsaikul, V., Tosayanonda, O., Nilganuwong, S., andThamalikitkul, V. (2002). The epidemiology of osteoarthritis of the knee in elderly patients living an urban area of Bangkok. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 85(2), 154-161.
- Loughlin, J., Sinsheimer, J. S., Carr, A., andChapman, K. (2006). The *CALM1* core promoter polymorphism is not associated with hip osteoarthritis in a United Kingdom Caucasian population. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(3), 295-298.
- Martin, D. F. (1994). Pathomechanics of knee osteoarthritis. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 26(12), 1429-1434.
- Mishra, A., Srivastava, R. N., Awasthi, S., Parmar, D., andMishra, P. (2017). Expression of Genes and Their Polymorphism Influences the Risk of Knee Osteoarthritis. *Journal of Nucleic Acids*, 2017, 3138254.
- Mototani, H., Mabuchi, A., Saito, S., Fujioka, M., Iida, A., Takatori, Y., Kotani, A., Kubo, T., Nakamura, K., Sekine, A., et al. (2005). A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of *CALM1* is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Human Molecular Genetics*, 14(8), 1009-1017.
- Pereira, D., Severo, M., Ramos, E., Branco, J., Santos, R. A., Costa, L., Lucas, R., andBarros, H. (2017). Potential role of age, sex, body mass index and pain to identify patients with knee osteoarthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 20(2), 190-198.
- Poulou, M., Kaliakatsos, M., Tsezou, A., Kanavakis, E., Malizos, K. N., andTzetzis, M. (2008). Association of the *CALM1* core promoter polymorphism with knee osteoarthritis in patients of Greek origin. *Genetic Testing*, 12(2), 263-265.
- Rodriguez, S., Gaunt, T. R., andDay, I. N. (2009). Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*, 169(4), 505-514.
- Shi, D., Ni, H., Dai, J., Qin, J., Xu, Y., Zhu, L., Yao, C., Shao, Z., Chen, D., Xu, Z., et al. (2008). Lack of association between the *CALM1* core promoter polymorphism (-16C/T) and susceptibility to knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Biomed Central Medical Genetics*, 9, 91.
- Sinusas, K. (2012). Osteoarthritis: diagnosis and treatment. *American Family Physician*,

85(1), 49-56.

Spector, T. D., and MacGregor, A. J. (2004). Risk factors for osteoarthritis: genetics.

*Osteoarthritis Cartilage*, 12 Suppl A, S39-44.

Stachowiak, G. W., Wolski, M., Woloszynski, T., and Podsiadlo, P. (2016). Detection and prediction of osteoarthritis in knee and hand joints based on the X-ray image analysis. *Biosurface and Biotribology*, 2(4), 162-172.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., and Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115.

Valdes, A. M., Loughlin, J., Oene, M. V., Chapman, K., Surdulescu, G. L., Doherty, M., and Spector, T. D. (2007). Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*, 56(1), 137-146.

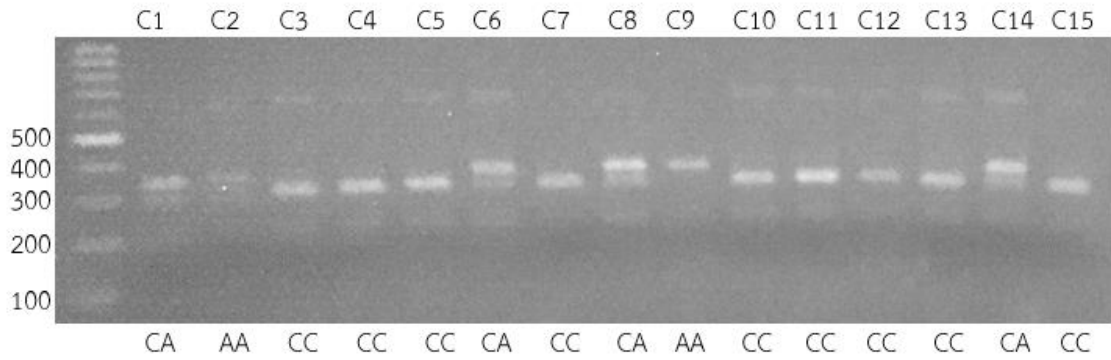
Valhmu, W. B., and Raia, F. J. (2002). myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate and Ca(2+)/calmodulin-dependent factors mediate transduction of compression-induced signals in bovine articular chondrocytes. *Biochemical Journal*, 361(Pt 3), 689-696.

Westerlund, A. M., and Delemotte, L. (2018). Effect of Ca<sup>2+</sup> on the promiscuous target-protein binding of calmodulin. *PLoS Comput Biol*, 14(4), e1006072.

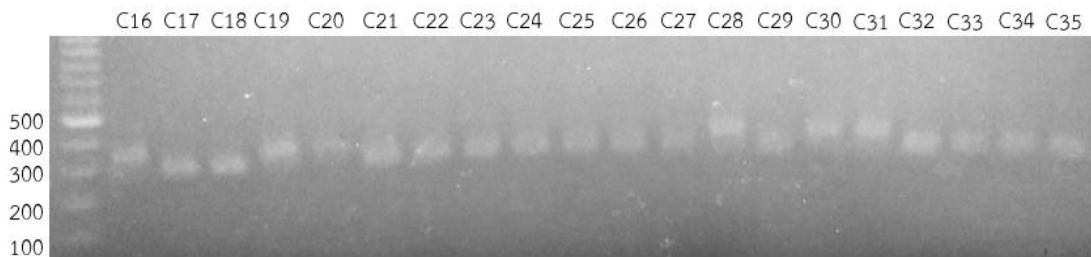


## ภาคผนวก

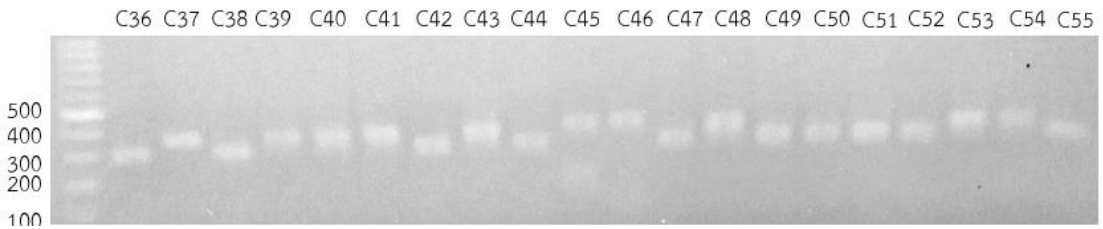
ภาพเจลของ rs2300496



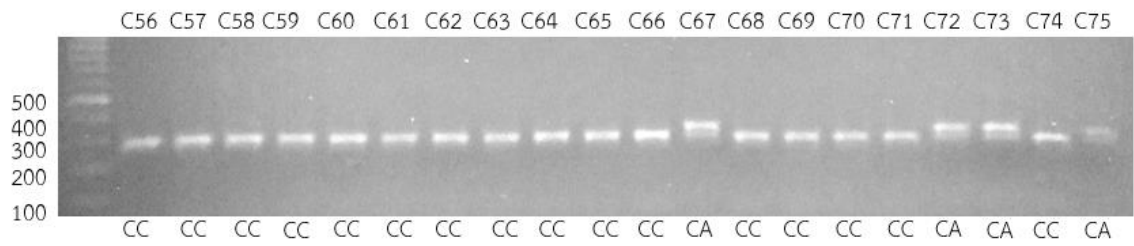
รูปที่ 10 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C1 - C15



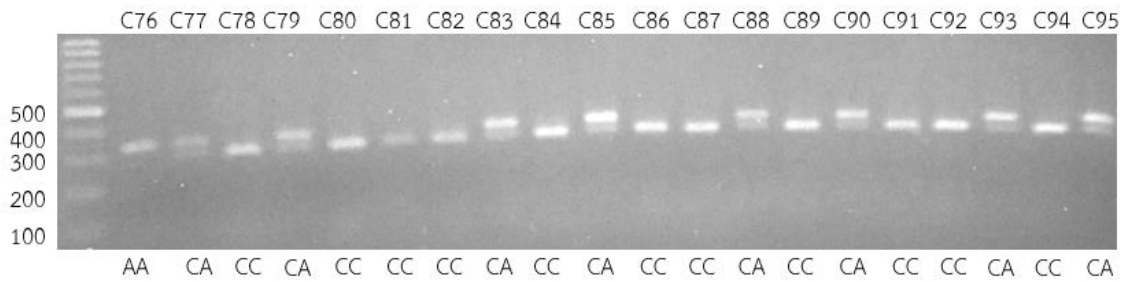
รูปที่ 11 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C16 - C35



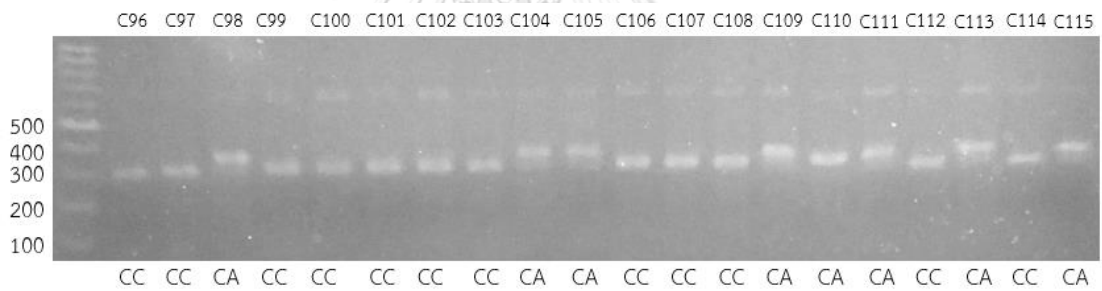
รูปที่ 12 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C36 - C55



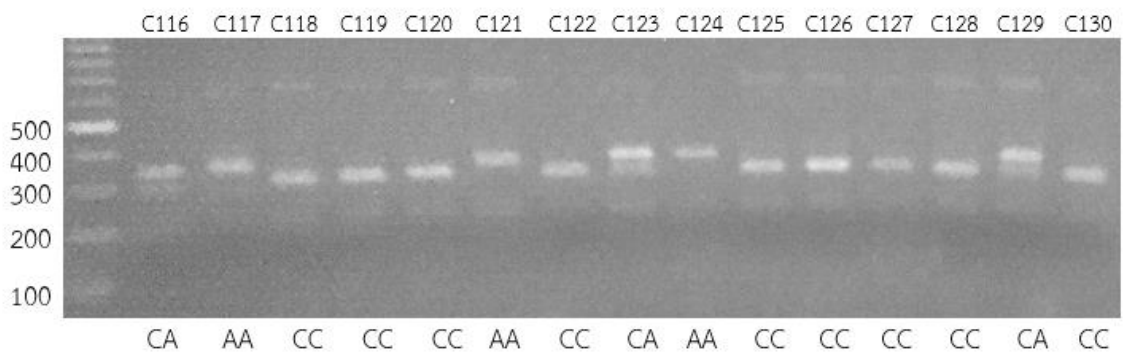
รูปที่ 13 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C56 – C75



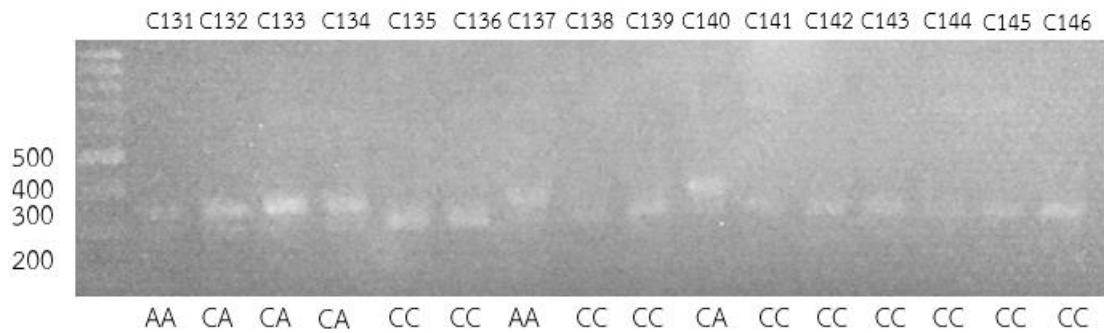
รูปที่ 14 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C76 – C95



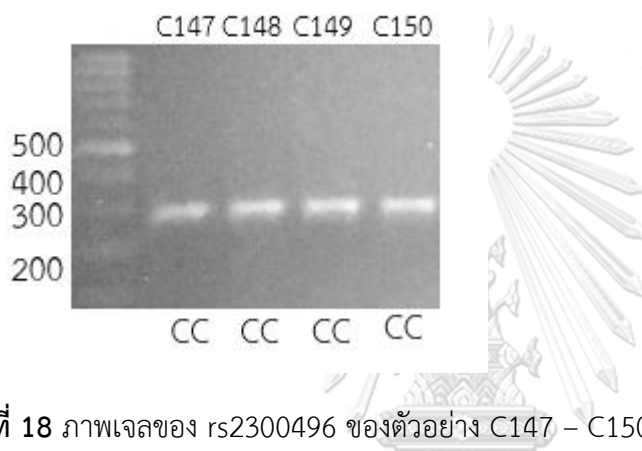
รูปที่ 15 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C96 – C115



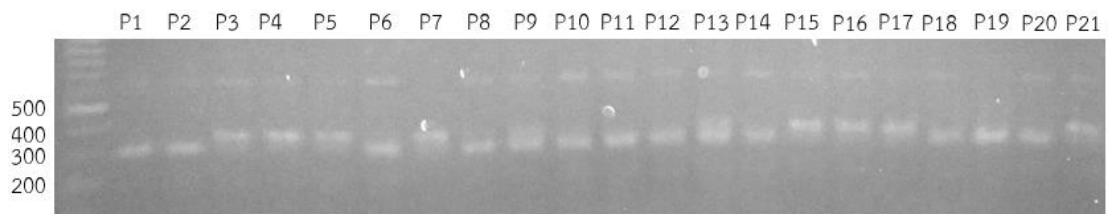
รูปที่ 16 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C116 – C130



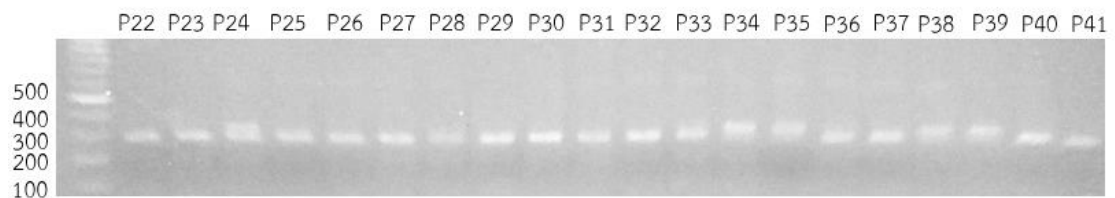
รูปที่ 17 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C131 – C146



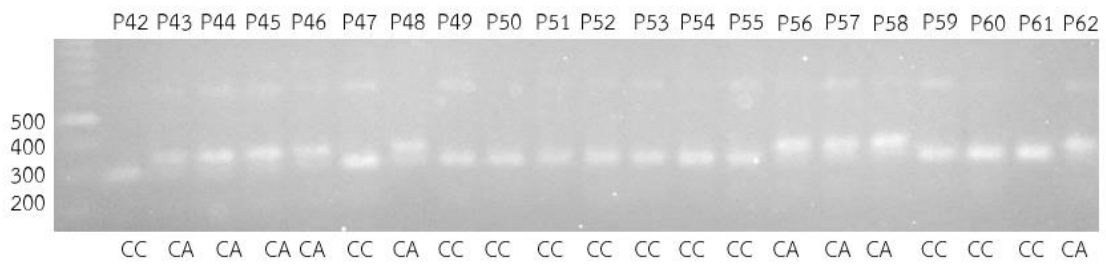
รูปที่ 18 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง C147 – C150



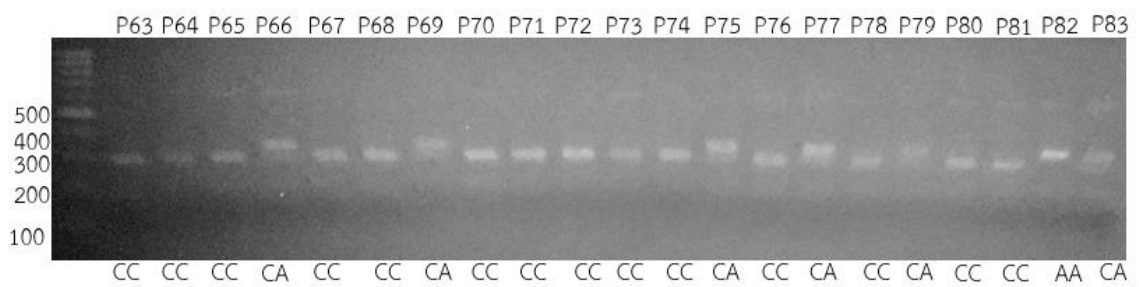
รูปที่ 19 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P1 - P21



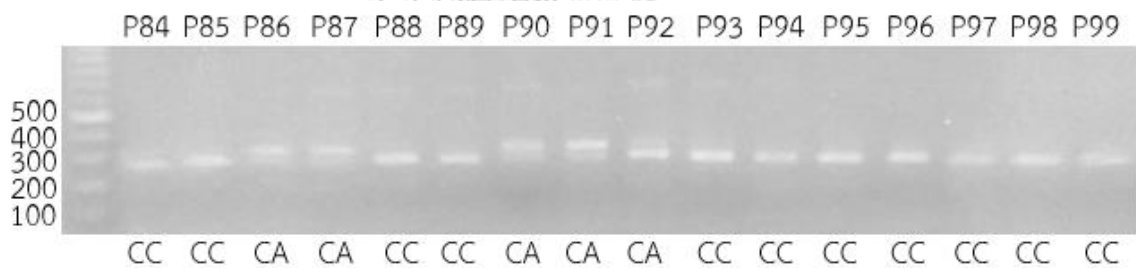
รูปที่ 20 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P22 – P41



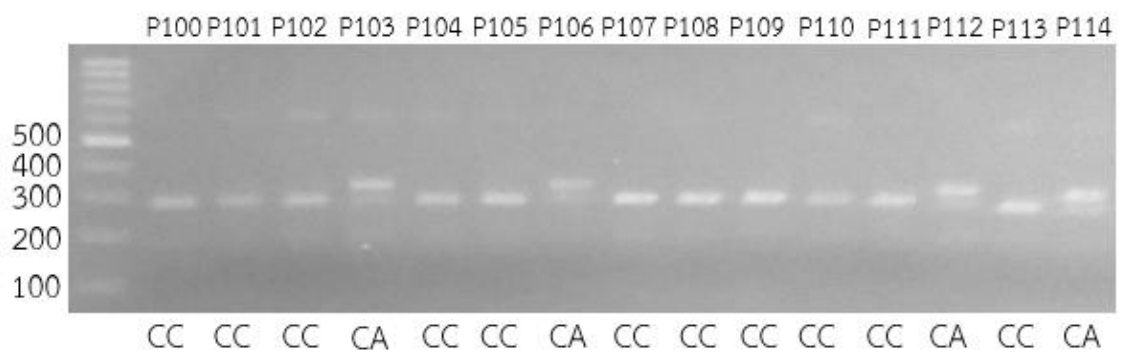
รูปที่ 21 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P42 – P62



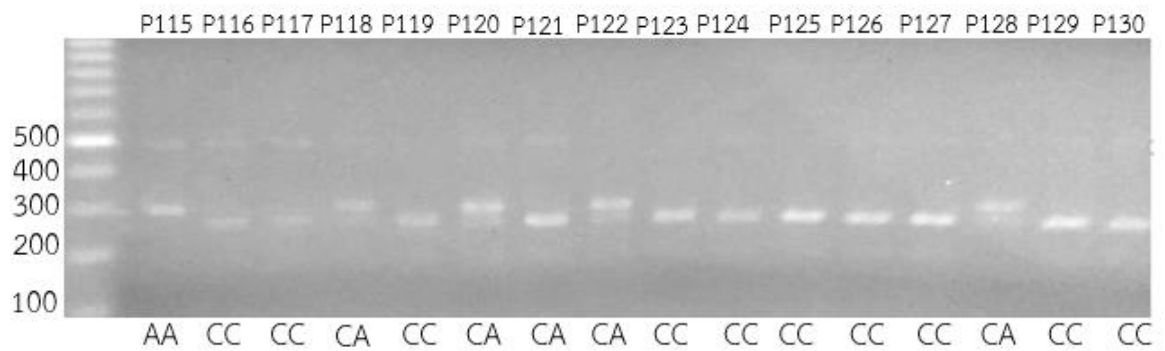
รูปที่ 22 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P63 – P83



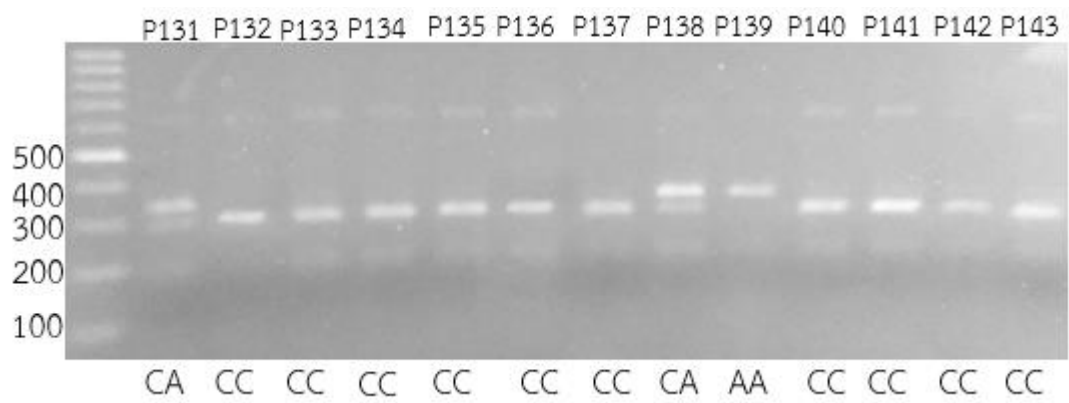
รูปที่ 23 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P84 – P99



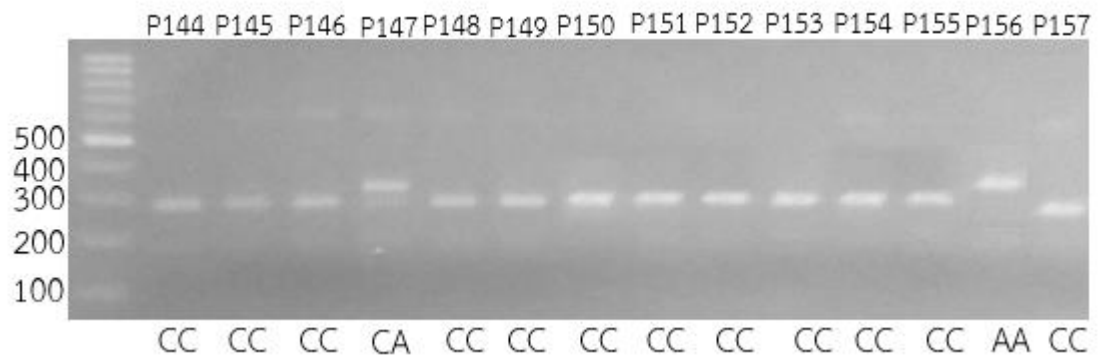
รูปที่ 24 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P100 – P114



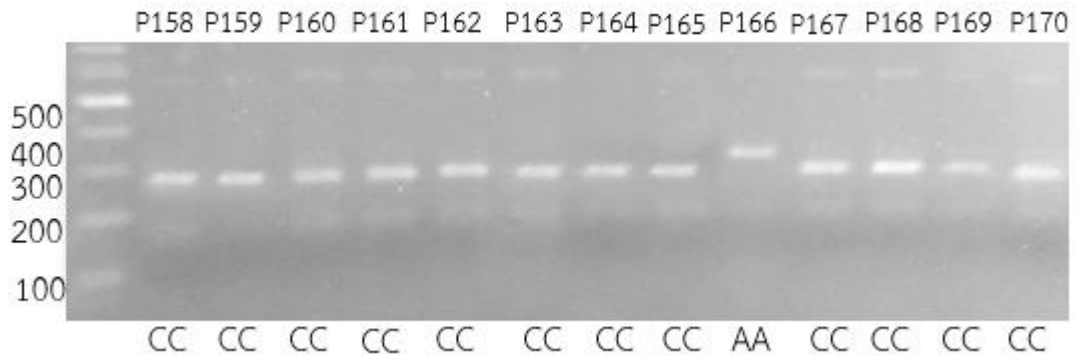
รูปที่ 25 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P115 – P130



รูปที่ 26 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P131 – P143

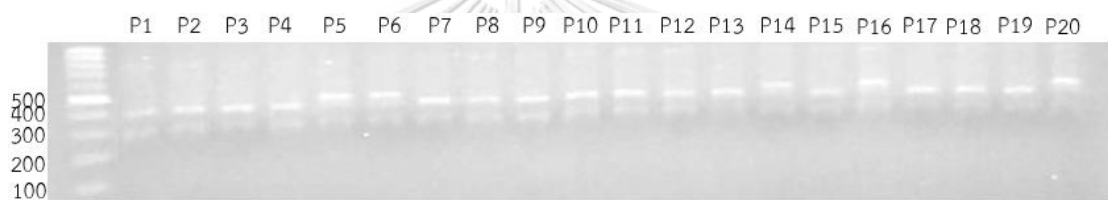


รูปที่ 27 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P144 – P157

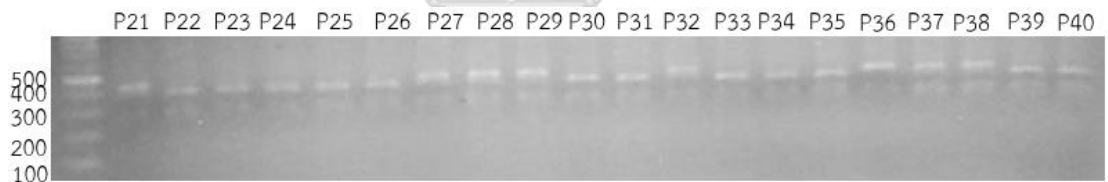


รูปที่ 28 ภาพเจลของ rs2300496 ของตัวอย่าง P158 – P170

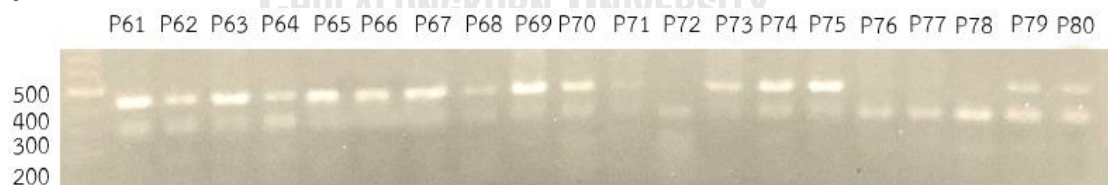
ภาพเจลของ rs3814843



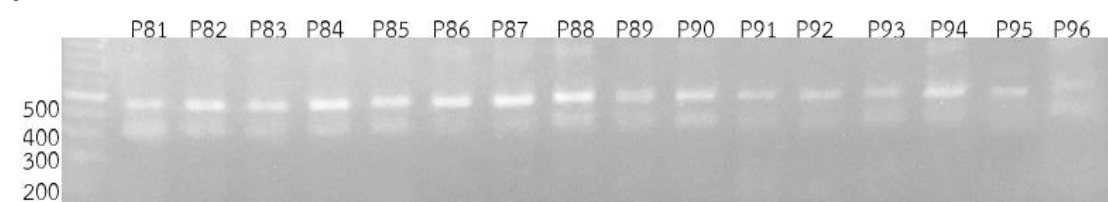
รูปที่ 29 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง P1 – P20



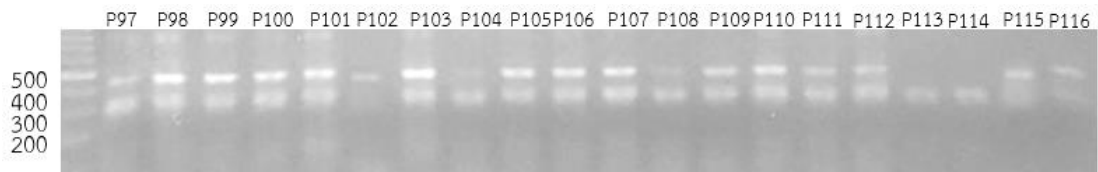
รูปที่ 30 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง P21 – P40



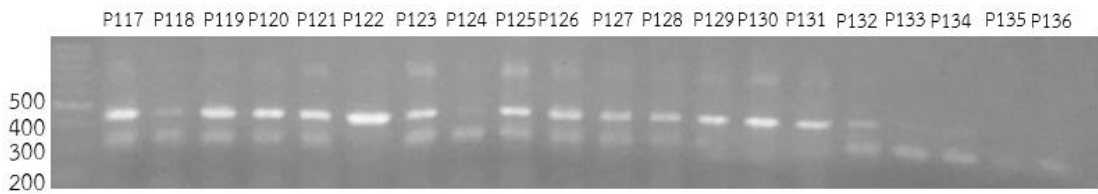
รูปที่ 31 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง P61 – P80



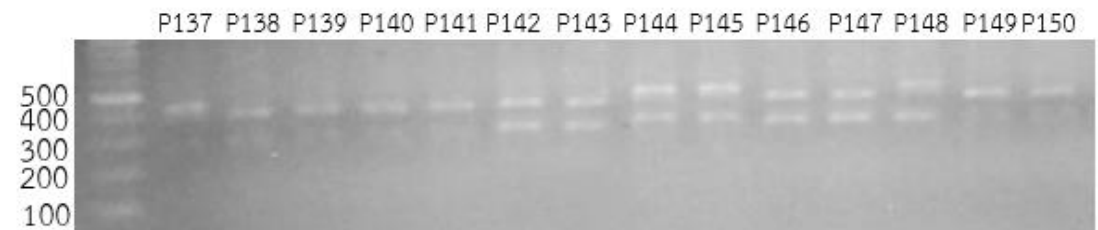
รูปที่ 32 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง P81 – P96



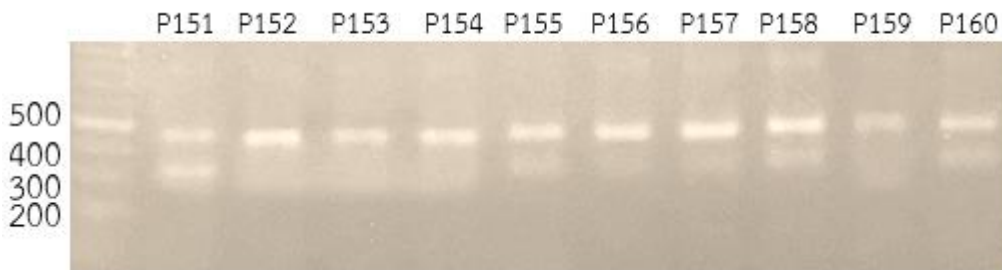
รูปที่ 33 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง P97 – P116



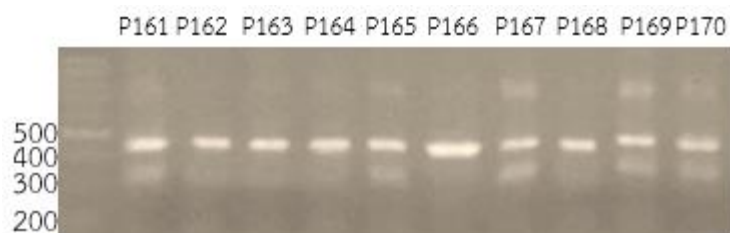
รูปที่ 34 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง P117 – P136



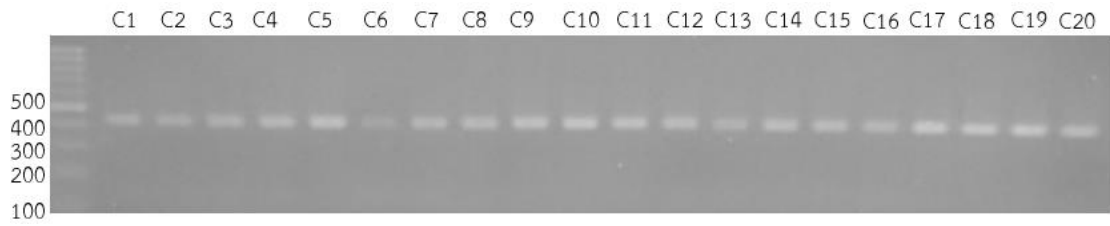
รูปที่ 35 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง P137 – P150



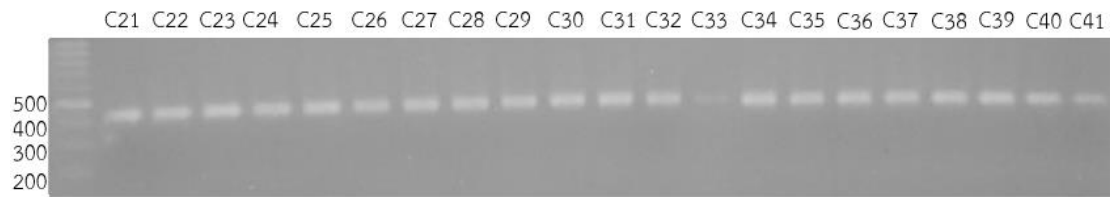
รูปที่ 36 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง P151 – P160



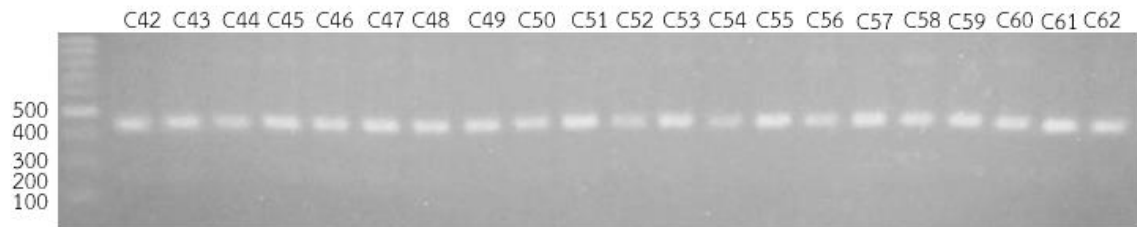
รูปที่ 37 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง P161 – P170



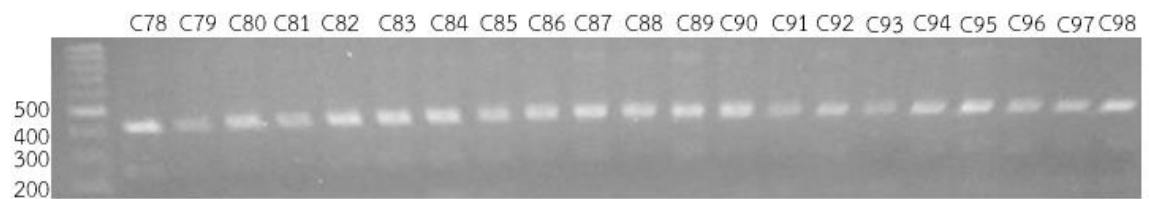
รูปที่ 38 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง C1 – C20



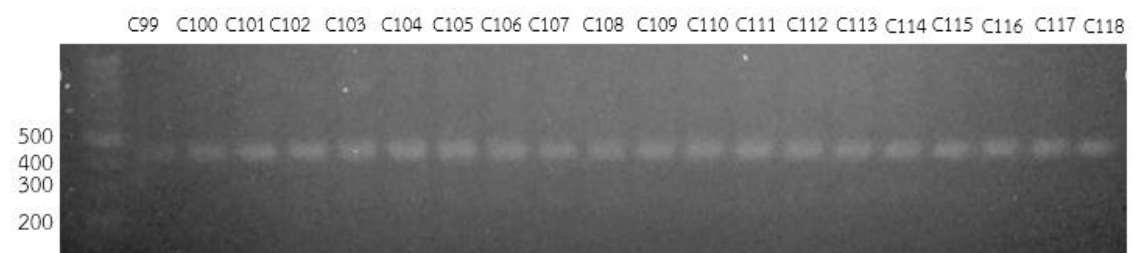
รูปที่ 39 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง C21 – C41



รูปที่ 40 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง C42 – C62

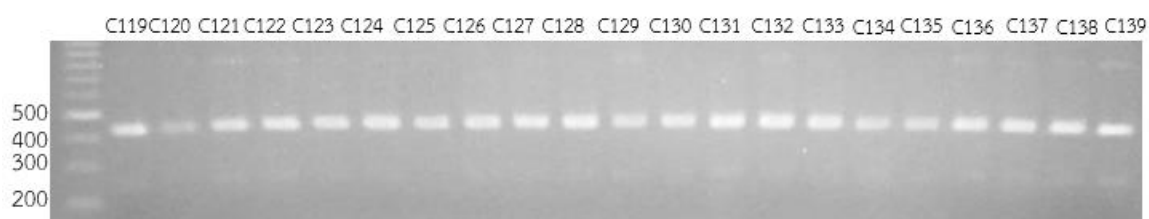


รูปที่ 41 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง C78 – C98

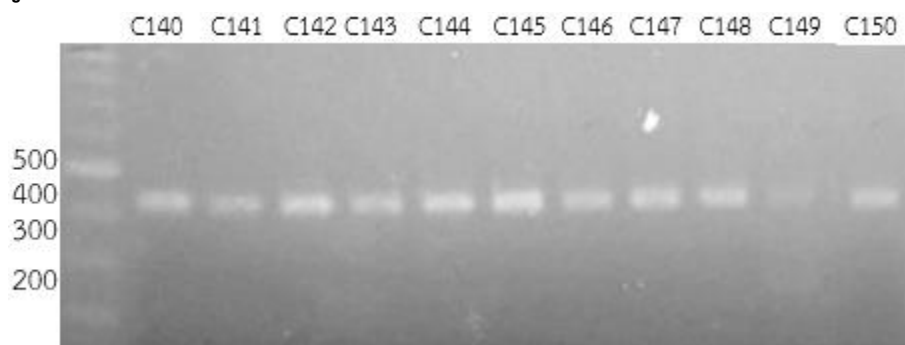


รูปที่ 42 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง C99 – C118





รูปที่ 43 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง C119 – C139



รูปที่ 44 ภาพเจลของ rs3814843 ของตัวอย่าง C140 – C150



## ข้อมูลจีโนมของ rs12885713

## ตารางที่ 15 ข้อมูลจีโนมของ rs12885713 ในกลุ่มควบคุม

ตัวอย่าง	จีโนม
C1	TT
C2	CC
C3	TT
C4	CC
C5	CC
C6	CT
C7	CC
C8	CC
C9	TT
C10	CC
C11	CT
C12	TT
C13	CC
C14	CC
C15	CT
C16	TT
C17	CT
C18	TT
C19	CT
C20	TT
C21	CT
C22	CT
C23	TT
C24	TT
C25	CT
C26	CT
C27	CT
C28	TT
C29	TT
C30	TT
C31	TT
C32	TT
C33	TT
C34	CT
C35	CT
C36	CT

C37	CC
C38	CT
C39	CT
C40	CT
C41	TT
C42	CT
C43	TT
C44	TT
C45	CC
C46	CC
C47	CT
C48	TT
C49	TT
C50	TT
C51	CT
C52	CT
C53	CT
C54	TT
C55	CT
C56	CC
C57	CC
C58	CT
C59	CT
C60	CT
C61	CT
C62	CC
C63	CT
C64	CT
C65	CT
C66	CT
C67	CT
C68	CT
C69	CT
C70	CT
C71	CT
C72	CT
C73	CT
C74	CT
C75	CT
C76	CT

C77	CT
C78	CC
C79	CC
C80	CT
C81	CT
C82	CC
C83	CC
C84	CT
C85	CT
C86	CC
C87	CT
C88	CT
C89	CT
C90	CT
C91	CT
C92	CC
C93	CC
C94	CT
C95	CT
C96	CT
C97	CC
C98	CT
C99	CC
C100	CT
C101	CC
C102	CT
C103	CC
C104	CC
C105	CT
C106	CT
C107	CT
C108	CT
C109	CT
C110	CT
C111	TT
C112	TT
C113	TT
C114	TT
C115	CT
C116	TT

C117	CT
C118	CC
C119	CT
C120	TT
C121	CT
C122	CC
C123	CC
C124	CT
C125	CT
C126	CT
C127	CT
C128	TT
C129	CT
C130	TT
C131	CT
C132	CT
C133	CT
C134	CT
C135	CT
C136	CC
C137	CT
C138	CT
C139	TT
C140	CT
C141	CT
C142	TT
C143	CT
C144	CT
C145	TT
C146	TT
C147	CT
C148	CC
C149	TT
C150	CC

ตารางที่ 16 ข้อมูลจีโนไทป์ของ rs12885713 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ตัวอย่าง	จีโนไทป์
P1	CC
P2	CC
P3	CT
P4	CC
P5	CT
P6	CT
P7	CT
P8	TT
P9	CT
P10	CC
P11	CT
P12	CT
P13	CC
P14	CT
P15	CC
P16	CT
P17	CT
P18	CC
P19	CT
P20	CC
P21	CC
P22	CT
P23	CT
P24	CT
P25	CT
P26	CT
P27	CC
P28	CC
P29	CC
P30	CT
P31	CT
P32	CC
P33	CT
P34	CT
P35	TT
P36	TT
P37	CC
P38	CC

P39	CT
P40	CT
P41	CT
P42	CT
P43	TT
P44	CT
P45	CC
P46	TT
P47	CT
P48	CT
P49	CT
P50	CT
P51	CT
P52	CT
P53	CT
P54	CC
P55	CT
P56	CT
P57	CT
P58	CT
P59	TT
P60	TT
P61	CT
P62	CT
P63	CC
P64	CT
P65	TT
P66	TT
P67	CT
P68	CT
P69	CT
P70	CT
P71	CC
P72	CT
P73	CT
P74	CT
P75	CT
P76	TT
P77	CC
P78	CT

P79	CT
P80	CC
P81	TT
P82	CT
P83	CT
P84	CT
P85	CT
P86	CC
P87	CT
P88	CC
P89	CC
P90	CT
P91	CC
P92	CT
P93	CC
P94	CT
P95	CT
P96	CT
P97	CC
P98	CC
P99	CT
P100	CC
P101	CT
P102	CT
P103	CC
P104	TT
P105	CC
P106	CT
P107	CT
P108	CT
P109	CT
P110	CC
P111	CT
P112	CC
P113	CT
P114	CC
P115	CC
P116	CT
P117	CT
P118	CT



P119	CT
P120	CT
P121	CT
P122	CT
P123	TT
P124	CT
P125	CC
P126	CT
P127	CT
P128	CT
P129	CC
P130	CT
P131	CC
P132	CT
P133	CC
P134	CT
P135	CT
P136	CT
P137	CC
P138	CT
P139	CC
P140	CC
P141	CC
P142	CT
P143	CC
P144	TT
P145	CC
P146	CC
P147	CC
P148	CT
P149	CT
P150	CC
P151	CT
P152	CT
P153	CT
P154	TT
P155	CT
P156	TT
P157	CT
P158	CC

P159	CT
P160	CT
P161	CT
P162	TT
P163	CT
P164	CC
P165	CT
P166	CT
P167	CT
P168	CT
P169	CT
P170	CC



## ข้อมูลจีโนมโทป์ของ rs2300496

## ตารางที่ 17 ข้อมูลจีโนมโทป์ของ rs2300496 ในกลุ่มควบคุม

ตัวอย่าง	จีโนมโทป์
C1	CA
C2	AA
C3	CC
C4	CC
C5	CC
C6	CA
C7	CC
C8	CA
C9	AA
C10	CC
C11	CC
C12	CC
C13	CC
C14	CA
C15	CC
C56	CC
C57	CC
C58	CC
C59	CC
C60	CC
C61	CC
C62	CC
C63	CC
C64	CC
C65	CC
C66	CC
C67	CA
C68	CC
C69	CC
C70	CC
C71	CC
C72	CA
C73	CA
C74	CC
C75	CA
C76	AA

C77	CA
C78	CC
C79	CA
C80	CC
C81	CC
C82	CC
C83	CA
C84	CC
C85	CA
C86	CC
C87	CC
C88	CA
C89	CC
C90	CA
C91	CC
C92	CC
C93	CA
C94	CC
C95	CA
C96	CC
C97	CC
C98	CA
C99	CC
C100	CC
C101	CC
C102	CC
C103	CC
C104	CA
C105	CA
C106	CC
C107	CC
C108	CC
C109	CA
C110	CA
C111	CA
C112	CC
C113	CA
C114	CC
C115	CA
C116	CA

C117	AA
C118	CC
C119	CC
C120	CC
C121	AA
C122	CC
C123	CA
C124	AA
C125	CC
C126	CC
C127	CC
C128	CC
C129	CA
C130	CC
C131	AA
C132	CA
C133	CA
C134	CA
C135	CC
C136	CC
C137	AA
C138	CC
C139	CC
C140	CA
C141	CC
C142	CC
C143	CC
C144	CC
C145	CC
C146	CC
C147	CC
C148	CC
C149	CC
C150	CC

ตารางที่ 18 ข้อมูลจีโนไทป์ของ rs2300496 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม

ตัวอย่าง	จีโนไทป์
P42	CC
P43	CA
P44	CA
P45	CA
P46	CA
P47	CC
P48	CA
P49	CC
P50	CC
P51	CC
P52	CC
P53	CC
P54	CC
P55	CC
P56	CA
P57	CA
P58	CA
P59	CC
P60	CC
P61	CC
P62	CA
P63	CC
P64	CC
P65	CC
P66	CA
P67	CC
P68	CC
P69	CA
P70	CC
P71	CC
P72	CC
P73	CC
P74	CC
P75	CA
P76	CC
P77	CA
P78	CC
P79	CA

P80	CC
P81	CC
P82	AA
P83	CA
P84	CC
P85	CC
P86	CA
P87	CA
P88	CC
P89	CC
P90	CA
P91	CA
P92	CA
P93	CC
P94	CC
P95	CC
P96	CC
P97	CC
P98	CC
P99	CC
P100	CC
P101	CC
P102	CC
P103	CA
P104	CC
P105	CC
P106	CA
P107	CC
P108	CC
P109	CC
P110	CC
P111	CC
P112	CA
P113	CC
P114	CA
P115	AA
P116	CC
P117	CC
P118	CA
P119	CC

P120	CA
P121	CA
P122	CA
P123	CC
P124	CC
P125	CC
P126	CC
P127	CC
P128	CA
P129	CC
P130	CC
P131	CA
P132	CC
P133	CC
P134	CC
P135	CC
P136	CC
P137	CC
P138	CA
P139	AA
P140	CC
P141	CC
P142	CC
P143	CC
P144	CC
P145	CC
P146	CC
P147	CA
P148	CC
P149	CC
P150	CC
P151	CC
P152	CC
P153	CC
P154	CC
P155	CC
P156	AA
P157	CC
P158	CC
P159	CC



P160	CC
P161	CC
P162	CC
P163	CC
P164	CC
P165	CC
P166	AA
P167	CC
P168	CC
P169	CC
P170	CC



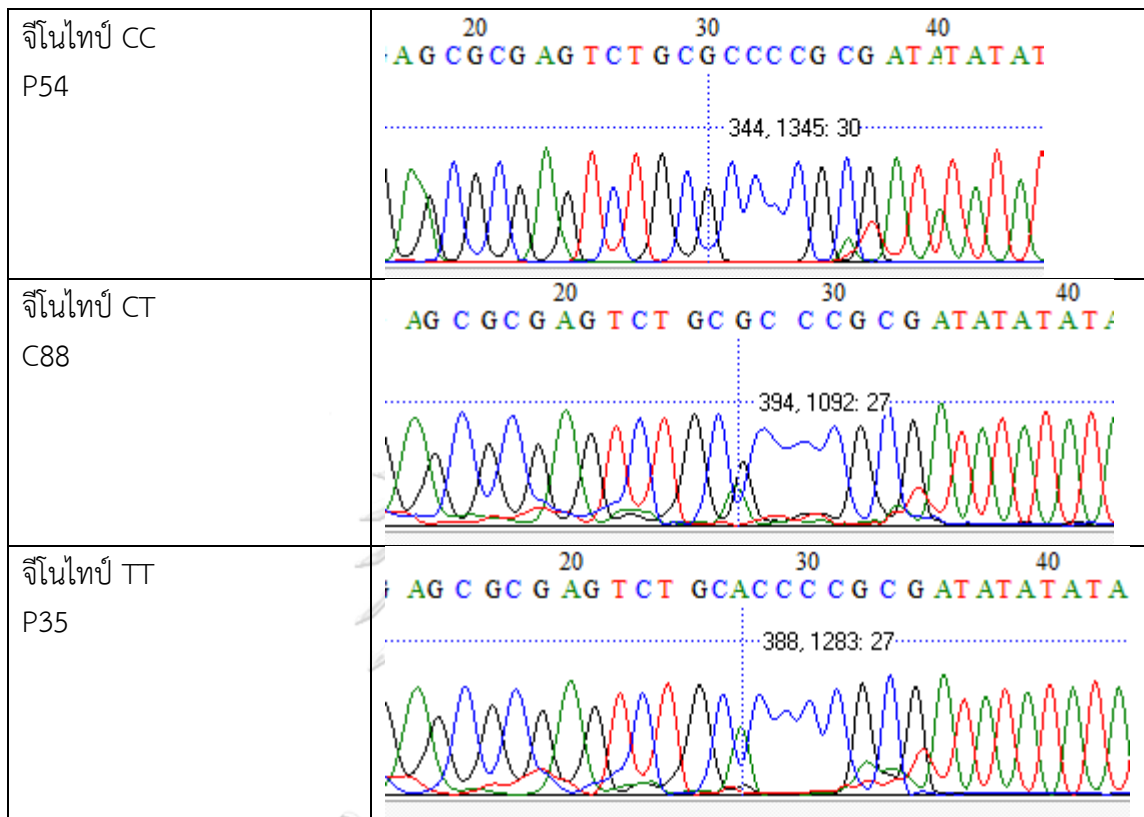
ข้อมูลการแสดงผลออกของยีน CALM1 ตำแหน่ง rs12885713

ตารางที่ 19 ข้อมูลการแสดงผลออกของยีน CALM1 ตำแหน่ง rs12885713

ตัวอย่าง	จีโนไทป์	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2^{(-\Delta\Delta CT)}$
C1	CC	-1.487	0.514	0.700
C2	CC	-2.010	-0.009	1.007
C3	CC	-2.263	-0.263	1.200
C4	CC	-1.343	0.657	0.634
C5	CC	-0.767	1.234	0.425
C6	TT	1	1	1
C7	CC	-1.167	0.834	0.561
C8	CC	-2.113	-0.113	1.081
C9	CC	-1.530	0.471	0.722
C10	CC	-1.847	0.154	0.899
C11	TT	1	1	1
C12	CC	-1.587	0.414	0.751
C13	CC	-0.910	1.091	0.470
C14	CC	-1.747	0.254	0.839
C15	TT	1	1	1
C16	TT	1	1	1
C17	CC	-1.410	0.591	0.664
C18	CC	-2.220	-0.219	1.164
C19	CC	-1.097	0.904	0.534
C20	TT	1	1	1
C21	CC	-1.680	0.321	0.801
C22	CC	-0.673	1.327	0.399
C23	TT	1	1	1
C24	TT	1	1	1
C25	CC	-1.417	0.584	0.667
C26	CC	-1.550	0.451	0.732
C27	CT	-1.693	0.307	0.808
C28	TT	1	1	1
C29	CT	-0.527	1.474	0.360
C30	CT	-1.603	0.397	0.759

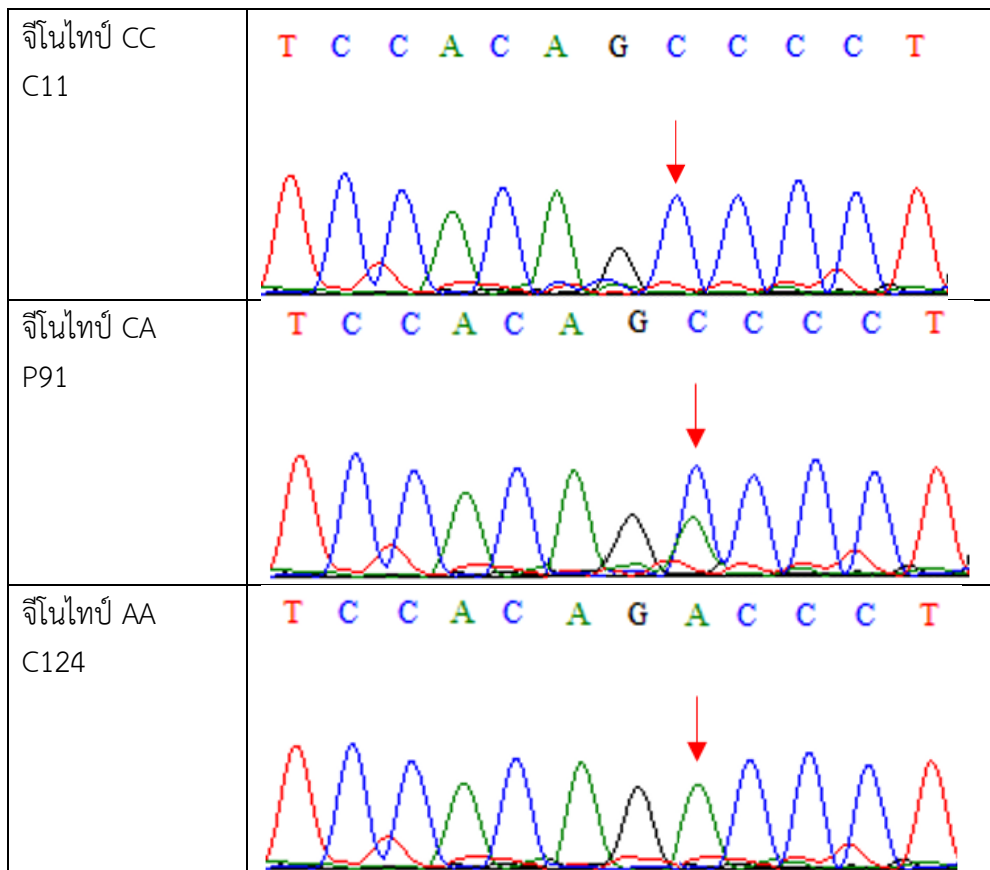
## ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rs12885713

ตารางที่ 20 ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ rs12885713



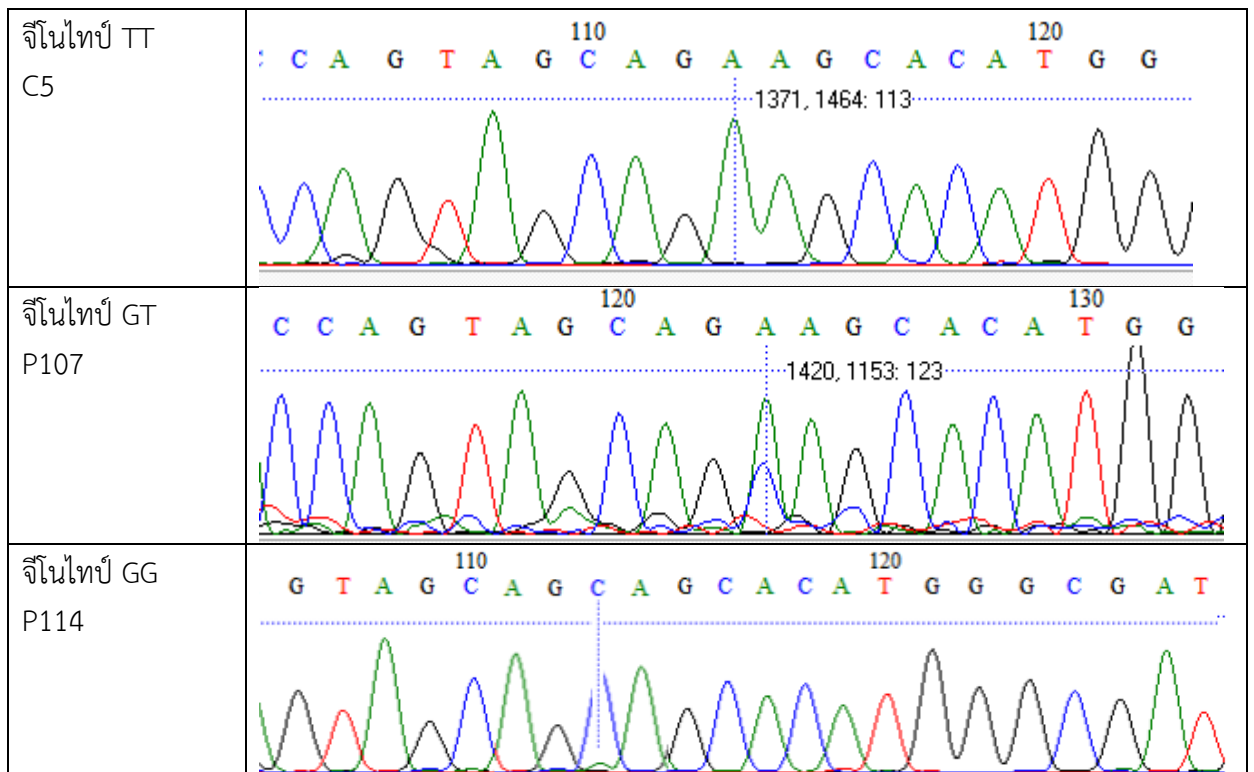
## ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rs2300496

ตารางที่ 21 ข้อมูลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ rs2300496



## ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rs3814843

ตารางที่ 22 ข้อมูลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ rs3814843



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศุภกฤษี เหล่าชัยเจริญผล
วัน เดือน ปี เกิด	22 ธันวาคม 2537
สถานที่เกิด	สกลนคร
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	598/1 ต.สว่างแดนดิน อ.สว่างแดนดิน จ.สกลนคร
ผลงานตีพิมพ์	ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณยีน CALM1 กับโรคข้อเข่าเสื่อม โครงการประชุมวิชาการระดับชาติพะเยาวิจัย ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยพะเยา 25 – 28 มกราคม 2565



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY