

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1  
ตำแหน่ง rs17095355 กับผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศไทย

นางสาวสร้อยรุช แก้วเกียรติยศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2554  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

ASSOCIATION OF X-PROLYL AMINOPEPTIDASE 1 RS17095355 POLYMORPHISM  
WITH BILIARY ATRESIA IN THAI CHILDREN

Miss Sarannut Kaewkiattiyot

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

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของ  
ยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ตำแหน่ง rs17095355 กับ  
ผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศไทย

โดย

นางสาวสรลนุช แก้วเกียรติยศ

สาขาวิชา

ชีวเคมีทางการแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฐฐิ์ ประพันธ์วัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วรนุช จงศรีสวัสดิ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. อีรพร ชินชัย)

สรุปลงช แก้วเกียรติยศ : ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ตำแหน่ง rs17095355 กับผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศไทย. (ASSOCIATION OF X-PROLYL AMINOPEPTIDASE 1 RS17095355 POLYMORPHISM WITH BILIARY ATRESIA IN THAI CHILDREN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ. นพ. ยง ภู่วรรณ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ. ดร. นพ. สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, 82 หน้า.

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่พบได้น้อยและพบในเด็กแรกเกิด มีลักษณะการตีบตันของท่อน้ำดีที่อยู่นอกตับทำให้ขัดขวางการไหลของน้ำดี หากไม่ได้รับการรักษา ผลของการคั่งสะสมของน้ำดีจะทำให้เกิดพังผืดสะสมขึ้นที่ตับและอาจนำไปสู่ภาวะตับแข็งในที่สุด แม้จะมีหลายสมมติฐานที่พยายามอธิบายถึงพยาธิสภาพของการเกิดโรค แต่ปัจจุบันยังคงไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรคอย่างแน่ชัด สมมติฐานหนึ่งคือ เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับ immune-mediated สำหรับยีน X-prolyl aminopeptidase 1 เป็นยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ และมีการแสดงออกในเซลล์เยื่อในในระบบ hepatobiliary จึงอาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน และ SNPs อาจมีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ และไม่เคยมีการศึกษา SNP ตำแหน่งนี้ในผู้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันของผู้ป่วยเด็กในประเทศไทย โดยวิเคราะห์จีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่ง rs17095355 โดยใช้เทคนิค PCR และ direct sequencing ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 124 ราย และในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 114 ราย ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะจีโนไทป์ TT และอัลลีล T มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (TT;  $P = 0.0016$ , T;  $P = 0.0025$ ) และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะตัวเหลืองในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 โดยเฉพาะอัลลีล T มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันของผู้ป่วยเด็กในประเทศไทย

ภาควิชา: .....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....  
 สาขาวิชา: .....ชีวเคมีทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
 ปีการศึกษา: .....2554..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

# # 5374690930: MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: BILIARY ATRESIA / X-PROLYL AMINOPEPTIDASE 1 (*XPNPEP1*) / SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) / PCR-DIRECT SEQUENCING

SARANNUT KAEWKIATTIYOT: ASSOCIATION OF X-PROLYL AMINOPEPTIDASE 1 RS17095355 POLYMORPHISM WITH BILIARY ATRESIA IN THAI CHILDREN.  
 ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SITTISAK HONSAWAK, M.D. Ph.D., 82 pp.

Biliary atresia (BA) is a rare disease of infancy which is characterized by progressive fibrosclerosing obstruction of the extrahepatic biliary system, resulting in obstruction of bile flow. If untreated, it will result in cholestasis which can lead to progressive fibrosis and ultimately to cirrhosis. Despite many hypotheses have been suggested for the cause of BA, but its etiology still remains largely unknown, but one hypothesis reveals that BA is an immune-mediated disease. X-prolyl aminopeptidase 1 (*XPNPEP1*) is a gene involved in the metabolism of inflammatory mediators, which is shown to express in epithelial cells of the hepatobiliary system and has been suggested for its association with pathogenesis of BA. Moreover, SNPs may be different among races, and this SNP in Thai patients with biliary atresia have not yet been investigated. Therefore, the aim of this study was to examine whether there is an association between *XPNPEP1* rs17095355 gene polymorphism and susceptibility to BA in Thai children. A total of 124 cases of BA and 114 controls were genotyped for *XPNPEP1* rs17095355 polymorphism. The *XPNPEP1* rs17095355 C/T genotype was determined by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. The result showed that the frequency of TT genotype ( $P = 0.0016$ ) and T allele ( $P = 0.0025$ ) were significantly associated with an increased risk of BA and there was no association between *XPNPEP1* SNP and the occurrence of jaundice. In conclusion, the association between *XPNPEP1* rs17095355 polymorphism and BA has been demonstrated, particularly with T allele confers increased susceptibility to the BA.

Department : ..... Biochemistry ..... Student's Signature .....

Field of Study : ..... Medical Biochemistry ..... Advisor's Signature .....

Academic Year : ..... 2011 ..... Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรรณ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียงพอ พร้อมทั้งคอยให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยหาวิธีการแก้ไขปัญหาอุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้คำปรึกษา แนะนำ จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิสิฐ ทรัพย์วิวัฒน์ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวรรณุช จงศรีสวัสดิ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร ชินชัย ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการวิทยานิพนธ์ และได้สละเวลามาดำเนินการสอบวิทยานิพนธ์นี้ ทั้งได้กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนทำให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านของภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนสามารถบรรลุตามวัตถุประสงค์ของการศึกษาระดับปริญญาโทมาโดยตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาชีวเคมีที่คอยช่วยเหลือในด้านต่างๆ มาโดยตลอด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน และพี่ๆ ในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิกที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา ให้กำลังใจ และช่วยเหลือในด้านต่างๆ จนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่คอยให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในการดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษา ตั้งแต่แรกเข้าศึกษาจนสำเร็จการศึกษา ตลอดจนขอขอบใจเพื่อนๆ ระดับปริญญาโทที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาผู้ให้กำเนิด ที่เหน็ดเหนื่อยเพื่อให้โอกาสทางการศึกษาที่ทรงคุณค่า พร้อมทั้งให้ความรักและคอยเป็นกำลังใจให้แก่ผู้เขียนเสมอมา อันเป็นแนวทางนำไปสู่ความสำเร็จของผู้เขียน

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
สารบัญแผนภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
กรอบแนวความคิดวิจัย.....	5
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
โรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	7
สาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	16
การศึกษาความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับจีโนมในโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	28
การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	31
Single nucleotide polymorphism (SNP).....	33
หลักการพื้นฐานของเทคนิค PCR.....	34
การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ.....	36

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR.....	37
Agarose gel Electrophoresis.....	37
การย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide.....	39
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
ประชากร.....	41
เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	42
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	43
ประชากรที่ศึกษา.....	44
การเก็บตัวอย่าง.....	45
การสกัดดีเอ็นเอ.....	45
การออกแบบไพรเมอร์.....	46
การเพิ่มปริมาณ DNA อย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR.....	48
ตรวจหาผลผลิตจากการทำ PCR โดยใช้ agarose gel electrophoresis .....	49
การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล.....	50
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing.....	51
การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	51
การตรวจสอบข้อมูล.....	51
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	52
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	53
ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR.....	53
ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing.....	54
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	61
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก การเตรียมสารเคมี.....	79
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	82



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การตรวจวัดค่าทางชีวเคมีในการคัดกรองผู้ป่วยที่มีอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน	12
2	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	27
3	ข้อมูลของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR และขนาดผลิตภัณฑ์.....	48
4	ปริมาณของสารต่างๆที่ใช้สำหรับการทำ PCR.....	49
5	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR.....	49
6	การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 (C/T) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม.....	58
7	การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 (C/T) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลือง และในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง.....	59

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การจำแนกโรคท่อน้ำดีตีบตันตามตำแหน่งการตีบตันของท่อน้ำดี.....	9
2	ลักษณะการผ่าตัดโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	14
3	อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	15
4	ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน....	16
5	ไวรัส และ T cell-mediated autoreactivity ต่อการทำลายของเยื่อบุผิวของทางเดินน้ำดีในโรคท่อน้ำดีตีบตัน.....	22
6	ตำแหน่งข้อมูลทางจีโนมบนโครโมโซม 10q24.2 ที่เกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน	29
7	ตำแหน่งของ SNP rs17095355 บนโครโมโซมที่ 10.....	30
8	หลักการการทำงานของ PCR ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ.....	35
9	การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR ด้วย agarose gel electrophoresis.....	39
10	ตำแหน่ง SNP rs17095355 และตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าจับ.....	46
11	ผลตรวจสอบการจับกันของไพรเมอร์ rs17099355F และ rs17095355R .....	47
12	ผลการ Blast ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Forward primer (rs17095355F) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล.....	47
13	ผลการ Blast ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Reverse primer (rs17095355R) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล.....	48
14	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วย PCR เมื่อทำที่ Tm ต่างกัน.....	53
15	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR.....	54
16	ผลการ Blast ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากวิธี direct sequencing กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล.....	55
17	ภาพ Chromatogram ที่ได้จาก automated sequencing.....	56
18	แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม.....	57

## สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวความคิดของการวิจัย.....	5

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
BA	Biliary atresia
PCR	Polymerase Chain Reaction
BASM	Biliary atresia splenic malformation syndrome
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
<i>P</i> -value ( <i>P</i> )	Probability Value
GWAS	Genome wide association study
<i>XPNPEP1</i>	X-prolyl aminopeptidase 1 gene
<i>ADD3</i>	Adducin 3 gene
SNP	Single nucleotide polymorphism
A1AT	alpha-1-antitrypsin
CMV	cytomegalovirus
ICAM	intercellular adhesion molecule
sICAM	soluble intercellular adhesion molecule
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia หรือ BA) เป็นกลุ่มอาการคั่งของน้ำดีที่เกิดในทารกแรกเกิด เป็นโรคที่พบบได้น้อย มีอุบัติการณ์ของการเกิดโรคประมาณ 1:15,000 ในทารกแรกเกิด [1] ซึ่งมีการตีบตันอย่างสมบูรณ์ในส่วนใดส่วนหนึ่งหรือตลอดความยาวของ extrahepatic bile duct และเป็นสาเหตุหลักของการเกิดภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิด การตีบตันของท่อน้ำดีทำให้เกิดการคั่งของน้ำดีในตับ (cholestasis) และก่อให้เกิดพังผืดขึ้นในตับ อาการจะปรากฏในช่วงสัปดาห์แรกของชีวิต ผู้ป่วยจะแสดงอาการตัวเหลือง ตาเหลือง (cholestatic jaundice) อุจจาระสีซีด ปัสสาวะสีเข้ม สำหรับอาการที่ปรากฏร่วม ได้แก่ มีอาการตับม้ามโต ท้องมาน หลังจากได้รับการวินิจฉัยแล้วผู้ป่วยจะได้รับการรักษาด้วยการเอาลำไส้ไปต่อกับบริเวณ porta hepatis หรือที่เรียกว่าการผ่าตัดแบบคาสาย (Kasai portoenterostomy) [2] เพื่อระบายน้ำดีจากตับลงสู่ลำไส้เล็กส่วน duodenum มากกว่าครึ่งของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด การผ่าตัดจะได้ผลดีถ้าทำก่อนทารกอายุ 2 เดือน ภาวะแทรกซ้อนหลังการผ่าตัด เช่น ท่อน้ำดีอักเสบ ภาวะความดันพอร์ทัลสูง ประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ป่วยทั้งหมดไม่ได้ผลด้วยการผ่าตัดแบบคาสาย กล่าวคือน้ำดียังไม่สามารถไหลผ่านไปได้ ตับของผู้ป่วยเด็กเหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นตับแข็งภายในช่วงปีแรกของชีวิต วิธีเดียวที่สามารถจะทำให้เด็กมีอายุยืนยาวต่อไปได้คือการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ (liver transplantation) [3] และพบว่าประมาณร้อยละ 90 ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะสามารถมีชีวิตรอดและมีคุณภาพชีวิตที่ปกติ [1,4]

มีตัวเลขรายงานอุบัติการณ์การเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในเด็กแรกเกิดประมาณ 1:8,000 ถึง 1:18,000 ใน Caucasians [4-7] โรคนี้เป็นโรคที่ค่อนข้างพบบได้น้อยและแม้ว่าจะได้รับการศึกษาค้นคว้าอย่างจริงจังแล้วก็ตาม ปัจจุบันก็ยังไม่ทราบถึงสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันอย่างแน่ชัด เชื่อว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคประกอบด้วย defective morphogenesis, genetic factors, vascular abnormalities, viral infection, exposure to toxins และ immune mechanisms จากการศึกษาสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาถึงปัจจัยทางพันธุกรรมต่อการเกิดโรคเป็นจำนวนมากขึ้น โดยมีการศึกษาหาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมของยีนต่างๆ เช่น vascular endothelial growth factor gene (VEGF), intercellular adhesion molecule-1 gene (ICAM-1), macrophage migration inhibitory factor

gene (MIF), CFC1 gene, CD14 endotoxin receptor gene และ hepcidin antimicrobial peptide gene [8-13] เป็นต้น ซึ่งยีนเหล่านี้ล้วนเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ก่อให้เกิดการอักเสบเนื่องจากการอักเสบที่เกิดขึ้นที่ตับมีผลต่อการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

จากการศึกษาของ Garcia-Barcelo et al. [14] ในการหาปัจจัยทางพันธุกรรมของยีนที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยทำการศึกษา Genome-wide association study (GWAS) เพื่อคัดลักษณะทางพันธุกรรมของตำแหน่ง Single nucleotide polymorphism (SNP) ประมาณ 500,000 ตำแหน่ง ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบในกลุ่มตัวอย่างประชากรชาวจีนที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 200 ราย และกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 481 ราย พบว่ามี SNPs 10 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากลักษณะทางพันธุกรรมของ SNPs ทั้ง 10 ตำแหน่ง Garcia-Barcelo et al. ได้พบว่า rs17095355 ที่อยู่บนโครโมโซม 10q24 ซึ่งอยู่ upstream ของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 (*XPNPEP1*) เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติพบว่า rs17095355 เป็น SNP ที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตันอย่างชัดเจน ( $P = 0.00024$ )

rs17095355 เป็น SNP ที่อยู่ระหว่างยีน X-prolyl aminopeptidase 1 (*XPNPEP1*) และ Adducin 3 (*ADD3*) โดยพบว่า *ADD3* จะมีการแสดงออกในเซลล์เยื่อของตับและทางเดินน้ำดี และพบว่ามีการแสดงออกของยีนนี้ในตับระยะทารกในครรภ์ (fetal liver) มากกว่าในตับผู้ใหญ่ [15] ส่วน *XPNPEP1* พบว่ามีการแสดงออกในเซลล์เยื่อในระบบ hepatobiliary [16] ยีนนี้จะ encode ให้ X-prolyl aminopeptidase P หรือ soluble amino peptidase P (APP1) ซึ่งเป็น ubiquitous enzyme ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของ bradykinin (BK) และ substance P (SP) [17] จากข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับบทบาทหน้าที่ของยีน *ADD3* และ ยีน *XPNPEP1* ทำให้ Garcia-Barcelo et al. เชื่อว่ายีนทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมของกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้น

SNPs มีความแตกต่างกันตามเชื้อชาติได้และก่อนหน้านี้นี้เป็นการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีความแตกต่างกับประชากรในไทย ผลที่ได้อาจมีความแตกต่างกันและการศึกษาดังกล่าวยังต้องอาศัยการศึกษาในประชากรอื่นๆ เพื่อยืนยันผล ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNP) ตำแหน่ง

rs17095355 บนโครโมโซม 10q24 และอยู่ upstream ของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันของผู้ป่วยเด็กในประเทศไทย

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรม (SNP) ตำแหน่ง rs17095355 ซึ่งอยู่บนโครโมโซม 10q24 และอยู่ upstream ของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 กับโรคท่อน้ำดีตีบตันในผู้ป่วยเด็กที่พบในประเทศไทยเพื่อนำข้อมูลส่วนนี้ไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

### ขอบเขตของการวิจัย

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

### ข้อตกลงเบื้องต้น

กลุ่มที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบไปด้วย 2 กลุ่ม ได้แก่

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

### ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *XPNPEP1* ในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เป็นประชากรไทยยังไม่เคยมีผู้ใดทำการศึกษามาก่อนทำให้ไม่ทราบความแปรปรวนของประชากรในกลุ่มควบคุม

## คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

PCR-direct sequencing คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing เพื่อตรวจหารูปแบบจีโนไทป์ของยีนตรงตำแหน่ง SNP

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

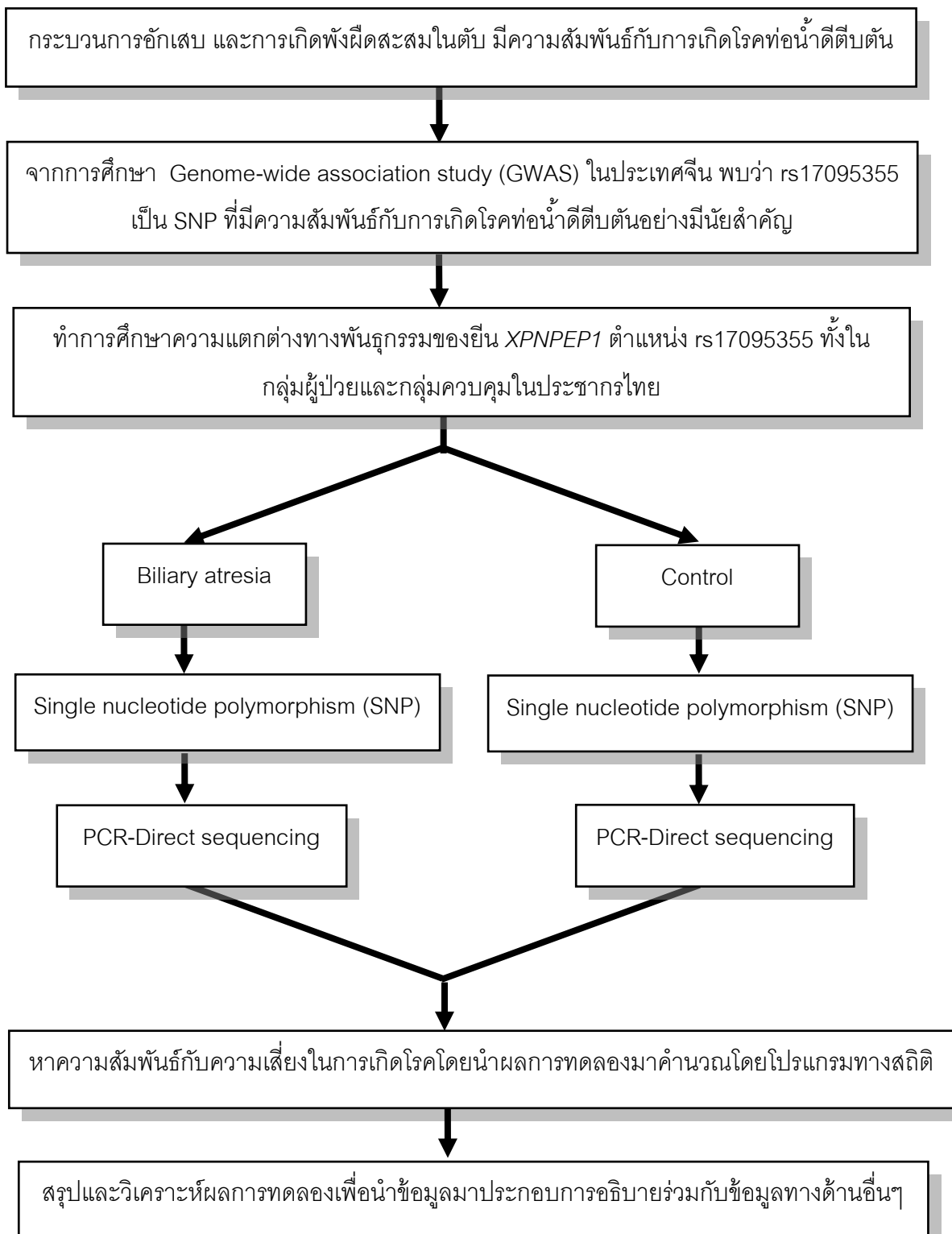
ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 กับการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันเพื่อที่จะได้นำข้อมูลมาใช้ในประกอบการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางพันธุกรรมกับการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรค ซึ่งอาจนำข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันหรือเป็นแนวทางการรักษาในอนาคตได้

## วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเลือด
2. การสกัด DNA โดยใช้วิธี Phenol-Chloroform Extraction
3. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)
4. การตรวจสอบผลผลิตจาก PCR โดยใช้ Agarose gel electrophoresis
5. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphism) ด้วยวิธี direct sequencing
6. การเก็บรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ผล



### กรอบแนวความคิดของการวิจัย



แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

### ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

1. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์หลักสูตร วท.ม. (สาขาชีวเคมีทางการแพทย์) ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ยื่นเสนอโครงร่างวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมในการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ดำเนินการวิจัย รวบรวมข้อมูล สรุปและวิเคราะห์ผลการวิจัย
4. นำเสนอผลงานวิทยานิพนธ์ต่อสาธารณชนและยื่นเสนอวิทยานิพนธ์ต่อคณะกรรมการวิทยานิพนธ์หลักสูตร วท.ม. (สาขาชีวเคมีทางการแพทย์) ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### แนวคิดและทฤษฎี

โรคท่อน้ำดีตีบตัน (Biliary atresia; BA) (OMIM 210500) เป็นโรคที่มีภาวะคั่งของน้ำดีในทารกแรกเกิด เนื่องจากการตีบตันในสวนใดส่วนหนึ่งหรือตลอดความยาวของ extrahepatic bile duct ส่งผลให้เกิดการอักเสบ และเกิดพังผืดทั้งในส่วน of intrahepatic duct และ extrahepatic duct [18] รูปแบบของการเกิดท่อน้ำดีตีบตันสามารถแบ่งออกตามระยะการแสดงอาการได้ 2 แบบ คือ [4]

1. Non-syndromic BA หรือ perinatal/acquired form พบประมาณร้อยละ 90 ของผู้ป่วย อาการเกิดขึ้นในระยะ 3 ถึง 6 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด โดยในระยะแรกเด็กมีลักษณะที่ปกติแต่จะถ่ายอุจจาระมีสีซีดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งอาจจะเกิดจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เป็นตัวกระตุ้นในการก่อให้เกิดอาการมากขึ้น

2. Syndromic BA หรือ foetal/embryonic form พบประมาณร้อยละ 10 ของผู้ป่วย โดยที่ผู้ป่วยจะแสดงอาการภายในระยะเวลา 3 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด เป็นผลมาจากความผิดปกติที่เกิดขึ้นมาตั้งแต่กำเนิดซึ่งอาจพบความผิดปกติอื่นๆร่วมด้วย เช่น polysplenia (splenic malformation syndrome), asplenia, cardiac หรือ intra abdominal defects (situs inversus, pre-duodenal portal vein, absence of retro-hepatic inferior vena cava, intestinal malrotation) เป็นต้น

#### อุบัติการณ์ของการเกิดโรค

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่พบได้น้อย โดยพบในอัตราส่วนประมาณ 5:100,000-32:100,000 ในเด็กแรกเกิด และพบมากในแถบเอเชียและแปซิฟิก และสัดส่วนในการเกิดโรคจะพบในเพศหญิงมากกว่าเพศชายเพียงเล็กน้อย [4] สำหรับอุบัติการณ์ของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันที่แสดงไว้ในประเทศต่างๆ เช่น ในประเทศเนเธอร์แลนด์พบสัดส่วนของทารกที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันต่อทารกปกติ 5:100,000 [19] ในประเทศฝรั่งเศสพบประมาณ 5.1:100,000 [20] หมู่เกาะอังกฤษพบ 6:100,000 [21] สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกาในรัฐเท็กซัส 6.5:100,000 [22] เมืองวิกตอเรียประเทศออสเตรเลียพบประมาณ 7:100,000 [23] เมืองแอตแลนตาประเทศ

สหรัฐอเมริกาพบประมาณ 7.4:100,000 [24] หมู่เกาะฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกาพบ 10.6:100,000 [5] และในแถบภูมิภาคเอเชีย เช่น ประเทศญี่ปุ่น พบในอัตราส่วน 7.4:100,000 [25] สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีตัวเลขรายงานอุบัติการณ์ของการเกิดโรคนี้ นอกจากนี้จากการศึกษาแบบ time distribution และ space distribution ของโรคท่อน้ำดีตีบตันพบว่าโรคนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกฤดูกาลและทุกช่วงเวลา [22-23] แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากการเป็นการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่จำกัด จึงไม่สามารถนำข้อมูลมาใช้อธิบายได้

### ลักษณะทางพยาธิวิทยา

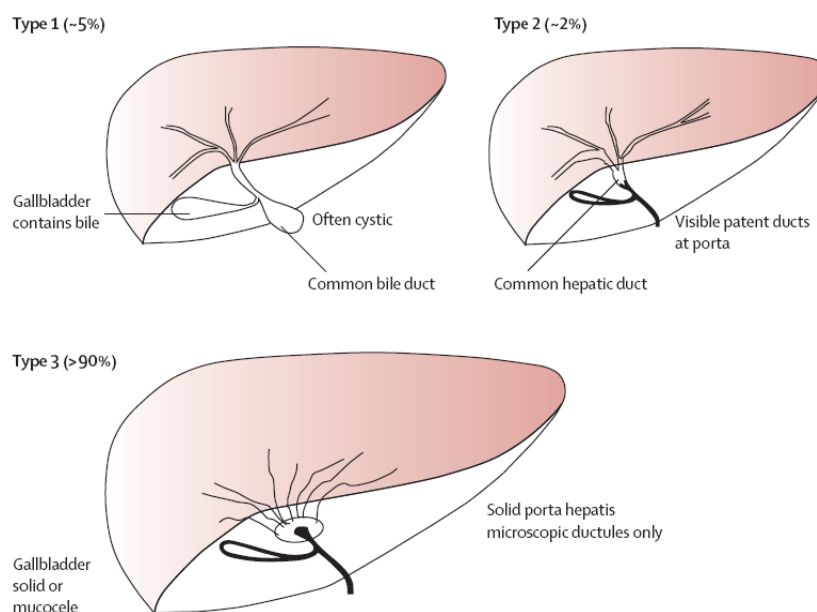
พยาธิวิทยาของ extrahepatic biliary system มีความหลากหลายอย่างมากในกลุ่มผู้ป่วยแต่สามารถจำแนกได้โดยใช้ตำแหน่งการตีบตันเป็นพื้นฐานในการแยกทำให้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ [26]

ชนิดที่ 1 Common bile duct atresia พบประมาณร้อยละ 5 ของผู้ป่วย มีลักษณะการตีบตันบริเวณ common duct ในขณะที่ proximal ducts ปกติ ซึ่งเป็นการตีบตันเฉพาะส่วนปลายของท่อน้ำดี

ชนิดที่ 2 Common hepatic duct atresia พบประมาณร้อยละ 2 ของผู้ป่วย มีลักษณะการตีบตันของ hepatic duct และพบ cystic structures ในบริเวณ porta hepatitis เป็นการตีบตันเฉพาะส่วนต้นของท่อน้ำดี

ชนิดที่ 3 Common bile duct รวมทั้ง right และ left hepatic duct atresia ซึ่งพบได้มากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วย เป็นชนิดที่มีการตีบตันบริเวณ right และ left hepatic ducts ไปจนถึง porta hepatitis ซึ่งเป็นการตีบตันตลอดบริเวณของท่อน้ำดีในส่วน extrahepatic bile duct

การตีบตันของ extrahepatic bile duct ทำให้เกิดการขัดขวางการไหลของน้ำดีจากตับไม่ให้ไหลลงสู่ลำไส้เล็ก ส่งผลให้เกิดการคั่งของน้ำดีและพังผืดสะสมขึ้นในตับ และอาจทำให้เกิดตับแข็งในที่สุด ซึ่งจะทำให้ความดันในหลอดเลือดดำพอร์ทัลสูง (portal hypertension) และตับสูญเสียการทำงานไป ดังนั้นการได้รับการวินิจฉัยและการผ่าตัดเพื่อระบายน้ำดีที่รวดเร็วและทันเวลาที่ จะช่วยลดความต้องการในการผ่าตัดปลูกถ่ายตับในผู้ป่วย



**รูปภาพที่ 1** การจำแนกโรคท่อน้ำดีตีบตันตามตำแหน่งการตีบตันของท่อน้ำดี

[26]

ในระดับจุลภาคของท่อน้ำดีนอกตับที่เกิดการตีบตันโดยสมบูรณ์จากกลไกการอักเสบและการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (cicatricial granulation tissue) เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อจากขั้วตับจะพบทั้ง inflammatory cell infiltration และพังผืด ประกอบกับพบโครงสร้างคล้ายท่อเล็กๆ ซึ่งเชื่อว่าเปลี่ยนแปลงมาจากท่อน้ำดีหลัก ท่อเล็กๆบริเวณขั้วตับเหล่านี้เป็นช่องทางที่ยังสามารถระบายน้ำดีจากท่อน้ำดีในตับมายังบริเวณ porta hepatis สำหรับเนื้อตับในเด็กที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันนั้น พบว่าตับจะโต แข็ง มีสีเขียวคล้ำ และเกิด micronodular cirrhosis ในระยะต่อมา ในระดับจุลภาคโครงสร้างของ portal tracts ในระยะแรกยังคงปกติ มีเพียง bile pigment แทรกในเซลล์ตับและท่อน้ำดีเล็กๆ (bile canaliculi) ซึ่งต่อมาจะกว้างออกและเพิ่มจำนวนขึ้น หากการตีบตันไม่ได้รับการรักษา โครงสร้างของ portal tracts จะถูกทำลายและเกิดตับแข็งในที่สุด จุลพยาธิสภาพในระยะที่เกิดตับแข็งแล้วจะพบการตายของเซลล์ตับและพบ giant cell transformation รวมทั้งพบ mononuclear cells แทรกอยู่ พยาธิสภาพในระยะท้ายเหล่านี้พบใน โรค neonatal hepatitis ทำให้ไม่สามารถแยกโรคได้จากการเจาะตัดชิ้นเนื้อตับมาตรวจ

### ลักษณะอาการทางคลินิก

ผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันจะมีอาการที่เรียกว่าภาวะดีซ่าน (jaundice) กล่าวคือผู้ป่วยจะมีลักษณะตัวเหลือง บริเวณตาขาวมีสีเหลืองซึ่งปกติสามารถพบได้บ้าง และเด็กสามารถ

หายเหลืองได้ภายใน 2 สัปดาห์นับตั้งแต่ว่าแรกคลอด แต่อาการตัวเหลืองตาเหลืองที่มีสาเหตุมาจากโรคตับจะไม่หายไป หรือหายเองได้แต่ใช้เวลานานกว่า 2 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังมีอาการอื่นๆ ได้แก่ อุจจาระมีสีซีด ปัสสาวะมีสีเข้ม ตับและม้ามโต (hepatosplenomegaly) พบว่ามากกว่าครึ่งในเด็กที่เป็นโรคนี้จะมีอุจจาระสีปกติในช่วง 2-3 วันแรกคลอด จากนั้นจะพบอาการอุจจาระซีดร่วมกับอาการตัวเหลือง ผู้ป่วยทั้งหมดที่มีภาวะดีซ่านแบบเรื้อรังจะมีปัสสาวะสีเข้ม ซึ่งลักษณะที่ผิดปกติเช่นนี้ ส่งผลต่อกระบวนการดูดซึมอาหารผิดปกติโดยเฉพาะความผิดปกติในการดูดซึมสารอาหารประเภทที่ละลายในไขมัน ลักษณะอาการแสดงออกเป็นไปอย่างช้าๆ นอกจากนี้ผู้ป่วยบางรายจะมีอาการโลหิตจาง (anemia) ทุพโภชนาการ (malnutrition) ความดันในหลอดเลือดดำพอร์ทัลสูง (portal hypertension) ท้องมาน (ascites) และหลอดเลือดโป่งพองในหลอดอาหาร (oesophageal varices) เกิดขึ้นร่วมด้วย อย่างไรก็ตามอาการเหล่านี้ไม่ได้เป็นอาการที่บ่งบอกแน่ชัดว่าเป็นผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จำเป็นต้องได้รับการวินิจฉัยอย่างละเอียดต่อไป

### การวินิจฉัยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

นักวิจัยพยายามที่จะพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองโรคท่อน้ำดีตีบตันเพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาได้ทันเวลาที่ เนื่องจากการวินิจฉัยแยกโรคท่อน้ำดีตีบตันจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องวินิจฉัยให้ถูกต้องก่อนอายุ 2 เดือน เพื่อประโยชน์ในการรักษาผ่าตัดให้ได้ผลดี โดยมีการพัฒนาตรวจวัด conjugated bilirubin ในจุดเลือดแห้ง (dry blood spots) บน universal Guthrie screening card เพื่อตรวจหาความเข้มข้นของเกลือน้ำดี แต่ผลที่ได้ไม่มีความจำเพาะ ในขณะที่บางประเทศ เช่น ไต้หวันและญี่ปุ่น ได้ทำบัตรสีอุจจาระ (stool color card) เพื่อช่วยให้ผู้ปกครองได้ตระหนักถึงอุจจาระที่มีสีซีดผิดปกติซึ่งอาจเป็นผลมาจากการอุดตันของทางเดินน้ำดี วิธีนี้เป็นวิธีการที่ง่าย มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมในการตรวจคัดกรอง [27-28]

### การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

- การวัดระดับบิลิรูบินในเลือด (serum fractionated bilirubin assay) เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาสาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลืองและตาเหลืองในผู้ป่วย โดยค่าที่นำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการวิเคราะห์คือ ค่าของบิลิรูบินทั้งหมด (total bilirubin) ที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 2 mg/dL หรือมากกว่าร้อยละ 20 ของบิลิรูบินทั้งหมด ผู้ป่วยจะมีระดับบิลิรูบินที่สูงกว่าปกติ ลักษณะแบบที่เรียกว่า conjugated hyperbilirubinemia โดยสารบิลิรูบินเกิดจากการสลายตัวของฮีโมโกลบินซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเม็ดเลือดแดง ตับจะเก็บบิลิรูบินออกจากกระแสเลือด

เวลาเลือดไหลผ่านตับ และถูกขับออกจากร่างกายผ่านทางน้ำดีและปัสสาวะ บิลิรูบินเป็นสารสีเหลือง (bile pigment) ในน้ำดี เมื่อเป็นโรคของตับหรือทางเดินน้ำดี ก็จะเป็นผลให้ระดับบิลิรูบินเพิ่มขึ้นสูงในเลือด วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็วแต่การตรวจวัดระดับบิลิรูบินเป็นการทดสอบที่ไม่จำเพาะ เพราะไม่สามารถบอกสาเหตุของการเกิดที่แท้จริงได้

- การตรวจวิเคราะห์การทำงานของตับ (liver function test, LFT) จะพบระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) และ alanine aminotransferase (ALT) อาจสูงได้เล็กน้อยในผู้ป่วยบางราย ส่วนระดับของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) และเอนไซม์ gamma-glutamyl transferase (GGT) จะพบสูงกว่าปกติ เอนไซม์ AST (หรือ SGOT) และ ALT (หรือ SGPT) จะมีระดับสูงขึ้นเมื่อเซลล์ตับถูกทำลายตายลง หรือเกิดการอักเสบของตับโดยเซลล์ตับไม่ตาย ทำให้เกิดการรั่วของเอนไซม์ออกนอกเซลล์ตับเข้าสู่กระแสเลือด สำหรับเอนไซม์ AST ยังพบได้ในเซลล์ชนิดอื่น เช่น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์กล้ามเนื้อลายของร่างกาย ดังนั้นจึงอาจพบสูงขึ้นได้ในโรคที่ไม่เกี่ยวกับตับ ในขณะที่การตรวจวัดเอนไซม์ ALP และ GGT จะเป็นการวัดการทำงานของระบบทางเดินน้ำดีว่ามี การอุดตันหรือไม่ หากมีการตีตันของท่อน้ำดีจะทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงขึ้น โดย GGT เป็นการตรวจเสริมที่ช่วยยืนยันว่าระดับ ALP ที่สูงขึ้นมาจากโรคตับและทางเดินน้ำดี เพราะ GGT จะไม่เพิ่มขึ้นในโรคของกระดูก รก และลำไส้ อย่างไรก็ตามการตรวจหน้าที่ของตับอาจจะไม่สามารถแยกโรคท่อน้ำดีตีตันออกจากภาวะ severe neonatal hepatitis ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการทั้งหมดยังไม่สามารถที่จะบ่งชี้การเป็นโรคได้อย่างถูกต้อง การตรวจวินิจฉัยที่ดีที่สุดคือการทำ intraoperative cholangiography (IOC) [29]

- การตรวจวินิจฉัยอื่นๆ เช่น การตรวจวัดอัลบูมินในเลือด เนื่องจากอัลบูมินเป็นโปรตีนสำคัญที่ตับสร้างขึ้น ดังนั้น ถ้าระดับอัลบูมินลดลง โดยที่ผู้ป่วยนั้นไม่ได้ขาดอาหาร ก็บ่งชี้ถึงสภาพหน้าที่ของตับที่เสื่อมลง การวัดเวลาการแข็งตัวของเลือดนิยมเรียกกันว่า prothrombin time (PT) โดยส่วนใหญ่ส่วนประกอบที่ทำให้เลือดแข็งตัวเป็นโปรตีนที่สร้างโดยตับ ดังนั้นผู้ป่วยโรคตับที่ตับเสื่อมสภาพ การทำหน้าที่สร้างโปรตีนเหล่านี้จะลดลงทำให้เลือดใช้เวลาแข็งตัวนานขึ้น นอกจากนี้ อาจทำการตรวจดูเชื้อไวรัสในกระแสเลือดหรือการตรวจ blood culture เพื่อดูการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด เป็นต้น

**ตารางที่ 1** การตรวจวัดค่าทางชีวเคมีในการคัดกรองผู้ป่วยที่มีอาการของโรค  
ท่อน้ำดีตีบตัน [26]

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

การตรวจสอบทางด้านรังสีวิทยา

การทดสอบทางอัลตราซาวนด์ (Abdominal ultrasonography) เป็นการตรวจโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง เพื่อตรวจดูตับ ถุงน้ำดี และท่อน้ำดี เป็นวิธีที่ใช้บ่อยที่สุดในการวินิจฉัยเด็กที่เป็น cholestatic jaundice ซึ่งจะสามารถพบ cystic structure ในผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีโป่งพอง (choledochal cyst) หรือโรคท่อน้ำดีตีบตันชนิดที่ 1 วิธีนี้เป็นการตรวจวินิจฉัยที่มีความรวดเร็วสามารถแสดงให้เห็นว่ามีหรือไม่มีถุงน้ำดีซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการบ่งชี้ภาวะของโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ นอกจากนี้ยังสามารถบอกการขาดหายไปหรือการหดตัวของถุงน้ำดี การพบว่าถุงน้ำดีมีขนาดเล็กลงหลังทานนมบ่งบอกว่าไม่ใช่ท่อน้ำดีตีบตัน สำหรับลักษณะจำเพาะของโรคท่อน้ำดีตีบตันคือ พบก้อนสามเหลี่ยม (triangular cord) บริเวณขั้วตับ อย่างไรก็ตามมีข้อบ่งชี้ที่สังเกตคือการไม่พบลักษณะ intrahepatic bile duct dilatation ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ยังไม่ได้รับการผ่าตัดรักษา นอกจากนี้การตรวจด้วยวิธี ultrasonography ยังสามารถใช้ในการบ่งชี้รูปแบบของโรค polysplenia (preduodenal portal vein, interrupted inferior vena cava (IVC)) ผลการทดสอบทาง ultrasonography ร่วมกับอาการทางคลินิกและการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจะเป็นการบ่งบอกภาวะของโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ถูกต้องและมีความแม่นยำขึ้น [30]



### การทำ Hepatobiliary scintigraphy

การตรวจทางเวชศาสตร์นิวเคลียร์ในระบบตับและทางเดินน้ำดี (Hepatobiliary scintigraphy) เป็นการศึกษาศักยภาพของตับในการผลิตน้ำดี การไหลของน้ำดี และการอุดตันของระบบทางเดินน้ำดี โดยใช้สารเภสัชรังสี technetium-labelled isotope ร่วมกับอนุพันธ์ของ iminodiacetic acid (IDA) สารนี้เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดจะถูกจับโดยเซลล์ตับ (hepatocyte) และขับถ่ายออกสู่ทางเดินน้ำดีและลำไส้เล็กส่วน duodenum วิธีนี้มีความแม่นยำค่อนข้างสูง สามารถวิเคราะห์ได้ว่า isotope ผ่านลงมาในลำไส้เล็กหรือไม่ ถ้าสาร isotope ผ่านลงมาในลำไส้ได้ก็มั่นใจได้ว่าผู้ป่วยที่ตัวเหลืองนั้นไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่ถ้าไม่พบสาร isotope ลงมาใน ลำไส้เล็กก็ยังไม่สามารถแยกโรค neonatal hepatitis ออกไปได้ เนื่องจากบางครั้งในภาวะที่หน้าทีตับเสียไปมาก เช่น ภาวะ severe neonatal hepatitis เซลล์ตับไม่สามารถกำจัดสาร isotope ลงมาในลำไส้เล็กได้มากพอที่จะถูกตรวจวัดได้ [30]

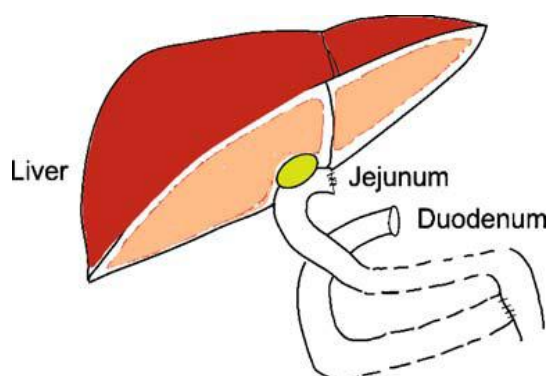
### การทำ Intraoperative cholangiography (IOC)

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

นอกจากนี้ยังมีการตรวจวิเคราะห์อื่นๆอีกแต่ไม่ยังไม่เป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลาย เช่น การทำ liver biopsy, magnetic resonance cholangiopancreaticography (MRCP), endoscopic retrograde cholangio pancreaticography (ERCP), duodenal drainage test และ serum lipoprotein-X, [30]

## การรักษาโรคท่อน้ำดีตีบตัน

แต่เดิมท่อน้ำดีตีบตันไม่สามารถผ่าตัดรักษาได้ จนกระทั่งในปลายปี ค.ศ.1959 ได้มีการคิดค้นวิธีการรักษา hepatic portoenterostomy และรายงานครั้งแรกเป็นภาษาญี่ปุ่นโดย นายแพทย์ Morio Kasai ศัลยแพทย์ชาวญี่ปุ่น เขาได้ทำการตรวจทาง microscopic ที่ท่อน้ำดีของเด็กทารกที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันทำให้เขาพบว่ามึรูที่บริเวณ portal hepatis เป็นจำนวนมาก การเปิดรูเหล่านี้โดยการผ่าตัดเอาส่วนของ extrahepatic biliary ที่เกิดการตีบตันออก ซึ่งจะส่งผลให้มีการระบายน้ำดีให้ซึมออกมาได้ การผ่าตัดนี้จะส่งผลดีต่อผู้ป่วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาภายในระยะเวลา 8 สัปดาห์นับตั้งแต่แรกคลอด ต่อมา มีรายงานวิธีการผ่าตัดดังกล่าวเป็นภาษาเยอรมันและภาษาอังกฤษ การรายงานครั้งแรกๆ ยังไม่เป็นที่ยอมรับ จนกระทั่งเกือบ 20 ปีให้หลังจึงจะเป็นที่ยอมรับทั่วโลกและให้เกียรติเรียกว่า Kasai operation



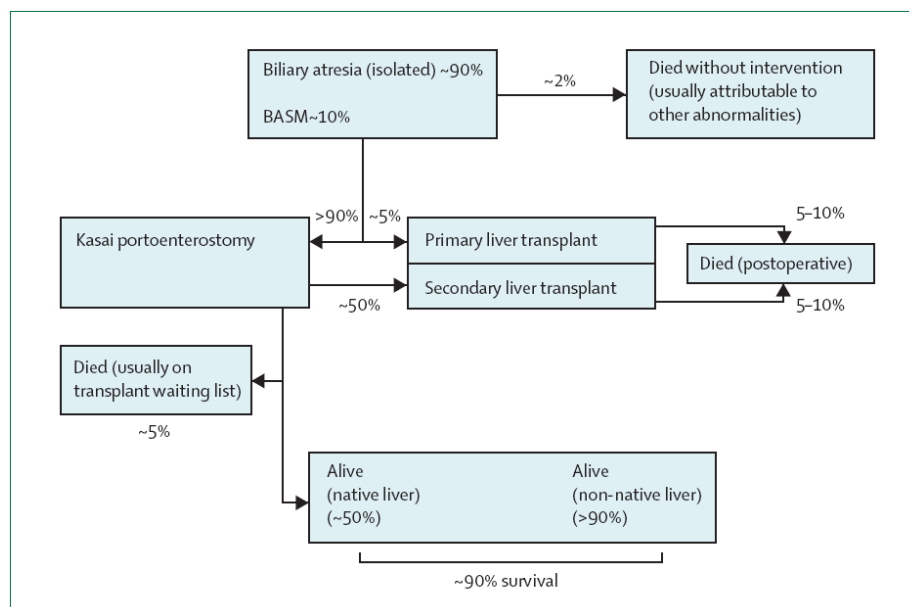
**รูปภาพที่ 2** ลักษณะการผ่าตัดแบบคาไซ (ด้านซ้าย) [31] การผ่าตัดของโรคท่อน้ำดีตีบตัน (ด้านขวา) [4]

การจัดการเพื่อรักษาผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันในปัจจุบันมี 2 ขั้นตอนด้วยกัน กล่าวคือ ในช่วงแรกผู้ป่วยจะได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ (Kasai portoenterostomy) เป็นการผ่าตัดเอาส่วนของ extrahepatic bile duct ที่ตีบตันออกแล้วจะใช้ลำไส้ส่วน jejunum ประมาณ 30-40 เซนติเมตร ไปต่อแทนท่อน้ำดีบริเวณ portal hepatis เป็นการระบายการไหลของน้ำดีที่สะสมอยู่ในตับลงสู่ลำไส้เล็ก ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของการผ่าตัดรักษา ได้แก่ อายุของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัด ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการรักษา การได้รับการวินิจฉัยและการผ่าตัดที่รวดเร็วที่สุดจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยการตรวจดูสีอุจจาระ และวัดระดับ conjugated bilirubin เป็น 2 วิธีหลักที่

สมควรได้รับการประเมินในอนาคต นอกจากนี้ ชนิดของการตีบตัน ความรุนแรงของ fibrosis ในตับก็เป็นปัจจัยหนึ่งในการส่งผลต่อการรักษา

การผ่าตัดแบบคาไซเป็นการผ่าตัดที่ใช้เป็นมาตรฐานในการรักษาอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน หากการผ่าตัดแบบคาไซล้มเหลว กล่าวคือ น้ำดีไม่สามารถที่จะไหลลงสู่ลำไส้เล็กได้ หรือผู้ป่วยมีภาวะแทรกซ้อนเกิดภาวะตับแข็ง เช่น hepatopulmonary syndrome วิธีเดียวที่สามารถทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตรอดต่อไปได้คือ การรักษาโดยการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ (liver transplant) ซึ่งโดยปกติจะกระทำก่อนผู้ป่วยอายุ 2 ปี [3] ดังนั้นการรักษาในขั้นตอนที่ 2 คือ การผ่าตัดปลูกถ่ายตับ แต่มักประสบกับปัญหาด้านค่าใช้จ่ายที่สูงมากและมีหน่วยบริการที่ค่อนข้างจำกัดทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากต้องเสียชีวิตเนื่องจากภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากภาวะตับแข็ง เช่น ภาวะเลือดออกจากเส้นเลือดขยายบริเวณหลอดอาหาร (esophageal varices) ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกวิธีอาจจะทำให้เกิดภาวะตับวาย (liver failure) ภายใน 1-2 ปี

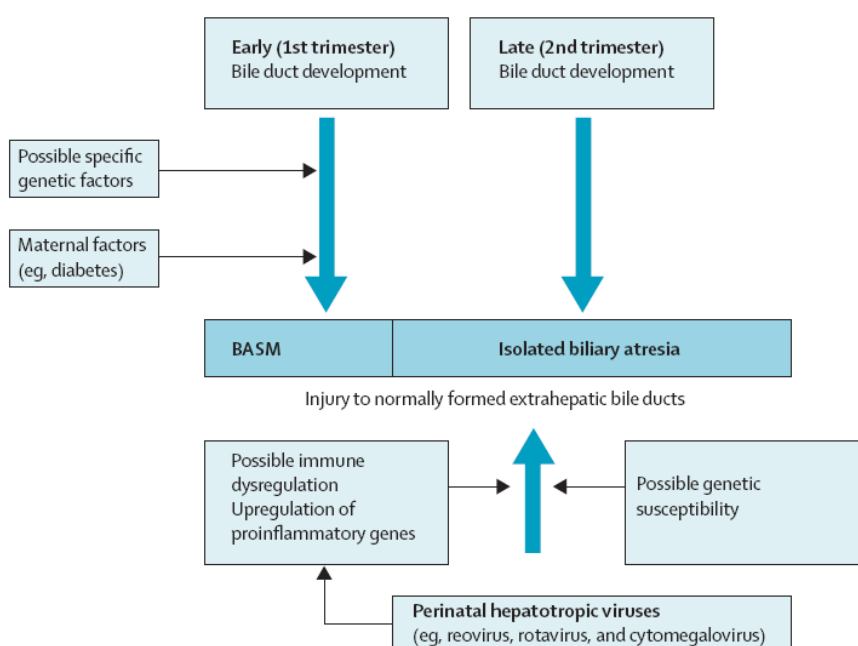
อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบว่าผู้ป่วยจะมีอัตราการรอดชีวิตมากขึ้นหลังจากการได้รับการผ่าตัดแบบคาไซประมาณร้อยละ 45-60 ภายในระยะ 5 ปี และร้อยละ 25-35 ภายในระยะ 10 ปี ซึ่งผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซอาจจะพบอาการข้างเคียง เช่น ภาวะท่อน้ำดีอักเสบ (cholangitis) ซึ่งพบประมาณร้อยละ 50 และภาวะความดันในหลอดเลือดดำพอร์ทัลสูง (portal hypertension) ซึ่งพบมากกว่าร้อยละ 60 ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซ



รูปภาพที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน [26]

## สาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ถึงแม้ว่าหลายปีที่ผ่านมาจะมีการศึกษาหาสาเหตุของการเกิดโรคอย่างจริงจัง แต่ในปัจจุบันก็ยังไม่มียุทธศาสตร์ใดที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรค จากการศึกษาที่ผ่านมาเชื่อว่าสาเหตุของการเกิดโรคเกิดจากหลายๆปัจจัยเข้าด้วยกัน ซึ่งได้แก่ defective morphogenesis/genetic factor, vascular abnormalities, viral infection, toxin exposure และ immune mechanisms [31]



**รูปภาพที่ 4** ความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน [26]

สำหรับการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมกับความสัมพันธ์กับการเกิดโรค โดยจากการศึกษา identical twins พบว่ามีเพียง 1 ใน 2 คนเท่านั้นที่เป็นโรคนี้ (discordant) อีกทั้งการเกิดโรคนี้ในครอบครัวเดียวกันเป็นไปได้ยากมาก [32-33] ซึ่งเป็นสิ่งที่บ่งชี้ได้ว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันไม่จัดว่าเป็นโรคถ่ายทอดทางพันธุกรรมตามกฎของเมนเดล สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เป็นแฝดจำนวนทั้งหมด 8 ราย พบว่าผู้ป่วยทุกรายที่เป็นแฝดจะเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันเพียง 1 ราย (discordant) โดยที่แฝดอีกคนมีลักษณะที่ปกติ ในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา มีแฝด 1 คู่ ที่มีลักษณะ dizygotic twin และแฝดจำนวน 6 คู่ พบว่ามีหมู่เลือด ABO หมู่เดียวกัน และแฝด 2 คู่ ในกลุ่มนี้พบว่ามีหมู่เลือด minor ที่เหมือนกัน (Dec, MM และ Le a-b-)

สำหรับแฝดทารกคู่สุดท้ายได้พิสูจน์โดยใช้วิธี short tandem repeat (STR) ในพ่อ แม่และแฝด พบว่าแฝดทั้ง 2 รายนี้ น่าจะเป็น monozygotic twin (โอกาสเกิดมากกว่าร้อยละ 99.99) ผลการศึกษาดังกล่าวสนับสนุนแนวคิดที่ว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่เกิดขึ้นหลังคลอดมากกว่าที่จะเป็นโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยตรง [34] แต่ถึงอย่างไรก็ตามปัจจัยทางพันธุกรรมก็อาจจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยเกิดร่วมกับปัจจัยในด้านอื่นๆ

ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในปัจจุบันมี 5 ทฤษฎี มีรายละเอียดดังนี้ [31]

### 1. Defective morphogenesis - genetic factors

เชื่อว่าสาเหตุของการเกิดโรคในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันประเภท foetal form เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการ morphogenesis ของ biliary tree พบประมาณ 10-20% ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จะมีอาการความผิดปกติตั้งแต่กำเนิดอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น splenic abnormalities (asplenia, polysplenia), total หรือ partial situs inversus, mediopositioned liver, intestinal malrotation, atretic inferior vena cava, preduodenal portal vein และ congenital heart defects กลุ่มอาการดังกล่าวเรียกว่า BASM syndrome ซึ่งเกิดจากความผิดปกติในระยะ embryogenesis จากการศึกษาการกลายพันธุ์ในยีนของหนูพบความผิดปกติของ visceral organ symmetry ในโรค polysplenia syndrome [35] และโรคท่อน้ำดีตีบตัน เนื่องจากเกิด recessive insertional mutation บริเวณ proximal ในโครโมโซมคู่ที่ 4 และเกิดการกลายพันธุ์แบบ complete deletion ในยีน Inversion (*INV*) ในหนูทดลองมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของ hepatobiliary system [36-37] จากสาเหตุดังกล่าวทำให้ Schon et al. [38] ได้ทำการวิเคราะห์ ยีน *INV* ในมนุษย์ ผลการศึกษาพบว่าไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *INV* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันรวมถึงในกลุ่ม BASM ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *INV* ไม่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน สำหรับการศึกษาของ Bamford et al. [39] ที่ได้ทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด situs defect พบว่ายีน *CFC1* ซึ่งจะถอดรหัสเป็นโปรตีน CRYPTIC เกิดการกลายพันธุ์ลักษณะ heterozygous mutations ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน 9 รายใน 144 ราย ที่มีลักษณะอาการของโรค polysplenia syndrome เกิดร่วมด้วย ในเวลาถัดมา Jacquemin et al. [40] ได้ทำการศึกษารายการกลายพันธุ์ของยีน *CFC1* ลักษณะ heterozygous gene mutation ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดจำนวน 2 ราย ซึ่งประกอบด้วยผู้ป่วยที่เป็น laterality defect และผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยได้รับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจาก

มารดาที่มีสุขภาพดี จากลักษณะดังกล่าว Jacquemin et al. จึงได้ข้อสรุปว่ายีน *CFC1* มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรค และเมื่อไม่นานมานี้พบการกลายพันธุ์บน exon 5 ของยีน *CFC1* ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนแบบแทนที่ (Ala145Thr) ในเด็ก 5 ราย จากทั้งหมด 10 ราย ในกลุ่ม BASM [11] จึงเป็นไปได้ว่า การกลายพันธุ์ของยีน *CFC1* แบบ heterozygous gene mutation มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด BASM แต่ถึงอย่างไรก็ตามสาเหตุของการเกิดโรคประกอบด้วยหลายปัจจัย ทั้งจากสิ่งแวดล้อมและปัจจัยทางพันธุกรรมที่ช่วยส่งเสริมทำให้เกิดโรค

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ Kohsaka et al. [41] ที่ได้ทำการศึกษาบทบาทของยีน *JAGGED1* ที่แสดงออกใน ductal plate epithelia และยีน *HNF6* สำหรับยีน *JAGGED1* จัดเป็น nuclear transcription factor ใน Notch signaling pathway ซึ่งสำคัญต่อ cell fate ระหว่างการเจริญเติบโตที่แสดงออกในช่วงการพัฒนาของ extrahepatic bile duct และ gall bladder ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 9 ราย จากทั้งหมด 102 ราย มีการกลายพันธุ์ของยีน *JAGGED1* ในลักษณะ missense mutations ซึ่งพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว จะมีอาการที่แยกว่าผู้ป่วยที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว และจากการศึกษาของ Clotman et al. [42] เขาได้ทำการ knockout ยีน *Hnf6* ในหนูพบว่าหนูจะเกิดความผิดปกติของ hepatic artery ต่อมา Campbell et al. [43] พบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีปริมาณ alpha-1-antitrypsin (A1AT) heterozygosity สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ ซึ่งในผู้ป่วยกลุ่มนี้ อัลลีล non-M นั้นมีความสัมพันธ์กับความเป็นไปของโรคอย่างรวดเร็ว และเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยต้องการการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่า A1AT heterozygosity สันนิษฐานความรุนแรงของโรค อย่างไรก็ตามต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันการค้นพบนี้ต่อไป

คุณสมบัติทางจุลกายวิภาคของโรคท่อน้ำดีตีบตันคล้ายคลึงกับความผิดปกติที่เรียกว่า ductal plate malformation syndrome ซึ่งรวมถึง congenital hepatic fibrosis และ Caroli syndrome ซึ่งรายงานในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันประเภท foetal form [44] แสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของ hepatocyte growth factor ในช่วงเวลาที่สำคัญของ mesenchymal หรือ epithelial signalling หรือความผิดปกติของระบบ intracellular adhesion อื่นๆอาจจะมีส่วนร่วมในการก่อโรคท่อน้ำดีตีบตันประเภทนี้ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Hinds et al. [45] ที่ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 9 ราย ซึ่ง 1 รายมีอาการในกลุ่ม BASM และไม่พบลักษณะทางจุลกายวิภาคของ ductal plate malformation ในผู้ป่วยกลุ่มนี้

## 2. Vascular abnormalities

สมมติฐานนี้รายงานโดย Klippel [46] เชื่อว่าระบบ intrahepatic bile duct และ extrahepatic bile duct ได้รับเลือดจากระบบหมุนเวียนเลือดของ hepatic artery โดยเฉพาะ ดังนั้นถ้าหากระบบ hepatic artery ได้รับความเสียหายอาจจะส่งผลทำให้เกิด hepatic arterial ischemia จนเป็นสาเหตุทำให้มีการตีบตันของทางเดินน้ำดีในช่วงหลังจากการผ่าตัดปลูกถ่ายตับ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Pickett et al. [47] ได้ทำการทดลองผูก hepatic vessels ของแกะในระยะ fetus แล้วเป็นผลทำให้แกะมีการคั่งของน้ำดี ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาต่อมาของ Ho et al. ที่สังเกตลักษณะบริเวณ extrahepatic biliary tree ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่าผู้ป่วยมีความผิดปกติของแขนงหลอดเลือด hepatic artery [48] จากการสังเกตดังกล่าวจึงได้อธิบายได้ว่าความผิดปกติของหลอดเลือดมีผลทำให้เกิดความเสียหายขึ้นในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่กระบวนการเกิดยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน และจากการศึกษาที่น่าสนใจของ Clotman et al. [49] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับยีน HNF6 ซึ่งเป็น nuclear transcription factor ที่มีการแสดงออกเพื่อควบคุมในการพัฒนา intrahepatic bile duct และถุงน้ำดี จากการศึกษพบว่า ในหนูที่ knockout ยีน hnf6 หรือหนูที่ไม่มียีน hnf1 $\beta$  จะเป็นสาเหตุของ ductal plate malformation ร่วมกับความผิดปกติของแขนงหลอดเลือดจึงเป็นการยืนยันถึงความเกี่ยวข้องกันระหว่างโครงสร้างของหลอดเลือดกับการพัฒนาของ intrahepatic bile duct

## 3. Viral infection

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะเกิดจากการติดเชื้อหรือได้รับการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อน infectious agent [24] นอกจากนี้จากการศึกษาทำการทดลองฉีดไวรัสเข้าไปในหนูที่เพิ่งเกิดใหม่เพื่อให้เกิดการติดเชื้อ พบว่าหนูสร้าง lesion ที่คล้ายคลึงกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน [50] ในปี ค.ศ. 1974 Benjamin Landing [51] นักพยาธิวิทยาโรคเด็กได้เสนอแนวคิดว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันจัดเป็นโรค idiopathic neonatal hepatitis และโรค choledochal cyst ซึ่งเป็นโรคที่มีผลจากการได้รับการบาดเจ็บที่บริเวณ hepatobiliary tree ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ Benjamin Landing ได้เสนอและคิดค้นคำว่า infantile obstructive cholangiopathies แต่อย่างไรก็ตามสิ่งที่ Benjamin Landing พบว่าสาเหตุของโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะเกี่ยวข้องกับโรคไวรัสตับอักเสบ แต่จากการศึกษาต่อมาพบว่าไวรัสตับอักเสบทั้งชนิด เอ บี และซี ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ทำให้ในปัจจุบันการศึกษหาสาเหตุของการเกิดโรคจึงมุ่งศึกษาที่ไวรัสชนิดอื่น

จากรายงานการศึกษาพบไวรัสหลายชนิดที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน เช่น Reovirus, Rotavirus, Cytomegalovirus [52-53], Human papilloma virus [54-55], Human herpesvirus 6 [53] และ Epstein-Barr virus [56] แต่ไวรัสที่ได้รับความสนใจที่จะศึกษาเป็นอย่างมากในช่วงหลายปีที่ผ่านมา คือ Reovirus, Rotavirus [57] และ Cytomegalovirus

### 3.1 Reovirus

เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิด RNA สายคู่ จัดอยู่ในวงศ์ Reoviridae จากรายงานการศึกษาพบว่าเมื่อมีการติดเชื้อ reovirus ในหนู จะทำให้เกิดการอักเสบบริเวณ intrahepatic bile duct และ extrahepatic bile duct รวมไปถึงการติดเชื้อบริเวณอวัยวะระดับซึ่งลักษณะการอักเสบดังกล่าวคล้ายกับอาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน [58] และรอย lesion ที่เกิดขึ้นจะยังคงแสดงให้เห็นอยู่ภายหลังจากการได้รับเชื้อ แม้ว่าจะไม่สามารถตรวจพบ antigen ของเชื้อ reovirus แล้วก็ตาม จากการศึกษาของ Morecki et al. [59] ในปี ค.ศ. 1982 ในการตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีชนิด IgG ต่อเชื้อ reovirus ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันด้วยวิธี indirect immunofluorescence พบว่าผู้ป่วยจำนวน 9 ราย จากทั้งหมด 15 ราย ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ reovirus และไม่พบแอนติบอดีดังกล่าวในกลุ่มควบคุม ต่อมาผู้วิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ยังได้ค้นพบอีกว่า จากการติดตามผลในทารกที่มีภาวะคั่งของน้ำดีจำนวน 167 ราย ตรวจพบแอนติบอดีของเชื้อ reovirus ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันประมาณร้อยละ 62 พบในกลุ่ม idiopathic neonatal Hepatitis ประมาณร้อยละ 52 และ พบในกลุ่มปกติหรือกลุ่มโรคอื่น ๆ ที่มีภาวะคั่งของน้ำดีที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมน้อยกว่าร้อยละ 12 [60] แต่โรคเหล่านี้ในช่วงต้นการศึกษาจะถูกจำกัดด้วยความจริงที่ว่าส่วนใหญ่ของ IgG ใน 6 เดือนแรกของเด็กจะได้รับมาจากมารดาโดยผ่านทางรก ซึ่งอาจไม่ได้สะท้อนให้เห็นถึงการติดเชื้อ reovirus อย่างแท้จริง นอกจากนี้ Richardson et al. [61] ได้ทำการทดลองแล้วตรวจพบแอนติบอดีชนิด IgM ของเชื้อ reovirus ในทารกที่มีภาวะคั่งของน้ำดี เช่น โรคท่อน้ำดีตีบตัน idiopathic neonatal hepatitis และโรคขาด A1-antitrypsin เป็นต้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการติดเชื้อ reovirus ไม่ได้เกิดเฉพาะในโรคท่อน้ำดีตีบตันเท่านั้น นอกจากนี้จากการศึกษาของ Tyler et al. [62] ตรวจพบสารพันธุกรรม ชิ้นส่วนของยีน L1 ของเชื้อ reovirus ในชิ้นเนื้อตับที่แช่แข็ง จากถุงน้ำดี หรือจาก bile duct remnants ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่ในขณะที่การศึกษาของ Steele et al. [63] ตรวจไม่พบอาร์เอ็นเอของ reovirus ชิ้นส่วน M3 ในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 14 ราย จากข้อมูลข้างต้น แสดงให้เห็นถึงความขัดแย้งกัน และจากการศึกษาต่อมาในประเทศญี่ปุ่น [64] รายงานว่าไม่สามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอของเชื้อ



reovirus ส่วนยีน L1 ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นไปได้ว่าประชากรที่ใช้ศึกษาในญี่ปุ่นอายุเฉลี่ยเท่ากับ 8.7 เดือน ซึ่งต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Tyler et al. [62] ที่ศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีอายุเฉลี่ยเพียง 2.2 เดือน ทำให้การตรวจวัดการติดเชื้อไวรัสอาจไม่ได้ผลเพราะร่างกายสามารถกำจัดเชื้อไวรัสออกจากตับและระบบทางเดินน้ำดีได้ ภายในไม่กี่สัปดาห์ภายหลังจากติดเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองตรวจพบ antigen ของเชื้อ reovirus ที่บริเวณ bile duct remnants ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน [59,65] และตรวจพบ antigen ของเชื้อ reovirus ในลูกลิง rhesus เช่นเดียวกัน [66] นอกจากนี้การศึกษาของ Steele et al. [67] ที่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ reovirus ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 14 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจำนวน 16 ราย โดยใช้วิธี nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลจากการศึกษาพบว่าไม่มีการแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ reovirus ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากผลที่แตกต่างกันอาจเป็นไปได้ว่า เกิดจากวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อ ขั้นตอนในการสกัดอาร์เอ็นเอ และการเลือกใช้ PCR-primer ที่ใช้ในการตรวจสอบยีนของเชื้อ reovirus ที่แตกต่างกัน และถ้าเชื้อ reovirus มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ในการศึกษาเชื้อไวรัสชนิดนี้จะต้องมีวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีและมีความเหมาะสม รวมทั้งต้องมีเกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการศึกษาและจำนวนที่ใช้ในการศึกษาจะต้องมีปริมาณที่มากพอ

สำหรับการศึกษาในสัตว์ทดลอง ในช่วงต้นของปี ค.ศ. 1968 Papadimitriou [68] รายงานพยาธิสภาพของระบบทางเดินน้ำดีในหนูที่ติดเชื้อ reovirus serotype 3 พบเชื้อ reovirus เพิ่มจำนวนภายในเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดีทำให้เกิดการตายของเยื่อบุผิวท่อน้ำดีแบบ necrosis แต่อย่างไรก็ตามหนูที่ติดเชื้อ reovirus ก็ยังไม่สามารถใช้เป็นโมเดลในการศึกษาโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ [69]

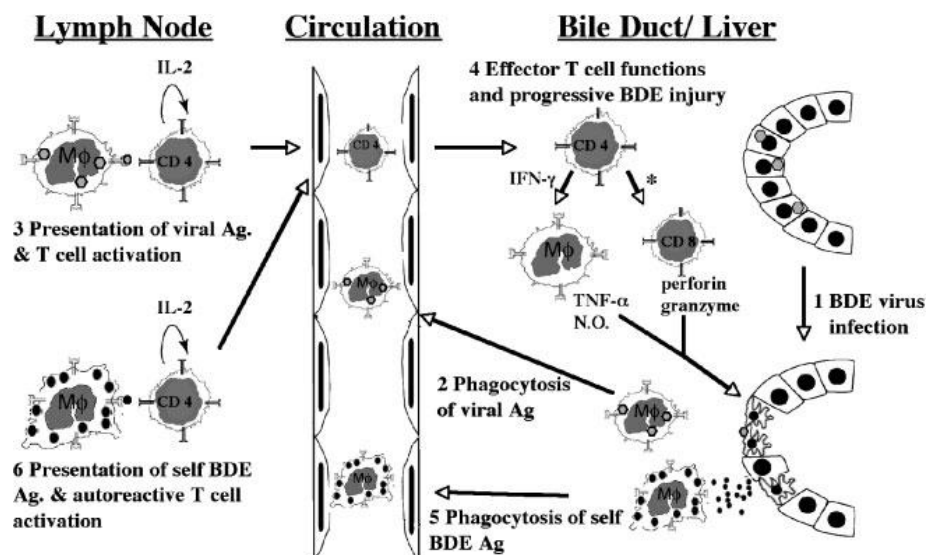
### 3.2 Rotavirus

จากการศึกษาของ Riepenhoff-Talty et al. [70] ได้ทดลองนำเชื้อ rotavirus group A ฉีดเข้าไปในหนูเพื่อให้เกิดการติดเชื้อ ผลการทดลองพบการตีบตันของ extrahepatic bile duct ในหนูและลักษณะของเนื้อเยื่อของหนูคล้ายกับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน หลังจากนั้น Riepenhoff-Talty et al. [71] ได้นำเนื้อเยื่อบริเวณ hepatobiliary จากผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมาวิเคราะห์หาเชื้อ rotavirus group C ด้วยวิธี RT-PCR ผลการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

จำนวน 10 ราย จากทั้งหมด 18 ราย มีการแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ rotavirus group C และ ไม่พบการแสดงออกของ mRNA ของเชื้อ rotavirus group C ในกลุ่มควบคุม

### 3.3 Cytomegalovirus (CMV)

CMV เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ จัดอยู่ในวงศ์ Herpesviridae จาก รายงานการศึกษาเชื่อว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส CMV [72-73] มีรายงานการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันส่วนใหญ่จะมีการติดเชื้อไวรัส CMV [74] จากการศึกษาในประเทศสวีเดน โดย Fischler et al. [75] ตรวจพบแอนติบอดี ชนิด IgM ของเชื้อไวรัส CMV ในมารดาของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน และพบสารดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส CMV ในเนื้อเยื่อตับจำนวนครึ่งหนึ่งของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 มีรายงานการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส CMV ประมาณร้อยละ 30 ถึง 40 ในเนื้อเยื่อตับแข็งของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันแต่ไม่พบในกลุ่มควบคุม [56,76] แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองมีความขัดแย้งกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ไม่สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส CMV ในเนื้อเยื่อได้ [77] สำหรับบทบาทของไวรัส CMV กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันยังคงต้องได้รับการศึกษาต่อไป แต่ปัจจุบันยังไม่มียาทางการแพทย์ที่ใช้หนูที่ติดเชื้อ CMV มาใช้เป็นโมเดลในการศึกษาโรคท่อน้ำดีตีบตัน



รูปภาพที่ 5 ไวรัส และ T cell-mediated autoreactivity ต่อการทำลายของ เยื่อบุผิวของทางเดินน้ำดีในโรคท่อน้ำดีตีบตัน [18]

#### 4. Toxin exposure

จากการศึกษาของ Harper et al. [78] ที่ได้ทำการสังเกตการเกิด outbreak ของโรคท่อน้ำดีตีบตันในลูกแกะและลูกวัว ที่มีภาวะดีซ่าน ถ่ายเป็นสีขาวย และตายภายในช่วงอายุ 4 สัปดาห์แรกของชีวิต โดยพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันจะเกี่ยวข้องกับการได้รับสารพิษหรือเชื้อราจากสิ่งแวดล้อมในช่วงแรกเริ่มของการตั้งครรรภ์ ซึ่งสารพิษหรือเชื้อต่างๆจะมีผลทำให้ชั้นของ bile duct epithelia ที่อยู่ในชั้น submucosa ได้รับบาดเจ็บแล้วส่งผลทำให้เกิดการทำลายบริเวณ extrahepatic bile ducts แต่อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีสารพิษจากสิ่งแวดล้อมใดที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในมนุษย์นอกจากเชื้อไวรัส

#### 5. Immune mechanisms

โรคท่อน้ำดีตีบตันอาจเป็นผลมาจากกระบวนการ primary inflammatory แล้วส่งผลให้เกิดการตีบตันของทางเดินน้ำดี เนื่องจากมีรายงานพบ portal tract mononuclear cellแทรกซึมอยู่ในเนื้อตับของผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากการศึกษาของ Bill et al. [79] ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่าง intramural mononuclear inflammatory cell กับการตายแบบ necrosis ของเซลล์เยื่อบุผิวของ bile duct remnant ซึ่งได้รับการยืนยันจาก Ohya et al. [80] โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของ intrahepatic bile duct เกี่ยวข้องกับเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แทรกซึมไปในเซลล์เยื่อบุผิวของท่อน้ำดี

สำหรับกลไกที่เซลล์ในระบบ immune เหนี่ยวนาให้เกิดการทำลายท่อน้ำดียังไม่ทราบแน่ชัด โดย Schreiber และ Kleinman [81] ได้อธิบายว่าหากมีการติดเชื้อไวรัสหรือได้รับสารพิษที่บริเวณ biliary epithelium จะมีผลทำให้เกิดการแสดงออกของแอนติเจนที่บริเวณ bile duct epithelium ซึ่งลักษณะดังกล่าวเกิดจากการตอบสนองของ macrophage ต่อการทำงานของ T lymphocyte เป็นสาเหตุที่ทำให้บริเวณ epithelial ได้รับความเสียหาย การพบระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ innate immunity และ acquired immunity ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันตั้งแต่แรกคลอดเพื่อตอบสนองต่อแอนติเจนบริเวณ bile duct epithelium ทำให้สามารถอธิบายได้ว่าเหตุใดโรคท่อน้ำดีตีบตันจึงเกิดภายใน 3 เดือนแรกของทารกแรกเกิด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง immune regulatory protein ที่ควบคุมเกี่ยวกับ susceptibility ของระบบภูมิคุ้มกันในโรคท่อน้ำดีตีบตันและในโรคตับที่มีสาเหตุเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรค autoimmune hepatitis, primary sclerosing cholangitis และ primary biliary cirrhosis พบว่าโรคเหล่านี้มี

ความสัมพันธ์กับ HLA antigen ที่จำเพาะ โดยโมเลกุล HLA จะมีหน้าที่แสดง peptide antigen ให้กับ unprimed T lymphocyte

จากการศึกษาของ Silviara et al. [82] ได้พบว่าสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในผู้ป่วยที่เป็นชาวยุโรปมีความสัมพันธ์กับ allotype HLA-B12, haplotype A9-B5 และ haplotype A28 -B35 โดยพบในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันประมาณร้อยละ 49 และในกลุ่มควบคุมประมาณร้อยละ 23 แต่นักวิจัยกลุ่มอื่นก็ไม่ได้สนใจที่จะศึกษาถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว [83-84] ต่อมานักวิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ได้รายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ของระบบ HLA กับโรคท่อน้ำดีตีบตัน [85] สำหรับผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่เป็นชาวอียิปต์พบความสัมพันธ์ในลักษณะ haplotype HLA-B8 และ haplotype HLA-DR3 [86] แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานสนับสนุนถึงความสัมพันธ์ของ HLA กับโรคท่อน้ำดีตีบตันอย่างชัดเจน ทำให้นักวิจัยสนใจโมเลกุลอื่นในระบบ immune ที่เกี่ยวข้องกับโรคตับที่มีสาเหตุเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษารายงานของ Donaldson et al. [85] ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีน HLA, Interleukin-1 และ interleukin-10 กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน เมื่อศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 101 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมจำนวน 134 ราย แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาจีโนมของระบบภูมิคุ้มกัน MHC class I และ MHC class II ยังเป็นการศึกษาที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากมียีนที่เกี่ยวข้องกับ HLA มากกว่า 100 ยีนในระบบจีโนมของมนุษย์ เป็นไปได้ว่าอาจจะพบความสัมพันธ์ของ HLA ตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

จากการศึกษาของ Davenport et al. [87] โดยทำ Immunohistochemistry พบ CD4 T lymphocytes และ natural killer (CD56+) cells มากมายในตับและ extrahepatic bile ducts ของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน Bezerra et al. [88] ใช้เทคนิค DNA microarray ตรวจการแสดงออกของยีนใน proinflammatory immunity ในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่า มีการเพิ่มการแสดงออกในยีนที่สร้าง T-helper 1 cytokine เช่น interferon gamma และลดการแสดงออกในยีนที่สร้าง T-helper 2 cytokine ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทของ T-helper 1 cytokine กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน

นอกจากนี้เชื่อว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันอาจเกิดจากกระบวนการ autoimmune mediated process มีรายงานการศึกษาตรวจพบ anti neutrophil cytoplasmic antibodies [89] และ alpha-enolase antibodies ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน [90] สิ่งที่น่าสนใจคือเมื่อปัจจัยเสี่ยงในเรื่องของ autoimmunity มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ซึ่งทำให้สามารถทำนายความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคในแต่ละบุคคลได้โดย

อาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ autoimmune disorder ได้โดยมีรายงานการศึกษาของ Bernal et al. [91] ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (polymorphism) ของยีน transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) พบว่าลักษณะ polymorphism ในยีน TGF- $\beta$  มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการเกิดโรค primary sclerosing cholangitis ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาใน 2 ปีถัดมาของ Mitchell et al. [92] ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TGF- $\beta$  ในกลุ่มผู้ป่วยโรค primary sclerosing cholangitis ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Bernal et al. [91] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Donaldson et al. [93] พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน interleukin-1 family มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรค primary biliary cirrhosis และจากการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมบริเวณ promotor ของยีน TGF- $\beta$ , IL-1 (IL1B และ IL1RN) และ IL-10 ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันชาวอังกฤษจำนวน 101 ราย และกลุ่มควบคุมจำนวน 96 ราย ผลการศึกษาพบว่าลักษณะจีโนไทป์ อัลลีล และ haplotype block ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม ผลจากการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นว่า ลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TGF- $\beta$  และ interleukin family อาจจะไม่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยทาง autoimmune ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทำให้นักวิจัยเชื่อว่าน่าจะมี immunoregulatory gene ตัวอื่นที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคทำให้นักวิจัยเชื่อว่าน่าจะมี

โรคท่อน้ำดีตีบเกิดจากการอักเสบของทางเดินน้ำดีทั้ง intrahepatic duct และ extrahepatic duct ทำให้ร่างกายตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้น โดยพบ CD4+ T lymphocytes และ macrophages แทรกซึมไปในตับ และพบ soluble cellular adhesion molecules สูงขึ้นเมื่อได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ ทำให้ Narayanaswamy et al. [94] ทำการตรวจวัด inflammatory component ต่างๆ ประกอบด้วย adhesion molecules (sICAM-1 และ sVCAM-1), proinflammatory mediator cytokines (T helper 1[IL-2, interferongamma] และ T helper 2 [IL-4, IL-10]) และ macrophage markers (TNF- $\alpha$  และ IL-18) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 21 รายหลังได้รับการผ่าตัดแบบคาไซ ผลจากการศึกษาคือ ไม่พบความแตกต่างของระดับ cytokines ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมที่เป็นเด็กปกติที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคตับ แต่พบระดับของ IL-2 และ IL-10 ในกลุ่มผู้ป่วยสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นโรค cholestatic disease อื่นๆ และพบ sICAM-1 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทั้งกลุ่มเด็กปกติที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคตับและกลุ่มควบคุมที่เป็นโรค cholestatic disease อื่นๆ นอกจากนี้พบว่าผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันหลังจากการได้รับการ

ผ่าตัดคาไซเป็นเวลา 6 เดือนจะพบ adhesion molecules และ plasma cytokines สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้น IL-10 จากผลการศึกษาข้างต้น ระดับของ sICAM-1 น่าจะเป็นตัวบ่งบอกถึงความรุนแรงของโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ดีที่สุด พบว่าที่ระดับ cut off level เท่ากับ 1,779 ng/mL ที่ตรวจวัดหลังจากได้รับการผ่าตัด 1 เดือน จะทำนายได้ว่าจะได้รับการผ่าตัดปลูกถ่ายเปลี่ยนตับภายใน 1 ปีแรกของชีวิต โดยมีค่า sensitivity ร้อยละ 87 และ ค่า specificity ร้อยละ 92 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ปริมาณ sICAM-1 เป็นตัวบ่งบอกความเป็นไปของโรคและผลของการรักษาได้ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานพบว่า ICAM-1 มีการแสดงออกมากขึ้นในเนื้อเยื่อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน [95] นอกจากนี้ยังมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างอายุของผู้ป่วยที่ได้รับการเข้าผ่าตัดกับปริมาณ sICAM-1 ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน [96]

ตารางที่ 2 ปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน [97]

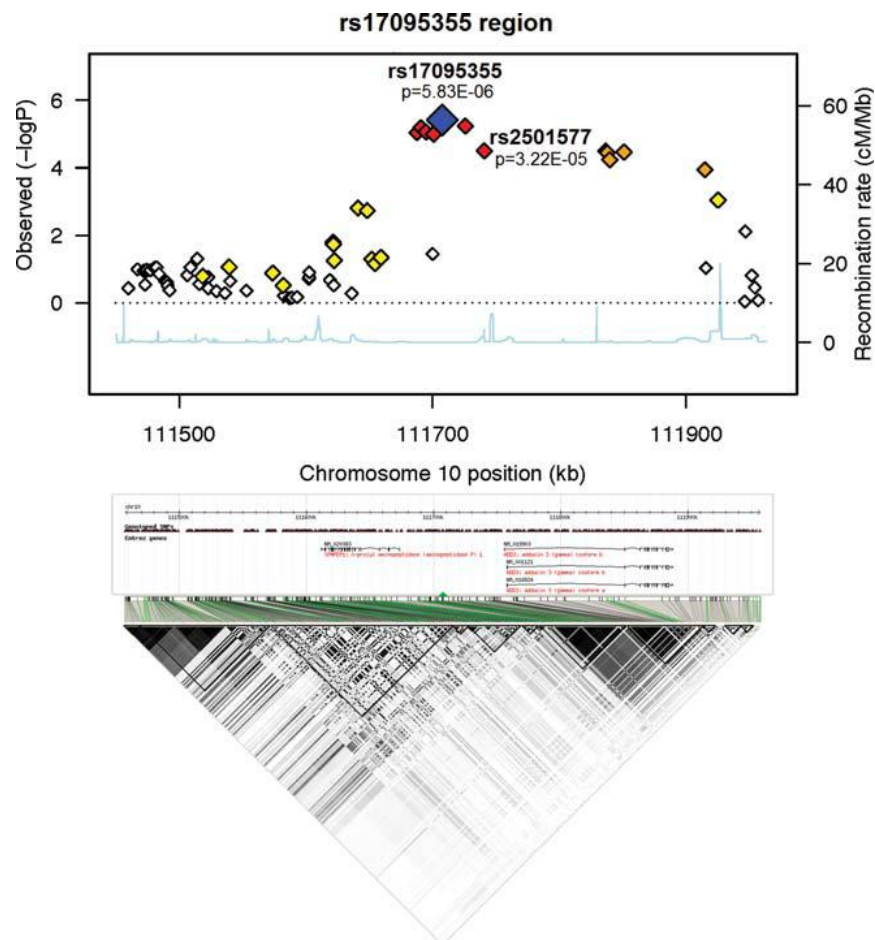
<p><b>ก. ปัจจัยทางพันธุกรรม</b></p> <p><u>Genetic alteration</u></p> <p>CFC1 mutation</p> <p>ICAM G241R polymorphism</p> <p>NFkappaB/c mutation</p> <p>VEGF A gene polymorphism</p> <p><u>Numerical chromosomal abnormalities</u></p> <p>Trisomies of chromosomes 10q, 17, 18, and 21</p>	<p><b>ข. ปัจจัยอื่นๆ</b></p> <p><u>Structural anomalies</u></p> <p>BASM</p> <p>Choledocopancreatic junction anomalies</p> <p>Ductal plate malformation</p> <p>Hepatic arterial anomalies</p> <p><u>Metabolic abnormalities</u></p> <p>Abnormal bile acids</p> <p>L-proline</p> <p><u>Immunologic abnormalities</u></p> <p>Maternal serologic auto-immunity</p> <p><u>Immunogenetic alterations</u></p> <p>Oligoclonal expansion of T lymphocytes</p> <p>NK lymphocytes</p> <p>Biliary aberrant MHC class expression</p> <p>Microchimerism</p> <p><u>Maternal diabetes</u></p> <p>Gestational diabetes</p> <p><u>Maternal age</u></p>
<p><b>ค. ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม</b></p> <p><u>Drugs used during gestation</u></p> <p>Amphetamines</p> <p>Alcohol</p> <p><u>Maternal/neonatal infections</u></p> <p>Cytomegalovirus</p> <p>Reovirus type 3</p> <p>Papillomavirus</p> <p>Rotavirus</p> <p><u>Phytotoxins, mycotoxins</u></p> <p>Industrial toxins</p> <p>DAPM</p>	

## เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### การศึกษาความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับจีโนมในโรคท่อน้ำดีตีบตัน (Genome-wide association study)

จากการศึกษา Genome-wide association study (GWAS) ซึ่งเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนที่มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน Garcia-Barcelo et al. [14] ที่ได้ทำการศึกษาเพื่อดูลักษณะทางพันธุกรรมของตำแหน่ง SNP ที่มีจำนวนประมาณ 500,000 ตำแหน่ง ในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นประชากรชาวจีนที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 200 ราย และกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 481 ราย และผลจากการศึกษา GWAS ทำให้พบว่ามีตำแหน่ง SNPs 10 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากลักษณะทางพันธุกรรมของ SNPs ทั้ง 10 ตำแหน่ง Garcia-Barcelo et al. ได้พบว่า rs17095355 ที่อยู่ในส่วนของโครโมโซมที่ตำแหน่ง 10q24 ซึ่งเป็นที่อยู่ของยีน *XPNPEP1* เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติ rs17095355 เป็น SNP ที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตันอย่างชัดเจน ( $P = 0.00024$ ) นอกจากนั้น Garcia-Barcelo et al. ได้ทำการวิเคราะห์เพื่อเป็นการยืนยันโดยทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี meta-analysis จากการติดตามผลของ GWAS แล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าข้อมูลที่ได้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยได้ค่า  $P = 0.00000694$  สำหรับ SNP ที่ตำแหน่งอื่นๆ Garcia-Barcelo et al. ได้ให้ความสนใจ SNP ที่ตำแหน่ง rs2501577 โดยที่เป็น SNP ที่อยู่บนโครโมโซม 10q24.2 ซึ่งเป็นโครโมโซมเดียวกันกับ rs17095355 ถึงแม้ว่าบริเวณที่ตำแหน่งนี้จะเป็นบริเวณที่อยู่ของระหว่างยีน *XPNPEP1* และยีน *ADD3* ซึ่งยีนทั้งสองชนิดนี้เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการควบคุมหน้าที่การทำงานของตับด้วยกันทั้งสิ้น Garcia-Barcelo et al. ได้ประเมินว่าที่ตำแหน่ง rs17095355 บริเวณที่เป็น intergenic region มีความเป็นไปได้ว่าที่บริเวณนี้จะเป็นส่วนของ flanking gene ที่มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตันในการไปควบคุมหน้าที่การทำงานของยีนโดยอาศัยความสัมพันธ์ของ SNP allele ซึ่ง Garcia-Barcelo et al. พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมแบบ T allele มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน





**รูปภาพที่ 6** ตำแหน่งข้อมูลทางจีโนมบนโครโมโซม 10q24.2 ที่เกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน [14]

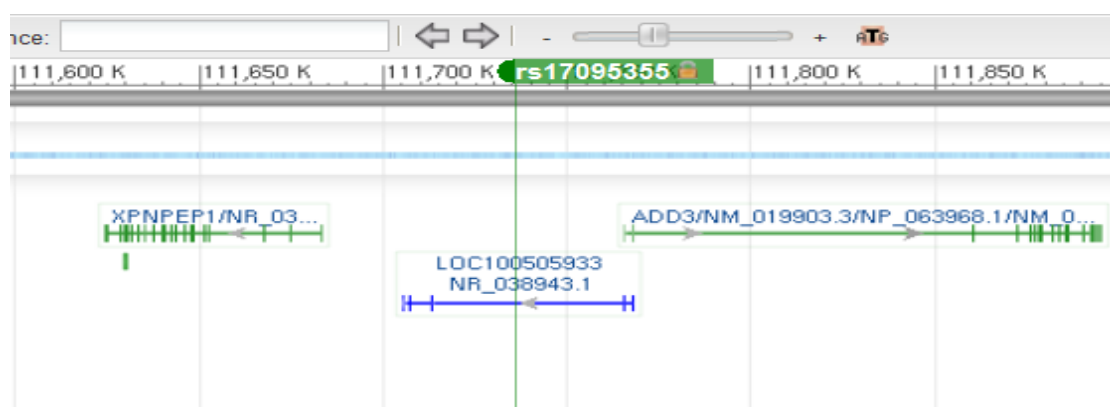
ยีน adducin3 (*ADD3*) เป็นยีนที่อยู่ในตระกูลเดียวกันกับโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับ membrane skeletal ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการรวมตัวของ spectrin กับ actin ในเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยที่ adducin เป็นตัวเสริมความแข็งแรงของรอยต่อระหว่าง spectrin กับ actin นอกจากนี้ยังพบในบริเวณที่มีการเชื่อมกันระหว่างเซลล์สองชนิดในเนื้อเยื่อผิวหนังรวมทั้งพบที่หน้าในการย่อยสลายเนื้อเยื่อบริเวณที่ต่างกันในอวัยวะระดับและท่อน้ำดีได้อีกด้วย ซึ่ง *ADD3* มีการแสดงออกใน epithelia ของตับและทางเดินน้ำดี เป็นที่น่าสังเกตว่าการแสดงออกของยีน *ADD3* พบว่ามีการแสดงออกของยีนนี้ในตับระยะพีตัส (fetal liver) มากกว่าในตับผู้ใหญ่ [15] จากการศึกษพบว่า *ADD3* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการยึดหดตัวของ bile canalicular membrane ซึ่งกระบวนการนี้ถูกควบคุมโดยอาศัยการทำงานระหว่าง actin กับ myosin [98]

การเพิ่มการแสดงออกของ  $\alpha$ -smooth-muscle actin มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของการเกิดพังผืดสะสมตับในผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน [99]

ยีน X-prolyl aminopeptidase 1 (*XPNPEP1*) พบว่ามีการแสดงออกใน epithelial cell ในระบบ hepatobiliary [16] ทำหน้าที่สร้างโปรตีน soluble X-prolyl aminopeptidase P หรือ soluble aminopeptidase P (APP1) APP1 เป็น ubiquitous enzyme ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของ bradykinin (BK) และ substance P (SP) [17] สำหรับหน้าที่ของ BK เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilator) และความยืดหยุ่นของหลอดเลือดฝอย ซึ่งการแสดงออกของ BK ถูกควบคุมโดยตรงจาก bile acid nuclear receptor, farnesoid X receptor (FXR) เป็นที่ทราบกันดีว่าทั้ง bile acid nuclear receptor และ farnesoid X receptor (FXR) มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมและการหลั่งของน้ำดี นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการอักเสบด้วย [100-101]

substance P (SP) มีบทบาทในการเป็น neurotransmitter และเป็นตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบซึ่งทั้งหมดมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการหลั่งของน้ำดีและควบคุมสมดุลของการสร้างและหลั่งน้ำดีให้มีความเหมาะสม นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณกระแสประสาทไปยังตับ

จากข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับบทบาทหน้าที่ของยีน *ADD3* และยีน *XPNPEP1* ทำให้ Garcia-Barcelo et al. เชื่อว่ายีนทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมของกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้น



([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=17095355#map](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=17095355#map))

รูปภาพที่ 7 แสดงตำแหน่งของ SNP rs17095355 บนโครโมโซมที่ 10

## การศึกษาปัจจัยทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

ปัจจุบันสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันยังคงไม่ทราบแน่ชัด โรคดังกล่าวอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง ทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอกหรือปัจจัยที่เกิดจากพันธุกรรม จากการค้นคว้าได้พบข้อมูลการศึกษาเพื่อหาสาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน พบว่ามีการทดลองจำนวนมากที่ได้ทำการศึกษาหาปัจจัยทางพันธุกรรมกับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

กระบวนการอักเสบเป็นสมมติฐานหนึ่งที่สำคัญกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน เนื่องจากการอักเสบเป็นผลทำให้เกิดการตีบตันของท่อน้ำดี ส่งผลให้เกิดพังผืดขึ้นในตับ (fibrosis) และพัฒนาไปสู่ภาวะตับแข็ง (cirrhosis) ซึ่งเป็นผลแทรกซ้อนที่ตามมาภายหลังของโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากตัวอย่างการศึกษาของ Arikan et al. [9] ที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน ICAM-1 กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน เนื่องจาก ICAM-1 เป็น intercellular adhesion molecules ที่มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการอักเสบ และมีความสำคัญต่อการกระตุ้น T cell ในระบบภูมิคุ้มกันโดย ICAM-1 เป็น ligand ที่จะจับกับ CD-18 integrin receptors lymphocyte-associated antigen-1 (LFA-1)(CD-11a/CD18) และ macrophage-1 (MAC-1)(CD-11b/CD18) และช่วยเสริมให้มีการจับกันระหว่าง CD2 บนผิว T cell กับ LFA-3 บนผิว APC ได้แน่นขึ้น LFA-1 มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการอักเสบ เนื่องจาก monoclonal antibody ต่อ LFA-1 สามารถยับยั้งการกระตุ้นเซลล์ได้ทั้ง native และ activated T cell จากการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้นของโมเลกุล ICAM-1 ในซีรัมของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งการเพิ่มขึ้นของโมเลกุล ICAM-1 อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน เนื่องจาก ICAM-1 สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และกระบวนการอักเสบซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน ดังนั้น Arikan et al. จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมยีน ICAM-1 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 19 ราย โรค Chronic liver disease จำนวน 38 ราย และกลุ่มควบคุม คือ ผู้ที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงจำนวน 123 ราย ผลจากการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมของยีน ICAM-1 ที่ตำแหน่ง G242R โดยเฉพาะความถี่ของ A allele ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันสูงกว่าในกลุ่มโรค chronic liver disease และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการศึกษาครั้งนี้ Arikan et al. สรุปว่า A allele ของยีน ICAM-1 มีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน แต่อย่างไรก็ตามสาเหตุของการเกิดโรคก็ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากปัจจัยทางด้านพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวไม่สามารถสรุปได้ว่าสาเหตุของโรคเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว

นอกจากนี้ Arikani et al. [10] ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน MIF กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน สำหรับยีน macrophage migration inhibitory factor (MIF) เป็น pleiotropic lymphocyte และ macrophage cytokine ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบ innate immunity [102] และพบว่าการแสดงออกของ MIF gene เพิ่มขึ้นในโรคที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการตอบสนองต่อการอักเสบด้วย Arikani et al. ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน MIF ที่บริเวณ 173G/C ที่อยู่ในส่วนของ promoter ของยีน โดยทำการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 18 ราย เปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรค Chronic liver disease จำนวน 36 ราย และกลุ่มควบคุมจำนวน 103 ราย ผลจากการศึกษาพบว่า C allele อาจมีความสัมพันธ์ในการป้องกันการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันได้เนื่องจากไม่พบ genotype CC ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยที่ C allele อาจไปเพิ่มการแสดงออกของยีน MIF ในการกระตุ้น protein 4 ที่อยู่ในส่วนของ promoter ถึงแม้ว่าในการศึกษารั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ C allele ระหว่างผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของยีน MIF กับโรคท่อน้ำดีตีบตัน มีบทบาทสำคัญต่อกลไกการทำงานของ steroid หลังจากที่ได้รับการรักษาโดยการผ่าตัดแบบคาไซ นอกจากนี้มีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า MIF เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) และการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับ cell differentiation ซึ่งการพัฒนาของ vascular ischemia เป็นสมมติฐานหนึ่งของสาเหตุของการเกิดโรค โดยสรุปแล้วการเพิ่มขึ้นของ MIF polymorphism ในผู้ป่วย BA อาจทำให้การสร้างหลอดเลือดในท่อน้ำดีเกิดความบกพร่องได้

จากการศึกษา Lee et al. [8] ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ vascular endothelial growth factor gene (VEGF) กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันในได้หวันจำนวน 45 ราย เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมจำนวน 160 ราย และศึกษาในครอบครัวจำนวน 40 ครอบครัว จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน VEGF ที่ตำแหน่ง + 936 C/T พบว่า C allele เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน

## Single nucleotide polymorphism (SNP)

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) คือ ความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละบุคคลซึ่งมีลำดับเบสต่างกันเพียงตำแหน่งเดียว ณ ตำแหน่งเดียวกันของยีนบนโครโมโซม เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อยโดยมีการประมาณว่าจะพบ SNP ในทุกๆหนึ่งพันเบส แต่จำนวน SNP ทั้งหมดยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัด คาดว่าน่าจะอยู่ในช่วง 3-4 ล้านเบสตลอดจีโนมมนุษย์ SNP เป็นความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง โดย 2 ใน 3 ของ SNP ที่พบจะเป็นการเปลี่ยนจากเบสไซโตซีน (cytosine หรือ C) ไปเป็นเบสไทมีน (thymine หรือ T) ความแตกต่างของลำดับเบสที่พบแม้เพียง 1 ตำแหน่งนี้อาจส่งผลถึงการแสดงออกของยีน ปริมาณและการทำงานของโปรตีนหรืออาจไม่ส่งผลกระทบใดๆเลย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ SNP บนสายดีเอ็นเอ

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

### 1. SNP ที่เกิดขึ้นในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส (non-coding SNP) ได้แก่

- Regulatory SNP (rSNP) เป็น SNP ที่มีผลในการควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งบ่อยครั้งเกิดที่บริเวณ promoter region ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในการสร้างโปรตีนให้มากขึ้นหรือลดลง
- SNP ที่เกิดบริเวณรอยต่อระหว่าง exon และ intron ที่เรียกว่า splicing site ทำให้การตัดต่อ RNA ผิดไปจากเดิมส่งผลให้จำนวนกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์ผิดไป
- Intronic SNP (iSNP) เป็น SNP ที่เกิดบริเวณส่วนของ intron จึงมักไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

### 2. SNP ที่เกิดขึ้นในส่วนที่มีการถอดรหัส (coding SNP) ได้แก่

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

- Synonymous SNP คือ SNP ที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบส 3 ตัวที่ใช้ในการแปลรหัสกรดอะมิโนแล้วไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน

## หลักการพื้นฐานของเทคนิค PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือเรียกอีกชื่อว่า In vitro enzymatic gene amplification เป็นขบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งขบวนการนี้เลียนแบบขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 ปฏิกริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรรูกลูกโซ่ในแต่ละรอบ (Cycle) ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

### ขั้นตอนที่ 1 การแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (Denaturation)

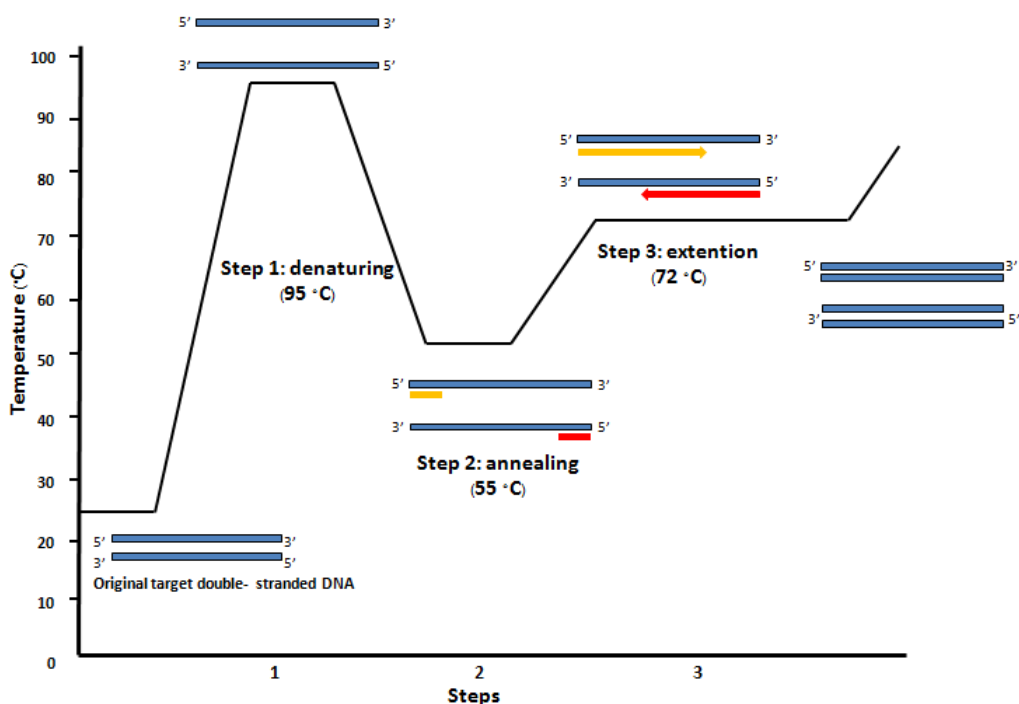
โดยเมื่อเริ่มต้น ดีเอ็นเอแม่แบบจะอยู่ในลักษณะที่เป็นเกลียวคู่ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส จะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ทำให้เส้นดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว โดยขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ คือ ในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์เฮลิเคส (Helicase) ช่วยในการแยกสายและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

### ขั้นตอนที่ 2 การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (Annealing)

เมื่อแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันแล้วจะลดอุณหภูมิลงเหลือ 40-62 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ขนาดสั้นประมาณ 15-25 เบส ที่เรียกว่า ไพรเมอร์ (Primer) เข้ามาจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่สามารที่จะเริ่มจากศูนย์ได้เนื่องจากเอนไซม์ DNA polymerase ต้องการปลาย -OH ทางด้าน 3' เพื่อนำนิวคลีโอไทด์ตัวต่อมาต่อ ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์ที่มีชื่อว่า ไพรเมส (Primase) เป็นตัวสร้างอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ขึ้น

### ขั้นตอนที่ 3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (Extension)

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ ใช้อุณหภูมิประมาณ 68-72 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่ใช้จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน หลักการทำงานของ PCR ดังแสดงในรูปภาพที่ 8



รูปภาพที่ 8 หลักการทำงานของ PCR ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลายรอบของ PCR ดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆรอบ ลักษณะทวีคูณเป็น  $2^n$  เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา

### องค์ประกอบที่สำคัญในการทำ PCR

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template)
2. เอนไซม์ DNA Polymerase ชนิดทนความร้อน (Taq DNA polymerase)
3. Oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่
4. Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP
5. บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ DNA polymerase (PCR Buffer) บัฟเฟอร์เป็นสารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ เช่น Tris-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub> แมกนีเซียมมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งช่วยเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ และช่วยให้เกิดการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างจำเพาะได้ซึ่งจะทำให้ได้ PCR product ที่มีความจำเพาะขึ้น

6. เครื่องมือที่สำคัญในการทำ PCR ได้แก่ Thermal cycler หรือ PCR machine

### การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

Oligonucleotide primer คือ นิวคลีโอไทด์สังเคราะห์สายสั้น โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 15-25 bp และเป็นสิ่งที่กำหนดความจำเพาะของการทำ PCR โดยต้องออกแบบไพรเมอร์อย่างน้อย 1 คู่ โดยที่ไพรเมอร์หนึ่งออกแบบจากบริเวณปลาย 5' ของดีเอ็นเอเป้าหมาย และอีกไพรเมอร์หนึ่งออกแบบที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้าง primer จำเพาะ โดยอ้างอิงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งที่ต้องการเพิ่มจำนวนที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

หลักการทั่วไปของการออกแบบไพรเมอร์มีดังต่อไปนี้

1. ความยาวของไพรเมอร์ควรมีความยาวประมาณ 15-25 bp ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
2. ไพรเมอร์ควรมีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย (target sequence) บนสาย DNA ต้นแบบ โดยเฉพาะด้านปลาย 3' ของ primer ควรมีลักษณะเป็นคู่สมกับ DNA ต้นแบบ และลำดับนิวคลีโอไทด์ควรมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวบน DNA ต้นแบบด้วย เพื่อหลีกเลี่ยงการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนที่ไม่ต้องการ (non-specific product)
3. หลีกเลี่ยงลำดับนิวคลีโอไทด์บนไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกันเอง (primer dimer)
4. ค่า %GC content ที่เหมาะสมควรมีค่าประมาณ 50-60 % และไม่ควรรออกแบบไพรเมอร์ที่มีค่า GC content สูงเกินไป
5. ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ควรมีค่าใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรมีค่าอยู่ระหว่าง 55-75°C ไม่ควรมีค่าสูงหรือต่ำเกินไป ปัจจัยที่มีผลต่อค่า Tm คือ ส่วนประกอบของเบสแต่ละชนิดและความยาวของไพรเมอร์ สำหรับไพรเมอร์ที่มีความยาวน้อยกว่า 14 นิวคลีโอไทด์ สามารถคำนวณ Tm ได้จากสูตร 1 และ ไพรเมอร์ที่มีความยาวมากกว่า 14 นิวคลีโอไทด์ ควรเลือกใช้สูตร 2

$$\text{สูตรที่ 1: } Tm = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G+C)$$

$$\text{สูตรที่ 2: } Tm = 64.9^{\circ}\text{C} + 41^{\circ}\text{C} \times ((G+C)-16.4)/N$$

N คือ จำนวนนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์



การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ PCR ใช้โปรแกรม Oligos และ FastPCR ช่วยในการออกแบบ ทั้งสองเป็นโปรแกรมที่ใช้ในการกลับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (reverse complement) เพื่อเตรียม reverse primer และคำนวณค่า Tm ของไพรเมอร์ที่ออกแบบ รวมถึงใช้ตรวจสอบ primer dimer ในเบื้องต้น

### ปัญหาและวิธีการแก้ไขปัญหาของการทำปฏิกิริยา PCR

- เมื่อมีการปนเปื้อนของแถบดีเอ็นเออื่นนั้น อาจเกิดจากการจับกันอย่างไม่จำเพาะระหว่างไพรเมอร์กับ non-specific ซึ่งอาจต้องทำการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาช่วง annealing ให้สูงขึ้นในช่วงการทำ PCR รอบแรกๆ จากนั้นจึงลดอุณหภูมิลงหรือเปลี่ยนมาใช้ hot-start enzyme
- กรณีเกิด primer-dimer อาจแก้ไขโดยออกแบบ primer ใหม่แล้วใช้โปรแกรมช่วยตรวจสอบ primer-dimer
- ดีเอ็นเอแม่แบบอาจเพิ่มปริมาณได้ยาก อาจแก้ไขโดยเปลี่ยนเป็นเทคนิค PCR แบบ nested PCR หรือ touchdown PCR
- อาจเกิดจากการปนเปื้อนดีเอ็นเออื่นระหว่างการทำ PCR ซึ่งอาจเปลี่ยนมาใช้ aerosol-resistant tip หรือ UDG

### **การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR**

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ดังนั้นจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis

#### **Agarose gel electrophoresis**

Agarose เป็นสายพอลิเมอร์ ของ D-galactose และ 3,6-anhydro-L-galactose เมื่อเตรียมแผ่นเจล โดยต้มสารละลาย agarose ในบัฟเฟอร์แล้วเทลงในถาดเตรียมเพื่อให้แข็งตัว เมื่อเย็นจะได้เจลที่มีรูพรุนใหญ่ จึงใช้แยกสารที่มีขนาดใหญ่ เช่น กรดนิวคลีอิก ซึ่งขนาดรูพรุนขึ้นกับความเข้มข้นของ agarose (เมื่อความเข้มข้นสูง รูพรุนจะเล็กลง) เมื่อให้สนามไฟฟ้าที่

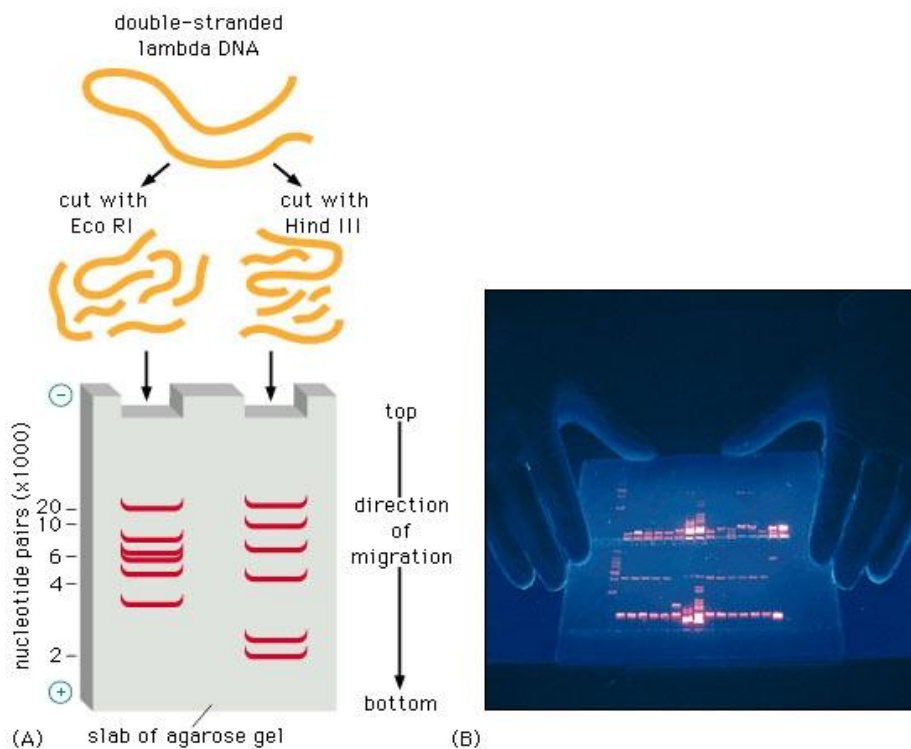
neutral pH โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกจะมีประจุลบ และเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกด้วยความเร็วที่ขึ้นกับขนาดโมเลกุล (molecular size) และโครงสร้าง (conformation)

การตรวจดู product ด้วยวิธี electrophoresis จะได้ออกมาเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอและนำไปเทียบกับ DNA marker ก็จะทำให้รู้ขนาดของดีเอ็นเอ และยังสามารถดูว่ามีการแตกของเส้น DNA หรือไม่ (fragmentation) ซึ่งถ้ามีการแตกของเส้นดีเอ็นเอก็จะมีขนาดเล็กลงหรือแถบของดีเอ็นเอที่ได้อาจไม่คมชัด สำหรับการเกิด smear ซึ่งหมายถึงมีดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกันเกาะกันเป็นปื้นทั้งหมดเกิดจากคุณภาพของดีเอ็นเอไม่ดี สำหรับดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีคือควรได้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคมชัด

#### ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่าน gel ของดีเอ็นเอ

- ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ โมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก
- รูปร่างของดีเอ็นเอ โดยลำดับของความเร็วในการเคลื่อนที่ของแต่ละรูปแบบของกรดนิวคลีอิก พบว่า supercoiled DNA > linear double stranded DNA > circular DNA
- ความเข้มข้นของสารตัวกลาง โดย agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อย รูพรุนจะมีขนาดเล็ก ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า ดังนั้นจะแยกดีเอ็นเอขนาดเล็กได้ดี ขณะที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นต่ำ จะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลมาก ดังนั้นจะแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ได้ชัดเจนดี
- ชนิดของ electrophoresis buffer โดย Tris-acetate EDTA buffer (TAE) มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ (buffering capacity) ทำให้เมื่อทำ electrophoresis นานๆจะหมดความเป็นบัฟเฟอร์ ดังนั้นจะเหมาะกับการ run เวลาสั้นๆ ส่วน Tris-borate EDTA (TBE) จะมีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์สูง ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าการทำในบัฟเฟอร์ TAE ประมาณ 2 เท่า ทำให้แถบของดีเอ็นเอแยกได้ชัดเจนมากกว่าใช้บัฟเฟอร์ TAE สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ควรมี pH ที่เหมาะสมประมาณ 7.5-8.0 และมี EDTA เพื่อยับยั้ง activity ของ DNase
- ความต่างศักย์ไฟฟ้า ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการแยกขนาดดีเอ็นเอควรต่ำกว่า 5 V/cm
- Loading dye มักใช้เป็น 5-10% glycerol หรือ sucrose จะทำให้ดีเอ็นเอไม่ฟุ้งกระจาย สำหรับสีที่ใช้ส่วนใหญ่นิยมใช้ 0.025% bromphenol blue

- สารละลายที่ใช้ย้อมดีเอ็นเอคือ ethidium bromide ที่มีความเข้มข้น 1.0  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่ง



สามารถทำให้แถบของดีเอ็นเอเรืองแสงภายใต้แสง UV

[http://www.atom.rmutphysics.com/charud/oldnews/0/286/15/12/DNA/DNA/agarose\\_gel\\_electrophoresis.htm](http://www.atom.rmutphysics.com/charud/oldnews/0/286/15/12/DNA/DNA/agarose_gel_electrophoresis.htm)

### รูปภาพที่ 9 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR ด้วย Agarose gel electrophoresis

#### การย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide

สารละลาย ethidium bromide (EtBr) เป็นสารที่นำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการย้อมดีเอ็นเอ ซึ่งเป็น fluorescent compound (aromatic cation) ที่จับกับดีเอ็นเอสายคู่ โดยสามารถเข้าไปแทรกตัว (intercalate) อยู่ระหว่างชั้นของคู่เบสในสายของดีเอ็นเอ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตแล้วจะทำให้เห็นดีเอ็นเอเป็นแถบสีส้มแดง (fluorescent radiation) ลักษณะการใช้โดยทั่วไปจะใช้ในการย้อม agarose gel electrophoresis โดยการนำเจลจุ่มลงในสารละลาย แล้วทำการล้างสารละลายส่วนเกินออก (destaining) โดยการจุ่มลงในน้ำเปล่า หรือในบางงานวิจัยอาจนำไปผสมกับ loading dye แล้วผสมกับ sample เลย แล้วทำการไหลลง agarose gel หรืออาจจะผสมลงใน agarose gel แล้วนำไปส่องกับ UV ได้ทันทีโดยไม่ต้องทำการ destain ซึ่งสองวิธีหลังจะทำให้ภาชนะหรือเครื่องมือที่ใช้ในการทำ

electrophoresis เกิดการปนเปื้อนได้จึงควรทำแยกกับชุดการทดลองอื่นๆ ข้อควรระวัง คือ ethidium bromide จัดอยู่ในสารก่อมะเร็ง (carcinogen) เพราะตัว ethidium bromide จะเข้าไปแทรกระหว่างสารดีเอ็นเอทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และถ้ามีความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดการระคายเคืองตามผิวหนัง ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาย้อมชนิดอื่นๆที่มีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

ในปัจจุบันจึงนิยมย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต ( $\text{AgNO}_3$ ) แต่กระบวนการย้อมใช้เวลานาน ค่อนข้างซับซ้อน และต้องการความชำนาญมากกว่าการย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide โดยดีเอ็นเอจะถูกเชื่อมโยงข้าม (crosslink) กับเนื้อ gel ด้วยกรดแอสซิติค แล้วจึงย้อมด้วย  $\text{AgNO}_3$  โดยในสภาพที่เป็นต่าง ดีเอ็นเอจะจับกับ  $\text{Ag}^+$  แล้วจึงทำปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ด้วย formaldehyde เกิดเป็นโลหะ Ag ขึ้น ทำให้ดีเอ็นเอย้อมติดสีน้ำตาลเข้มซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การย้อมด้วย  $\text{AgNO}_3$  ยังมีความไวมากกว่าการย้อมด้วย ethidium bromide ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ๆ ได้ และโดยทั่วไป polyacrylamide gel จะสามารถแยกขนาดที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้ดีกว่า agarose gel โดยสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันน้อยถึง 1 นิวคลีโอไทด์ได้ นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการใช้ระบบ capillary แทนการใช้แผ่น gel เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกขนาดของดีเอ็นเอ โดยการทำงานของ capillary gel electrophoresis system จะคล้ายคลึงกับ electrophoresis ทั่วไป แต่ต่างกันเพียงแค่งดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านหลอด capillary ขนาดเพียงไม่กี่ไมโครเมตรที่มีเจลและ electrolyte อยู่ทำให้สามารถแยกโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยออกจากกัน ในระยะทางและเวลาน้อยกว่าการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วย high resolution agarose gel และ polyacrylamide gel ซึ่งในระบบ capillary gel electrophoresis นั้น การย้อมสีดีเอ็นเอและการตรวจวัดการติดสีจะทำในตัวเครื่อง และจะให้ข้อมูลออกมาเป็น electropherogram หรือภาพ digital เหมือนเจลทั่วไปก็ได้ [103-104]

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### ประชากร

##### 1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

1.1 กลุ่มที่ทำการศึกษา คือกลุ่มเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ได้เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และมีอายุไม่เกิน 18 ปี

##### เกณฑ์ที่ใช้เลือกกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

- ผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิก หลังได้รับการวินิจฉัยแน่นอนว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและได้รับการผ่าตัด Kasai operation (hepatic portojejunostomy)
- การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ตรวจการทำงานของตับในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจะใช้ค่าของ total bilirubin (TB) เป็นเกณฑ์แบ่งผู้ป่วยออกเป็นสองกลุ่มคือ no jaundice (TB < 2.0 mg/dL) และ persistent jaundice (TB ≥ 2.0 mg/dL)

1.2 กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มเด็กที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ไม่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันซึ่งมีอายุไม่เกิน 18 ปี

##### 2. ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้กลุ่มประชากรจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มและเป็นอิสระต่อกัน และจากการศึกษา pilot study ในการกระจายตัวของยีนที่สนใจ จึงนำมาสู่การคำนวณหาจำนวนของกลุ่มตัวอย่างจากการประมาณค่าเฉลี่ย โดยใช้สูตรดังนี้

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

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

กำหนด  $n$  = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

$Z$  = ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

$e$  = relative acceptable error ซึ่งยอมรับที่ค่าความผิดพลาดไม่เกิน 10%

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

ดังนั้นขนาดตัวอย่างในกลุ่มเท่ากับอย่างน้อย 97 ราย จึงจะประมาณค่าร้อยละ โดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 10 แต่เพื่อความแน่นอนและถูกต้องของข้อมูล และป้องกันการสูญหายของตัวอย่าง เนื่องจากการเก็บตัวอย่างจะทำให้ก็ต่อเมื่อผู้ป่วยมาเข้ารับการรักษาเท่านั้น จึงต้องทำการเก็บตัวอย่างให้มากที่สุดเท่าที่สามารถเก็บได้ คือประมาณ 100 ราย และตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมจำนวน 100 ราย โดยที่อายุและเพศใกล้เคียงกัน (age and sex-match)

### **เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย**

#### เครื่องมือ (Materials)

Aluminum foil (Rainbow metal company, USA)  
 Barrier Tip: 200 µl (BioScience, USA)  
 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)  
 Parafilm (American Nation Can, USA)  
 Pipette Tip: 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Axygen, USA)  
 PCR tubes 0.2 ml  
 Microtubes 1.5 ml

#### วัสดุอุปกรณ์ (Equipments)

Autoclave (Sanyo, Japan)  
 Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P20 (2-20 µl) (Socorex,Switzerland), P200 (20-200 µl) (Eppendorf, Germany), P1000 (100-1000 µl) (Eppendorf, Germany)  
 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)  
 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)  
 Cuvett: 5 µl, 10 µl (MiralBio, Japan)  
 Freezer -20°C (Sanyo, Japan)  
 Freezer -70°C (Forma Scientific, USA)  
 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)  
 Incubator (Mettler, Germany)  
 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)  
 PCR Mastercycler personal (Eppendorf, Germany)

Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)

Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)

Refrigerator 4°C (Misubishi, Japan)

UV transilluminator (Fotodyne, USA)

Vortex mixer (Scientific Industry, USA)

Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)

### สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (Reagent)

#### 1. สารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง

Lymphocyte separation medium (WISENT Inc., Canada)

0.1% Phosphate Buffered Saline (PBS) (Bio basic inc., NY, USA)

Red Cell Lysis Buffer (RCLB)

- Tris-HCl (Sigma, Singapore)

- Sodium chloride (Promega, CA, USA)

- Magnesium chloride (Merck, Germany)

#### 2. สารเคมีสำหรับการสกัด DNA (DNA extraction)

Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Pharmacia biotech, Sweden)

Absolute ethanol (Merck, Germany)

Chloroform (Sigma, MO, USA)

Glycogen (USB, OH, USA)

Isoamyl alcohol (BDH, UK)

Phenol (Amresco, OH, USA)

Proteinase K (5PRIME, Germany)

Tris-HCl (USB, Hong Kong)

Sodium acetate (Sigma, Singapore)

#### 3. สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR

5Prime PerfectTaq Plus MasterMix Kit (5PRIME, Germany)

#### 4. สารเคมีสำหรับการทำ Agarose gel electrophoresis

GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas, MD, USA)

Agarose, Low EEO, Molecular Biology grade (Reserch Organics, OH, USA)

1X Tris borate buffer (1XTBE)

Boric acid (Fisher scientific, UK)

Tris base (Promega, USA)

EDTA (Amersham life science, UK)

Ethidium Bromide (SIGMA, Singapore)

#### 5. สารเคมีสำหรับทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

Agarose GelExtract Mini Kits (5PRIME, Germany)

### การดำเนินการวิจัย

#### ประชากรศึกษา (Population)

การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทั้งหมดที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน รวมถึงกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเด็กสุขภาพดีไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันซึ่งได้รับคำแนะนำถึงวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และลงลายมือชื่อยินยอมให้ทำการศึกษาเป็นลายลักษณ์อักษร

ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ใช้ในการศึกษานี้จำนวน 124 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วยเพศชายจำนวน 63 ราย และเพศหญิงจำนวน 61 ราย มีอายุเฉลี่ยเท่ากับ  $8.91 \pm 5.89$  ปี ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันและเข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันทุกรายจะต้องผ่านการรักษาโดยการผ่าตัดคาสัย (Kasai operation) และมาติดตามการรักษาเป็นประจำที่คลินิกหน่วยโรคระบบทางเดินอาหาร ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ แผนกผู้ป่วยนอกตึก ภปร. ชั้น 9 ทุกวันพุธ เวลา 9.00-12.00 น. สำหรับกลุ่มควบคุมจำนวน 114 ราย ประกอบด้วยเพศชายจำนวน 59 ราย และเพศหญิงจำนวน 55 ราย มีอายุเฉลี่ยเท่ากับ  $13.02 \pm 2.18$  ปี โดยจะทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มนี้ นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมภายในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยอาศัยระดับ total bilirubin (TB) เป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยที่มี



อาการตัวเหลือง (Jaundice) มีระดับของ TB มากกว่าหรือเท่ากับ 2 mg/dL และกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง (No jaundice) มีระดับของ TB น้อยกว่า 2 mg/dL

### การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection)

การเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและเด็กที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง ไม่มีประวัติป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยทำการเจาะเก็บเลือดจาก peripheral venous blood ด้วยหลอดมีสารกันเลือดแข็งตัว EDTA และ clotted blood tube ปริมาตร 3-5 ml จากนั้นทำการปั่นแยกเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และดูดแยกส่วนของพลาสมา และเก็บ buffy coat ที่มีลักษณะขาวขุ่นอยู่ชั้นกลางของหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งตัว EDTA หรือดูดแยกส่วนซีรัมซึ่งอยู่ส่วนบนของหลอด clotted blood tube แล้วนำไปใส่หลอด microcentrifuge tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อสกัดดีเอ็นเอ และทำการทดสอบลักษณะทางพันธุกรรมต่อไป

### การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol-Chloroform Extraction โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียม tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่ Lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) 400 ไมโครลิตร กับ 20 mg/mL proteinase K 10 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใส่สารละลายตัวอย่างที่ละลายอยู่ในสารละลาย PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร
2. นำไป vortex แล้วบ่มที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
3. เติม Phenol 250 ไมโครลิตร และ Chloroform : Isoamyl alcohol (49:1) 250 ไมโครลิตร
4. นำไป vortex และ Centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 20 นาที
5. ดูดส่วนใสข้างบนใส่ลงใน microtube ใหม่ที่ประกอบด้วยสารละลายผสมของ glycogen 4 ไมโครลิตร absolute ethanol 800 ไมโครลิตร และ 2M sodium acetate 40 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
6. นำไปบ่มที่  $-70^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. นำไป Centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 g ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที
8. ทิ้ง supernatant แล้วล้างตะกอนด้วย 70% EtOH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
9. นำไป Centrifuge ด้วยความเร็ว 13,000 g ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที
10. ทิ้ง supernatant แล้วปั่นตกอย่างรวดเร็ว และดูดสารละลายทิ้ง

11. ทำให้ตะกอนแห้งด้วย Vacuum 10 นาที และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร
12. ทำการเก็บสารละลาย DNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาสภาพของ DNA เอาไว้

### การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

ทำการออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ โดยเริ่มแรกต้องทำการโหลดข้อมูลนิวคลีโอไทด์ บริเวณที่ต้องการ amplify ด้วยเทคนิค PCR มาจากฐานข้อมูล Genbank เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ โดยออกแบบไพรเมอร์ ให้มีขนาดประมาณ 15-25 bp มีค่า CG content ประมาณ 50-60% และค่า melting temperature (Tm) ของไพรเมอร์ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 55-75 °C ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสองเส้น (Forward primer และ Reverse primer) ควรมีค่า Tm เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน โดยค่า Tm มีสูตรในการคำนวณดังนี้  $Tm = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G+C)$

```
TCATTTTCCT AGATTTATGT ACTAATTTAT CTTGGATTTG ATCATGATGA AGCTGTGGTC
CTTAAGCTCC AAGAATGGGG AAGAACAAGT CTTTAAGCAC ATGATCTTAT TTCCCATAGG
GATTTGACCC AAGCACTGTA TGAGCCATCT CTCCTTTACA CTTCCAGGGA TTTAATGGAG
ATAATCAGTA AATGGGGATA
Y
GTGGCTAAGA AGGTAAAAGG TGAATCTGA AAGGAATTCA GAATCCCAGG TCAGCAGTTC
TAAAGTTCCT ACATATTCAG ATCAGAGTAC TATTTCATAA GCAAATGAGG GAGTAAAAAT
TTACTTTGCT TATCCTACCC TATACAAATA GCTTATACTG TATAAGCCAT AGTGGAAAGT
ACTAATATAG TAGCCCCTGG AATTACTGAC AAAAAATCCAA CTCCTGCCTC ACCAAATGAT
TTGCTGAATG ACATTGGGGC AAAGTATTTA ACATGTTTTG TCTCTGTTTC TTACATTTTA
AAACAAGGTA GATTATCCCA GCTTTCACCT GTAATGGTTG TTCTCTACCT GGAATGTACA
GCCAAATCAT GGAGAGAGCT TTTTAGAAAA TCAGATTCCC TAGGCCCCAC CCAATCTCT
ACTGAGTCAA AATTTGTCCT TTCCAAAAGC TCTACACATG ATTCTGATTT GCATCTTTAA
GAAGCACCAA ATATTATGGA
```

รูปภาพที่ 10 ตำแหน่ง SNP rs17095355 C/T (Y) และตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าจับ

ทำการตรวจสอบการจับกันของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo 1999-2001 v.9.1  
ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 11

**รูปภาพที่ 11** ผลตรวจสอบการจับกันของไพรเมอร์ rs17095355F และ rs17095355R

นอกจากนี้ทำการตรวจสอบความจำเพาะของการจับของไพรเมอร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล โดยทำการ Blast ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง Forward primer และ Reverse primer กับฐานข้อมูล จากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> ได้ผลดังแสดงในรูปภาพที่ 12 และ 13 ตามลำดับ

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<b>Transcripts</b>							
<a href="#">NM_033427.2</a>	Homo sapiens cortactin binding protein 2 (CTTNBP2), mRNA	<a href="#">30.2</a>	30.2	75%	14	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>
<a href="#">NM_001130028.1</a>	Homo sapiens CDC-like kinase 3 (CLK3), transcript variant 1, mRNA	<a href="#">28.2</a>	28.2	70%	57	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>
<a href="#">NM_003992.4</a>	Homo sapiens CDC-like kinase 3 (CLK3), transcript variant 2, mRNA	<a href="#">28.2</a>	28.2	70%	57	100%	<a href="#">U</a> <a href="#">E</a> <a href="#">G</a> <a href="#">M</a>
<b>Genomic sequences</b> <a href="#">[show first]</a>							
<a href="#">NT_030059.13</a>	Homo sapiens chromosome 10 genomic contig, GRCh37.p5 Primary A	<a href="#">40.1</a>	2038	100%	0.015	100%	
<a href="#">NW_001838006.2</a>	Homo sapiens chromosome 10 genomic contig, alternate assembly H	<a href="#">40.1</a>	731	100%	0.015	100%	
<a href="#">NT_011387.8</a>	Homo sapiens chromosome 20 genomic contig, GRCh37.p5 Primary A	<a href="#">34.2</a>	687	100%	0.93	100%	
<a href="#">NT_024862.14</a>	Homo sapiens chromosome 17 genomic contig, GRCh37.p5 Primary A	<a href="#">34.2</a>	82.8	85%	0.93	100%	
<a href="#">NT_033968.6</a>	Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, GRCh37.p5 Primary A	<a href="#">34.2</a>	442	100%	0.93	100%	
<a href="#">NT_025741.15</a>	Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, GRCh37.p5 Primary A	<a href="#">34.2</a>	1535	100%	0.93	100%	
<a href="#">NT_022171.15</a>	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37.p5 Primary A	<a href="#">34.2</a>	357	100%	0.93	100%	
<a href="#">NW_001839346.1</a>	Homo sapiens unplaced genomic contig, alternate assembly HuRef S	<a href="#">34.2</a>	34.2	85%	0.93	100%	
<a href="#">NW_001838662.2</a>	Homo sapiens chromosome 20 genomic contig, alternate assembly H	<a href="#">34.2</a>	34.2	85%	0.93	100%	
<a href="#">NW_001838659.2</a>	Homo sapiens chromosome 20 genomic contig, alternate assembly H	<a href="#">34.2</a>	111	100%	0.93	100%	
<a href="#">NW_001838429.2</a>	Homo sapiens chromosome 17 genomic contig, alternate assembly H	<a href="#">34.2</a>	82.8	85%	0.93	100%	
<a href="#">NW_001839017.1</a>	Homo sapiens chromosome 7 genomic contig, alternate assembly H	<a href="#">34.2</a>	193	90%	0.93	100%	
<a href="#">NW_001838991.2</a>	Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, alternate assembly H	<a href="#">34.2</a>	179	95%	0.93	100%	
<a href="#">NW_001838818.2</a>	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, alternate assembly H	<a href="#">34.2</a>	212	100%	0.93	100%	

**รูปภาพที่ 12** ผลการ Blast ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Forward primer (rs17095355F) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<b>Transcripts</b>							
<a href="#">NM_001005333.1</a>	Homo sapiens melanoma antigen family D, 1 (MAGED1), transcript v	<a href="#">30.2</a>	30.2	75%	14	100%	<a href="#">UEGM</a>
<a href="#">NM_006986.3</a>	Homo sapiens melanoma antigen family D, 1 (MAGED1), transcript v	<a href="#">30.2</a>	30.2	75%	14	100%	<a href="#">UEGM</a>
<a href="#">NM_001005332.1</a>	Homo sapiens melanoma antigen family D, 1 (MAGED1), transcript v	<a href="#">30.2</a>	30.2	75%	14	100%	<a href="#">UEGM</a>
<a href="#">NM_025176.4</a>	Homo sapiens ninein-like (NINL), mRNA	<a href="#">30.2</a>	30.2	95%	14	95%	<a href="#">UEGM</a>
<b>Genomic sequences</b> <a href="#">[show first]</a>							
<a href="#">NT_030059.13</a>	Homo sapiens chromosome 10 genomic contig, GRCh37.p5 Primary A	<a href="#">40.1</a>	3421	100%	0.015	100%	
<a href="#">NW_001838006.2</a>	Homo sapiens chromosome 10 genomic contig, alternate assembly F	<a href="#">40.1</a>	1225	100%	0.015	100%	
<a href="#">NT_006051.18</a>	Homo sapiens chromosome 4 genomic contig, GRCh37.p5 Primary As	<a href="#">26.2</a>	814	100%	0.23	100%	
<a href="#">NW_001838897.1</a>	Homo sapiens chromosome 4 genomic contig, alternate assembly Hi	<a href="#">26.2</a>	236	95%	0.23	100%	
<a href="#">NT_010498.15</a>	Homo sapiens chromosome 16 genomic contig, GRCh37.p5 Primary A	<a href="#">32.2</a>	1937	100%	3.7	100%	
<a href="#">NT_025741.15</a>	Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, GRCh37.p5 Primary As	<a href="#">32.2</a>	2987	100%	3.7	100%	
<a href="#">NT_022853.15</a>	Homo sapiens chromosome 4 genomic contig, GRCh37.p5 Primary As	<a href="#">32.2</a>	183	100%	3.7	100%	
<a href="#">NT_005612.16</a>	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, GRCh37.p5 Primary As	<a href="#">32.2</a>	3563	100%	3.7	100%	
<a href="#">NT_005403.17</a>	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37.p5 Primary As	<a href="#">32.2</a>	2916	100%	3.7	100%	
<a href="#">NT_022184.15</a>	Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37.p5 Primary As	<a href="#">32.2</a>	3075	100%	3.7	100%	
<a href="#">NT_032977.9</a>	Homo sapiens chromosome 1 genomic contig, GRCh37.p5 Primary As	<a href="#">32.2</a>	3738	100%	3.7	100%	
<a href="#">NW_001838290.1</a>	Homo sapiens chromosome 16 genomic contig, alternate assembly F	<a href="#">32.2</a>	628	100%	3.7	100%	
<a href="#">NW_001838992.2</a>	Homo sapiens chromosome 6 genomic contig, alternate assembly Hi	<a href="#">32.2</a>	256	100%	3.7	100%	
<a href="#">NW_001838913.1</a>	Homo sapiens chromosome 4 genomic contig, alternate assembly Hi	<a href="#">32.2</a>	183	100%	3.7	100%	

รูปภาพที่ 13 ผลการ Blast ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Reverse primer (rs17095355R) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

การเพิ่มปริมาณ DNA อย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR

ตารางที่ 3 ข้อมูลของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR และขนาดผลิตภัณฑ์

Primer type (name)	Sequence (5'→3')	Tm (°C)	Product size (bp)
Forward primer (rs17095355F)	GGA TTT GAC CCA AGC ACT GT	57.3	140
Reverse primer (rs17095355R)	ACT GCT GAC CTG GGA TTC TG	59.4	

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ปิเปตสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมส่วนผสมสำหรับการทำ PCR ลงใน microtube ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาตรของสารต่างๆที่ใช้สำหรับการทำ PCR

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Distilled water (DW)	9.5
2x Mastermix	12.5
10 $\mu$ M Forward primer	0.5
10 $\mu$ M Reverse primer	0.5
DNA template	2
<b>Total volume</b>	<b>25</b>

2. จากนั้นนำ microtube ที่ใส่ส่วนผสมสารละลายทั้งหมดใส่ลงเครื่อง Thermal cycler PCR (Eppendorf Mastercycler personal) ในสภาวะอุณหภูมิ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR

PCR cycle	อุณหภูมิ ( $^{\circ}$ C)	เวลา	
Pre-denaturing	94	5 นาที	} ทำซ้ำ 35 รอบ
Denaturing	94	30 วินาที	
Annealing	57	30 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Post-extension	72	7 นาที	
Hold	25	5 นาที	

การตรวจหาผลผลิตจากการทำ PCR โดยใช้ agarose gel electrophoresis

- นำ PCR product ที่ได้ไปผสมกับ loading dye
- นำไป run ใน 2.0% agarose gel electrophoresis เป็นเวลานานประมาณ 30 นาที
- นำ gel ไปย้อม ethidium bromide ประมาณ 30 นาที
- นำ gel ที่ย้อมเรียบร้อยแล้วนั้นไปส่องภายใต้แสง UV จากเครื่อง ultraviolet

transilluminator (Gel DOC) และขนาดของ PCR product จะทราบจาก 100 bp DNA ladder ซึ่งเป็น marker โดยเลือกตัดเจลของแถบ PCR product ขนาดที่ต้องการ

### การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล

สกัด PCR product จากเจล ที่ตัดออกมาด้วย Agarose GelExtract Mini Kits (5PRIME) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ใส่บัฟเฟอร์ PS ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อเจลหนัก 100 มิลลิกรัม
2. บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสจนกว่าเจลละลายจนหมด ใช้เวลาประมาณ 10 นาที โดยกลับหลอดหลายๆครั้งทุกๆ 2-3 นาทีระหว่างบ่ม เพื่อช่วยให้เจลละลายดีขึ้น
3. ใส่ PCRExtract Mini Column CB2 ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตรที่ให้มา
4. ปิเปิดบัฟเฟอร์ BL ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
5. ทิ้งของเหลวที่ผ่าน column ได้ แล้วใส่ column ลงใน Collection tube เดิม
6. ปิเปิดสารละลายดีเอ็นเอ (ในข้อ 2) ลงใน PCRExtract Mini Column CB2 (ในข้อ 5) แล้วเซนทริฟิวจ์ด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
7. ทิ้งของเหลวที่ผ่าน column ได้ แล้วใส่ column ลงใน Collection tube เดิม
8. ปิเปิดบัฟเฟอร์ PW ปริมาตร 700 ไมโครลิตรลงใน PCRExtract Mini Column CB2 และ centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
9. ทิ้งของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ได้ แล้วใส่คอลัมน์ลงใน Collection tube เดิม
10. ปิเปิดบัฟเฟอร์ PW ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงใน PCRExtract Mini Column CB2 และ centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
11. ทิ้งของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ได้ และปั่นแห้งโดย centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อเอา wash buffer ออก
12. ระเหยเอทานอลออกไป โดยทิ้งของเหลวที่ผ่าน column ได้ และทำเมมเบรนให้แห้ง โดยเปิดฝาไว้ เป็นเวลาหลายนาที เนื่องจากเอทานอลใน wash buffer อาจส่งผลต่อปฏิกิริยาในขั้นตอน sequencing ต่อไป
13. เปลี่ยน column ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่สะอาด แล้วใส่บัฟเฟอร์ PEB ลงตรงกลางคอลัมน์ อย่าให้ปลาย tip โดน column

14. Elute ดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ โดย centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
15. เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratory SDN BHD ประเทศมาเลเซีย อ่านผลที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas Lite หรือ Bioedit เพื่อทำการตรวจสอบและแก้ไขผลที่ได้ต่อไป โดยวิเคราะห์หารูปแบบของยีน (genotype) ตำแหน่ง SNP (rs17095355) โดยนำลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่เคยมีรายงานใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

### การเก็บรวบรวมข้อมูล

ในการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้จากการทดลองผู้วิจัยได้ทำการเก็บข้อมูลโดยการจดลงสมุดบันทึกและลงข้อมูลต่างๆในคอมพิวเตอร์โดยได้จัดทำตารางการเก็บข้อมูลแยกรายละเอียดของแต่ละบุคคลโดยบันทึกรูปแบบของสารพันธุกรรมที่ได้ลงใน case record form และบันทึกข้อมูลลงในคอมพิวเตอร์

Case Record Form: สำหรับบันทึก Code Number, อายุ, เพศ, ลักษณะทาง Genotype

Code number	Age	Gender	Genotype		
			CC	CT	TT

### การตรวจสอบข้อมูล

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการทำ DNA sequencing จะถูกวิเคราะห์รูปแบบของยีน (genotype) ในตำแหน่งที่สนใจ โดยใช้โปรแกรมต่อไปนี้

- Basic local alignment search tool (BLAST) ทำการเปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank โดยดำเนินการผ่านเว็บไซต์ของ NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

- Chromas และ Bioedit เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing โดยพิจารณาจากผลกราฟ chromatogram

### การวิเคราะห์ข้อมูล

- 1.) วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของรูปแบบของยีน (genotype) ระหว่างผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน กับกลุ่มควบคุมหรือผู้ที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยใช้โปรแกรมทางสถิติคำนวณ โดยเลือกใช้ค่าสถิติ chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p-value < 0.05) และหาความเสี่ยงในการทำให้เกิดโรคโดยใช้ค่าสถิติ Odd Ratio (OR)
- 2.) วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะทางพันธุกรรมโดยอาศัยหลักสมดุลของ Hardy-Weinberg equilibrium ด้วย Markov chain random-walk algorithm



## บทที่ 4

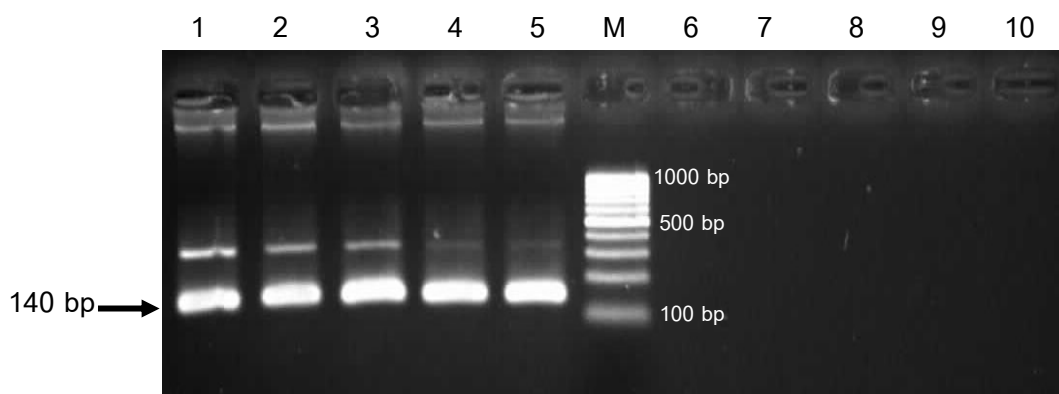
### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### ผลการวิเคราะห์

##### 1. ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR

หลังจากสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol-chloroform extraction แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ (rs17095355F และ rs17095355R) เพื่อวิเคราะห์จีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่ง rs17095355 ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 140 bp

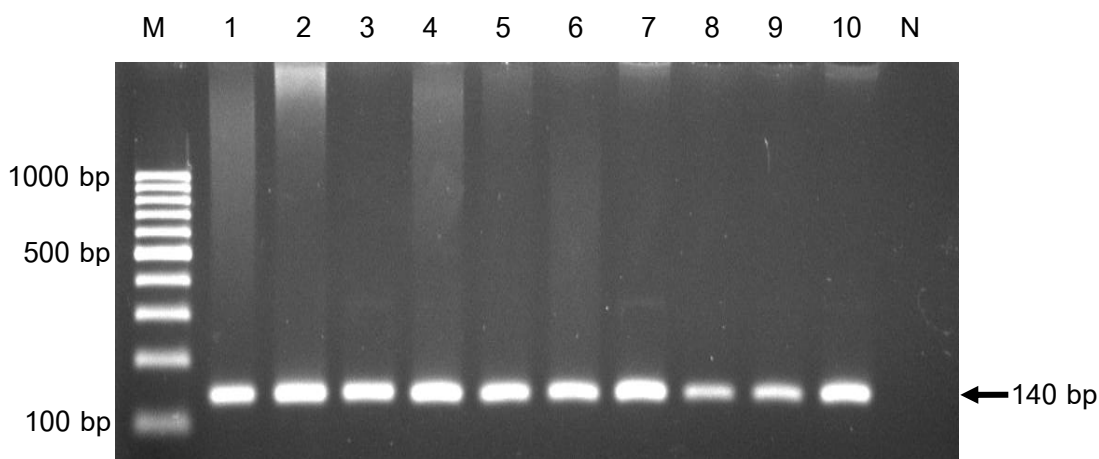
โดยในขั้นตอนแรก ทำการหา melting temperature (T<sub>m</sub>) ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำ PCR โดย vary อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ผลการทดลองแสดงในรูปภาพที่ 14



**รูปภาพที่ 14** ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ T<sub>m</sub> ต่างกัน (แถว M : DNA ladder ขนาด 100 bp, แถวที่ 1 : T<sub>m</sub> = 49.1°C, แถวที่ 2 : T<sub>m</sub> = 50.3°C, แถวที่ 3 : T<sub>m</sub> = 53.3°C, แถวที่ 4 : T<sub>m</sub> = 55.5°C, แถวที่ 5 : T<sub>m</sub> = 57.0°C, แถวที่ 6-10 : negative controls ของการทำแต่ละ T<sub>m</sub> ตามลำดับ)

จากรูปภาพที่ 14 เมื่อใช้ T<sub>m</sub> ต่ำ (49.1°C, 50.3°C และ 53.3°C) จะพบ non-specific band ขึ้น และเมื่อใช้ T<sub>m</sub> สูงขึ้น (55.5°C และ 57.0°C) จะลด non specific band เมื่อได้ T<sub>m</sub> ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทำ PCR แล้ว จึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของสารตัวอย่างอื่นๆ อย่างจำเพาะด้วยวิธี PCR เช่นเดิม โดยเลือกใช้ T<sub>m</sub> ที่ 57.0 °C ดังแสดงใน

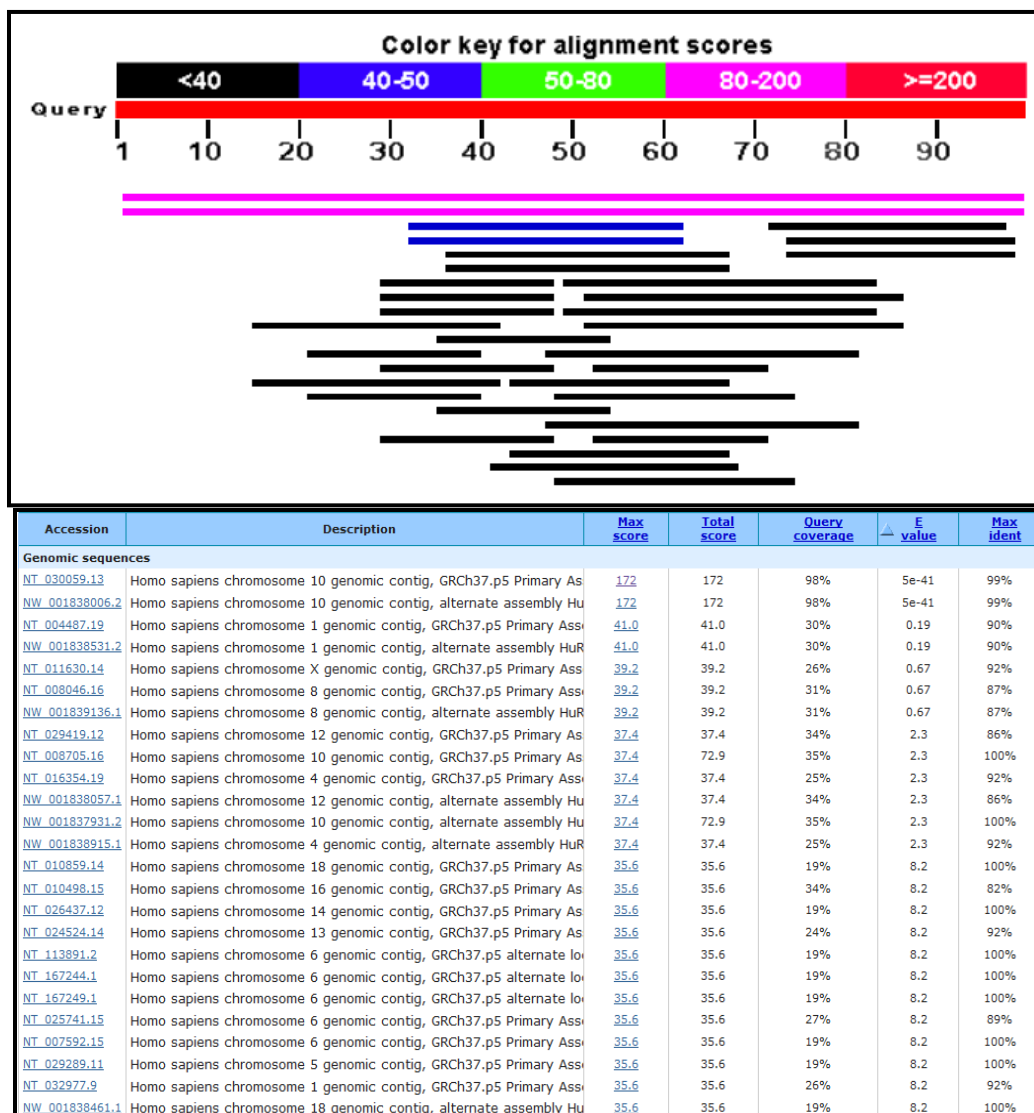
ตารางที่ 5 จากผลการทดลองที่แสดงในรูปภาพที่ 15 พบว่าเกิด PCR product ขนาด 140 bp ซึ่งเป็น PCR product ที่ต้องการ โดยไม่พบ PCR product ที่เป็น non specific band ขึ้น ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงความจำเพาะของ primer และความเหมาะสมของสภาวะในการทำ PCR



**รูปภาพที่ 15** ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR (แถว M: DNA ladder ขนาด 100 bp, แถวที่ 1-10 : PCR product, แถว N : Negative control)

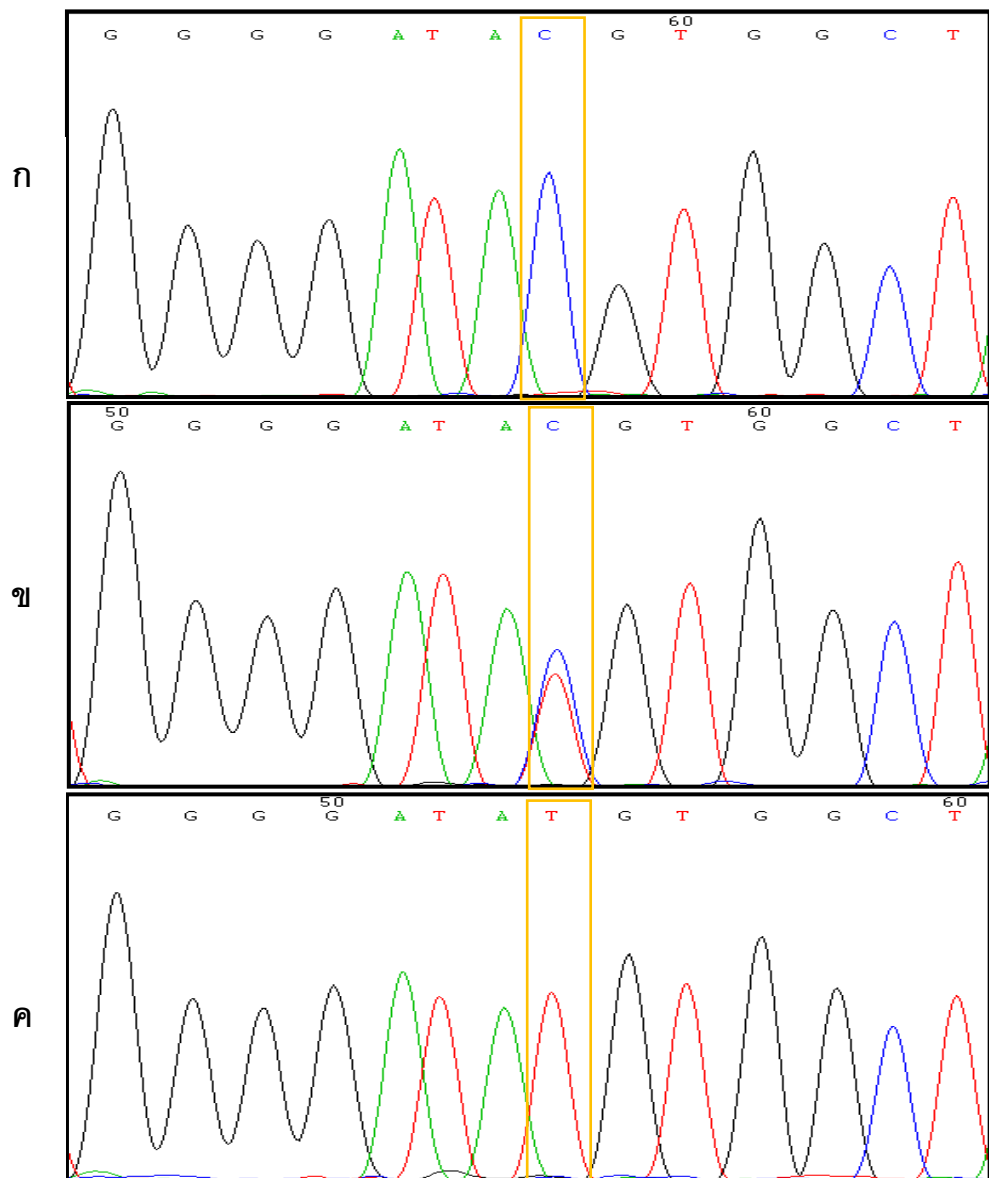
## 2. ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing

เมื่อนำนิวคลีโอไทด์ขนาด 140 bp จากการทำ direct sequencing มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blast ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่ามีความเหมือนกับ Homo sapiens chromosome 10 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly และ Homo sapiens chromosome 10 genomic contig, alternate assembly มากที่สุด (Identities = 97/98 bp, 99%) ดังแสดงในรูปภาพที่ 16



**รูปภาพที่ 16** ผลการ Blast ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากวิธี direct sequencing กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

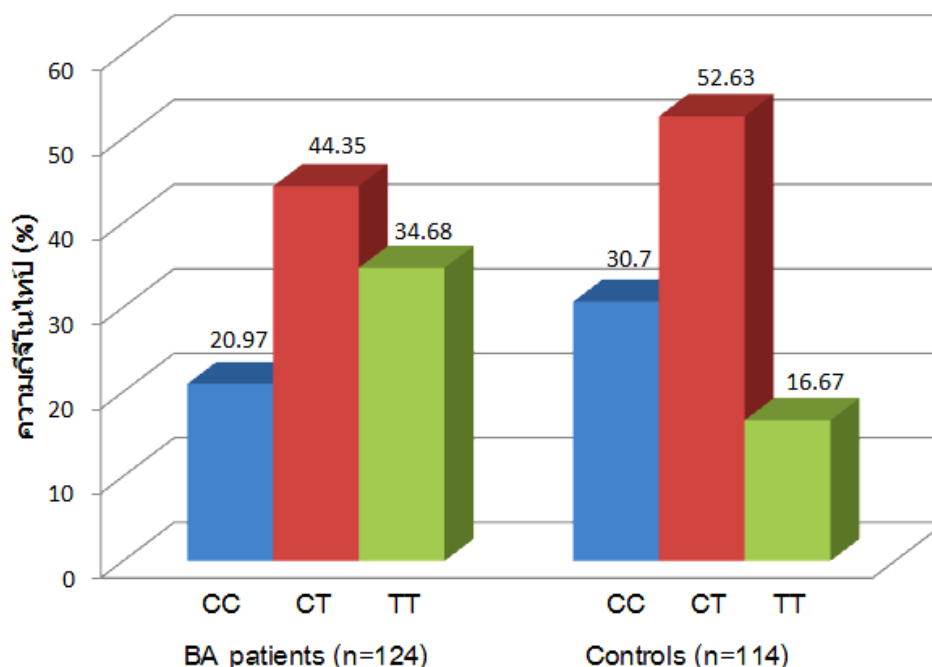
เมื่อนำ PCR product ขนาด 140 bp ที่ได้จากรูปภาพที่ 15 ซึ่งเป็นบริเวณที่ครอบคลุม SNP ตำแหน่ง rs17095355 มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing แล้วอ่านผลที่ได้ด้วยโปรแกรม Chromas หรือ Bioedit พบว่าแสดงลักษณะจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ Homozygous CC , Heterozygous CT และ Homozygous TT ดังแสดงในรูปภาพที่ 17



**รูปภาพที่ 17** ภาพ Chromatogram ที่ได้จาก automated sequencing แสดงลักษณะจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ Homozygous CC (ภาพ ก), Heterozygous CT (ภาพ ข) และ Homozygous TT (ภาพ ค)

จากกลุ่มตัวอย่างที่ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 124 ราย พบลักษณะทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 โดยมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ CC จำนวน 26 ราย (ร้อยละ 20.97), จีโนไทป์ CT จำนวน 55 ราย (ร้อยละ 44.35) และจีโนไทป์ TT จำนวน 43 ราย (ร้อยละ 34.68) สำหรับในกลุ่มควบคุมจำนวน 114 ราย มีการกระจาย

ตัวของจีโนไทป์ CC จำนวน 35 ราย (ร้อยละ 30.70), จีโนไทป์ CT จำนวน 60 ราย (ร้อยละ 52.63) และจีโนไทป์ TT จำนวน 19 ราย (ร้อยละ 16.67) ตามลำดับ ดังแสดงในรูปภาพที่ 18



**รูปภาพที่ 18** แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม

### 3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

เมื่อนำข้อมูลจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับในกลุ่มควบคุมมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างในการกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลระหว่างในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ Epi Info version 6.0 โดยเลือกใช้ค่าสถิติ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P$ -value < 0.05)

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ในกลุ่มผู้ป่วยท่อน้ำดีตีบตันทั้งหมดจำนวน 124 ราย (อายุเฉลี่ย $\pm$ SD= 8.91  $\pm$  5.89) ประกอบด้วยเพศชายจำนวน 63 ราย และเพศหญิงจำนวน 61 ราย มีการกระจายตัวของรูปแบบจีโนไทป์ดังนี้ จีโนไทป์ CC จำนวน 26 ราย จีโนไทป์ CT จำนวน 55 ราย และจีโนไทป์ TT จำนวน 43 ราย สำหรับในกลุ่มควบคุมทั้งหมดจำนวน 114 ราย (อายุเฉลี่ย $\pm$ SD= 13.02 $\pm$ 2.18)

ประกอบด้วยเพศชายจำนวน 59 ราย และเพศหญิงจำนวน 55 ราย มีการกระจายตัวของรูปแบบจีโนไทป์ดังนี้ จีโนไทป์ CC จำนวน 35 ราย จีโนไทป์ CT จำนวน 60 ราย และจีโนไทป์ TT จำนวน 19 ราย เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบทางสถิติ Chi-square พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบความถี่ของจีโนไทป์ TT สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P = 0.0016$ , odd ratio = 2.65) สำหรับการวิเคราะห์การกระจายตัวของอัลลีลในยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการกระจายตัวของอัลลีล C ความถี่ต่ำกว่าอัลลีล T (ร้อยละ 43.15 และ ร้อยละ 56.85 ตามลำดับ) สำหรับในกลุ่มควบคุมมีการกระจายตัวของอัลลีล C ความถี่สูงกว่าอัลลีล T (ร้อยละ 57.02 และ ร้อยละ 42.98 ตามลำดับ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการกระจายตัวของอัลลีล C และอัลลีล T ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มควบคุมพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการกระจายของอัลลีล T ความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุม และเมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 56.85 และร้อยละ 42.98,  $P = 0.0025$ , odd ratio = 1.75) ข้อมูลจากการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 6

**ตารางที่ 6** การกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 (C/T) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันและในกลุ่มควบคุม

	BA n =124 (%)	Controls n =114 (%)	Odds Ratio (95%CI)	P value
Age (yr)	8.91±5.89	13.02±2.18		
Male:female	63:61	59:55		
<b>Genotype</b>				
CC	26 (20.97)	35 (30.70)		
CT	55 (44.35)	60 (52.63)		
TT	43 (34.68)	19 (16.67)	2.65 (1.38-5.15)	0.0016
<b>Alleles</b>				
C	107 (43.15)	130 (57.02)		
T	141 (56.85)	98 (42.98)	1.75 (1.20-2.56)	0.0025
HWE P value	0.29	0.43		

ผลการศึกษาดังกล่าว เป็นการวิเคราะห์การกระจายของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันซึ่งได้แบ่งกลุ่มผู้ป่วยโดยอาศัยค่าของ total bilirubin (TB) ใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองจำนวน 21 ราย (Jaundice, TB  $\geq$  2.0 mg/dL) และกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลืองจำนวน 73 ราย (No jaundice, TB < 2.0 mg/dL) ข้อมูลจากการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 7

**ตารางที่ 7** การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 (C/T) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองและในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง

	Jaundice n = 21 (%)	No jaundice n = 73 (%)	Odds Ratio (95%CI)	P value
<b>Genotype</b>				
CC	4(19.05)	12 (16.44)	1.20(0.28-4.75)	0.78
CT	10 (47.62)	35 (47.94)	0.99(0.34-2.89)	0.98
TT	7 (33.33)	26 (35.62)	0.90(0.29-2.80)	0.85
<b>Alleles</b>				
C	18 (42.86)	59 (40.41)	1.11(0.52-2.34)	0.78
T	24 (57.14)	87 (59.59)	0.90(0.43-1.92)	0.78

จากตารางที่ 7 การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 (C/T) ผลจากการวิเคราะห์การกระจายตัวของจีโนไทป์พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ CC มีความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 19.05 และร้อยละ 16.44,  $P = 0.78$ , odd ratio = 1.20) สำหรับผลจากการวิเคราะห์การกระจายตัวของอัลลีลของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองมีการกระจายตัวของอัลลีล C ความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มี

อาการตัวเหลือง เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 42.86 และร้อยละ 40.41,  $P = 0.78$ , odd ratio = 1.11)



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

โรคท่อน้ำดีตีบตันจะมีการตีบตันของ extrahepatic bile duct ทำให้เกิดการคั่งสะสมของน้ำดีในตับ ส่งผลทำให้เกิดการอักเสบและเกิดพังผืดสะสมขึ้นที่ตับ จนอาจนำไปสู่ภาวะตับแข็งในที่สุด แม้จะมีการศึกษาถึงพยาธิสภาพของการเกิดโรคมาอย่างต่อเนื่อง แต่สาเหตุของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันยังคงไม่ทราบแน่ชัด เมื่อปี พ.ศ. 2553 มีการทำการศึกษา GWAS เพื่อหาบริเวณที่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในประชากรจีน แล้วพบว่า ตำแหน่ง rs 17095355 ซึ่งเป็น SNP ที่อยู่เหนือยีน X-prolyl aminopeptidase 1 (-68 kb) เป็น SNP ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากที่สุดและเนื่องจาก SNPs อาจมีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ และก่อนหน้านี้นี้เป็นการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีความแตกต่างกับประชากรในไทย ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่จะทำการศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ของ SNP ดังกล่าวกับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันของผู้ป่วยเด็กในประเทศไทย เพื่อเป็นการยืนยันผล

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 124 ราย กับกลุ่มควบคุมผู้ที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 114 ราย โดยตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของ SNP ตำแหน่งดังกล่าว โดยใช้วิธี PCR-direct sequencing ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้องและน่าเชื่อถือที่สุด เนื่องจากแสดงผลเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างชัดเจนโดยดูสีของ peak จากภาพ chromatogram สำหรับการทดลองแรก ทำการหา annealing temperature ที่เหมาะสมที่สุดของการทำ PCR จากผลการทดลองพบว่า ที่ Tm ต่ำ (49.1°C, 50.3°C และ 53.3°C) จะพบ non-specific amplification ขึ้นนอกเหนือจากแถบ PCR product ที่ต้องการ ในขณะที่เมื่อใช้ Tm สูงขึ้น (55.5°C และ 57°C) จะเพิ่มความจำเพาะของการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบมากขึ้น ทำให้ไม่พบ non-specific band หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วย PCR โดยเลือกใช้ annealing temperature ที่ 57°C ผลการทดลองพบว่า ไม่พบ non-specific band ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีประสิทธิภาพดี เพราะมีความจำเพาะกับตำแหน่งที่เราต้องการเท่านั้น

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ CC จำนวน 26 ราย (ร้อยละ 20.97) จีโนไทป์ CT จำนวน 55 ราย (ร้อยละ 44.35) และจีโนไทป์ TT จำนวน 43 ราย (ร้อยละ 34.68) ตามลำดับ สำหรับในกลุ่มควบคุมจำนวน 114 ราย มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ CC จำนวน 35 ราย (ร้อยละ 30.70) จีโนไทป์ CT จำนวน 60 ราย (ร้อยละ 52.63) และจีโนไทป์ TT จำนวน 19 ราย (ร้อยละ 16.67) ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบทางสถิติ Chi-square พบว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันพบความถี่ของจีโนไทป์ TT สูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $P = 0.0016$ , odd ratio = 2.65) สำหรับการวิเคราะห์เพื่อศึกษาความแตกต่างของการกระจายตัวของอัลลีลในยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันกับกลุ่มควบคุม พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันมีการกระจายของอัลลีล T ความถี่สูงกว่าในกลุ่มควบคุม และเมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 56.85 และร้อยละ 42.98,  $P = 0.0025$ , odd ratio = 1.75)

สำหรับการวิเคราะห์เพื่อศึกษาการกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองกับผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ CC ความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 19.05 และร้อยละ 16.44,  $P = 0.78$ , odd ratio = 1.20) สำหรับการวิเคราะห์การกระจายตัวของอัลลีล พบว่า การกระจายตัวของอัลลีล C ที่พบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่สูงกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีอาการตัวเหลือง เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ร้อยละ 42.86 และร้อยละ 40.41,  $P = 0.78$ , odd ratio = 1.11) จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของจีโนไทป์และอัลลีลของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองกับผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง จากผลการทดลองพบว่าการกระจายตัวของทั้งจีโนไทป์และอัลลีลของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่มีอาการตัวเหลืองกับผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันที่ไม่มีอาการตัวเหลือง แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทาง

พันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะตัวเหลืองในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน

จากผลการทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน โดยเฉพาะอัลลีล T จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศไทย และความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน X-prolyl aminopeptidase 1 ที่ตำแหน่ง rs17095355 ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะตัวเหลืองในผู้ป่วย

### อภิปรายผลการวิจัย

โรคท่อน้ำดีตีบตันยังคงเป็นปัญหาหลักของโรคตับที่พบในเด็ก และเป็นสาเหตุหลักของการผ่าตัดปลูกถ่ายตับในวัยเด็ก จากการศึกษาอย่างต่อเนื่องถึงพยาธิสภาพของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน มีสมมติฐานมากมายที่พยายามอธิบายถึงพยาธิสภาพของการเกิดโรค แต่ในปัจจุบันยังคงไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรคอย่างแน่ชัด แต่เชื่อว่าโรคท่อน้ำดีตีบตันเกิดจากหลายๆปัจจัยเข้าด้วยกัน สมมติฐานหนึ่งของโรคนี้คือ เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับ immune-mediated disease ซึ่งอาจเกี่ยวเนื่องมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของแต่ละคน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมยังได้รับความสนใจศึกษาน้อย อาจเป็นเพราะโรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นโรคที่พบบได้น้อย จากหลักฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ICAM-1 ตำแหน่ง G241R กับความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตัน [9] แต่จากการศึกษาของ Vejchapipat et al. [105] พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน ICAM-1 ที่ตำแหน่ง K469E ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน จากการศึกษาที่น่าสนใจในประเทศจีน โดยทำการศึกษา GWAS จำนวน 500,000 SNPs ในกลุ่มตัวอย่างประชากรชาวจีนที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 200 ราย และกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตันจำนวน 481 ราย ผลจากการศึกษาพบว่ามีความสัมพันธ์กับตำแหน่ง SNPs 10 ตำแหน่ง ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตัน และจากลักษณะทางพันธุกรรมของ SNPs ทั้ง 10 ตำแหน่ง Garcia-Barcelo et al. [14] ได้พบว่า rs17095355 ที่อยู่ในโครโมโซม 10q24 และอยู่เหนือยีน X-prolyl aminopeptidase 1 เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางสถิติแล้วพบว่า rs17095355 เป็น SNP ที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตันอย่างชัดเจน ( $P = 0.00024$ ) และลักษณะทางพันธุกรรมแบบอัลลีล T มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับโรคท่อน้ำดีตีบตัน และจากผลการศึกษาของ SNP ตำแหน่งดังกล่าวในผู้ป่วยเด็กโรคท่อน้ำดีตีบตันใน

ประเทศไทยข้างต้นพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมแบบอัลลีล T เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันในประเทศไทย ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย

rs17095355 เป็น SNP ที่ตั้งอยู่บริเวณระหว่างยีน X-prolyl aminopeptidase 1 และยีน Adducin 3 ซึ่งทั้งสองยีนเป็นยีนที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการควบคุมหน้าที่การทำงานของตับด้วยกันทั้งสิ้น จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Garcia-Barcelo et al. [14] ซึ่งได้ประเมินไว้ว่าที่ตำแหน่ง rs17095355 บริเวณที่เป็น intergenic region มีความเป็นไปได้ว่าที่บริเวณนี้จะเป็นส่วนของ flanking gene ที่มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรคท่อน้ำดีตีบตันในการไปควบคุมหน้าที่การทำงานของยีนโดยอาศัยความสัมพันธ์ของ SNP allele

ยีน X-prolyl aminopeptidase 1 (*XPNPEP1*) ทำหน้าที่สร้างโปรตีน soluble X-prolyl aminopeptidase P หรือ soluble Aminopeptidase P1 (APP1) พบว่ามีการแสดงออกใน epithelial cell ในระบบ hepatobiliary [16] APP1 เป็น proline-specific metalloaminopeptidase ซึ่งทำหน้าที่เฉพาะเจาะจงในการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดกรดอะมิโนที่อยู่ติดกับกรดอะมิโน proline ก่อนตัวสุดท้ายจากปลาย N-terminal ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของ bradykinin (BK) และ substance P (SP) [17] สำหรับ BK ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการขยายตัวของหลอดเลือดและความยืดหยุ่นของหลอดเลือดฝอย และลดอาการปวด ซึ่งการแสดงออกของ BK ถูกควบคุมโดยตรงจาก bile acid nuclear receptor, farnesoid X receptor (FXR) เป็นที่ทราบกันดีว่าทั้ง bile acid nuclear receptor และ farnesoid X receptor (FXR) มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมและการหลั่งของน้ำดี นอกจากนั้นยังเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการอักเสบด้วย [100-101] ส่วน SP มีบทบาทในการเป็น neurotransmitter และเป็นตัวกลางที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งทั้งหมดมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการหลั่งของน้ำดีและควบคุมสมดุลของการสร้างและหลั่งน้ำดีให้มีความเหมาะสม นอกจากนั้นยังเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณกระแสประสาทไปยังตับ จากการศึกษาของ Trivedi และ Bergasa ในปี ค.ศ. 2010 [106] รายงานพบผู้ป่วย chronic liver disease ที่มีภาวะ cholestasis มีปริมาณ SP ในซีรัมสูงกว่าในกลุ่มที่ไม่มีภาวะ cholestasis

สำหรับยีน Adducin3 (*ADD3*) เป็นยีนที่อยู่ในตระกูลเดียวกันกับโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับ membrane skeletal ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการรวมตัวของ spectrin กับ actin ในเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยที่ adducin เป็นตัวเสริมความแข็งแรงของรอยต่อระหว่าง spectrin กับ actin นอกจากนั้นยังพบในบริเวณที่การเชื่อมกันระหว่างเซลล์สองชนิดในเนื้อเยื่อบุผิวรวมทั้งบทบาทหน้าที่ในการย่อยสลายเนื้อเยื่อบริเวณต่อต่างๆ ในอวัยวะตับและท่อน้ำดีได้อีกด้วย ซึ่ง *ADD3* มี

การแสดงออกใน epithelia ของตับและทางเดินน้ำดี เป็นที่น่าสังเกตว่าการแสดงออกของยีน *ADD3* พบว่ามีการแสดงออกของยีนนี้ในตับระยะฟัตัส (fetal liver) มากกว่าในตับผู้ใหญ่ [15] จากการศึกษาพบว่า *ADD3* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการยึดหดตัวของ bile canaliculi membrane ซึ่งกระบวนการนี้ถูกควบคุมโดยอาศัยการทำงานระหว่าง actin กับ myosin [98] การเพิ่มการแสดงออกของ  $\alpha$ -smooth-muscle actin มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการเกิดพังผืดสะสมตับในผู้ป่วยที่เป็นโรคท่อน้ำดีตีบตัน [99]

โรคท่อน้ำดีตีบตันเป็นการตีบตันของบริเวณท่อน้ำดีที่เกิดการอักเสบ และจากข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับบทบาทหน้าที่ของยีน *ADD3* และยีน *XPNPEP1* ทำให้เชื่อว่ายีนทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมของกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของ SNP ตำแหน่ง rs17095355 ในโรคอื่นๆ และยังไม่ทราบบทบาทของ SNP ตำแหน่ง rs17095355 ต่อการแสดงออกของยีน *XPNPEP1* หรือยีน *ADD3* ดังนั้นจึงควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เพื่อจะทำให้เข้าใจถึงพยาธิสภาพของการเกิดโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ดียิ่งขึ้น

## รายการอ้างอิง

- [1] Kelly, D. A., and Davenport, M. Current management of biliary atresia. Arch Dis Child 92 (December 2007) : 1132-35.
- [2] Kassai, M. [Surgical treatment of biliary atresia]. Nippon Geka Gakkai Zasshi 84 (September 1983) : 741-3.
- [3] Otte, J. B., de Ville de Goyet, J., Reding, R., Hausleithner, V., Sokal, E., Chardot, C., et al. Sequential treatment of biliary atresia with Kasaiportoenterostomy and liver transplantation: a review. Hepatology 20 (July 1994) : 41S-8S.
- [4] Chardot, C. Biliary atresia. Orphanet J Rare Dis 1 (July 2006) : 28.
- [5] Bittmann S. Surgical experience in children with biliary atresia treated with portoenterostomy. Curr Surg 62 (July-August 2005) : 439-43.
- [6] Petersen, C., Harder, D., Abola, Z., Alberti, D., Becker, T., Chardot, C., et al. European biliary atresia registries: summary of a symposium. Eur J Pediatr Surg 18 (April 2008) : 111-6.
- [7] Mack, C. L., and Sokol, R. J. Unraveling the pathogenesis and etiology of biliary atresia. Pediatr Res 57 (May 2005) : 87R-94R.
- [8] Lee, H. C., Chang, T. Y., Yeung, C. Y., Chan, W. T., Jiang, C. B., Chen, W. F., et al. Genetic variation in the vascular endothelial growth factor gene is associated with biliary atresia. J Clin Gastroenterol 44 (February 2010) : 135-9.
- [9] Arıkan, C., Berdeli, A., Kilic, M., Tumgor, G., Yagci, R. V., and Aydogdu, S. Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with biliary atresia. Dig Dis Sci 53 (July 2008) : 2000-4.
- [10] Arıkan, C., Berdeli, A., Ozgenc, F., Tumgor, G., Yagci, R. V., and Aydogdu, S. Positive association of macrophage migration inhibitory factor gene -173G/C polymorphism with biliary atresia. J Pediatr Gastroenterol Nutr 42 (January 2006) : 77-82.

- [11] Davit-Spraul, A., Baussan, C., Hermeziu, B., Bernard, O., and Jacquemin, E. CFC1 gene involvement in biliary atresia with polysplenia syndrome. J Pediatr Gastroenterol Nutr 46 (January 2008) : 111-2.
- [12] Shih, H. H., Lin, T. M., Chuang, J. H., Eng, H. L., Juo, S. H., Huang, F. C., et al. Promoter polymorphism of the CD14 endotoxin receptor gene is associated with biliary atresia and idiopathic neonatal cholestasis. Pediatrics 116 (August 2005) : 437-41.
- [13] Huang, Y. H., Huang, C. C., Chuang, J. H., Hsieh, C. S., Lee, S. Y., and Chen, C. L. Upstream stimulatory factor 2 is implicated in the progression of biliary atresia by regulation of hepcidin expression. J Pediatr Surg 43 (November 2008) : 2016-23.
- [14] Garcia-Barcelo, M. M., Yeung, M. Y., Miao, X. P., Tang, C.S., Cheng, G., So, M. T., et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for biliary atresia on 10q24.2. Hum Mol Genet 19 (July 2010) : 2917-25.
- [15] Ku, N. O., Zhou, X., Toivola, D. M., and Omary, M. B. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. Am J Physiol 277 (December 1999) : G1108-37.
- [16] Nagasaka, T., Nomura, S., Okamura, M., Tsujimoto, M., Nakazato, H., Oiso, Y., et al. Immunohistochemical localization of placental leucine aminopeptidase/ oxytocinase in normal human placental, fetal and adult tissues. Reprod Fertil Dev 9 (1997) : 747-53.
- [17] Cottrell, G. S., Coelho, A. M., and Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signalling. Essays Biochem 38 (2002) : 169-83.
- [18] Mack, C. L. The pathogenesis of biliary atresia: evidence for a virus-induced autoimmune disease. Semin Liver Dis 27 (August 2007) : 233-42.

- [19] Houwen, R. H., Kerremans, I. I., van Steensel-Moll, H. A., van Romunde, L. K., Bijleveld C. M., and Schweizer, P. Time-space distribution of extrahepatic biliary atresia in The Netherlands and West Germany. Z Kinderchir 43 (April 1988) : 68-71.
- [20] Chardot, C., Carton, M., Spire-Bendelac, N., Le Pommelet, C., Golmard, J. L., and Auvert, B. Epidemiology of biliary atresia in France: a national study 1986-96. J Hepatol 31 (December 1999) : 1006-13.
- [21] McKiernan, P. J., Baker, A. J., and Kelly, D. A. The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. Lancet 355 (January 2000) : 25-9.
- [22] Strickland, A. D., and Shannon, K. Studies in the etiology of extrahepatic biliary atresia: time-space clustering. J Pediatr 100 (May 1982) : 749-53.
- [23] Danks, D. M., Campbell, P. E., Jack, I., Rogers, J., and Smith, A. L. Studies of the aetiology of neonatal hepatitis and biliary atresia. Arch Dis Child 52 (May 1977) : 360-7.
- [24] Yoon, P. W., Bresee, J. S., Olney, R. S., James, L. M., and Khoury, M. J. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study. Pediatrics 99 (March 1997) : 376-82.
- [25] Ibrahim, M., Miyano, T., Ohi, R., Saeki, M., Shiraki, K., Tanaka, K., et al. Japanese Biliary Atresia Registry, 1989 to 1994. Tohoku J Exp Med 181 (January 1997) : 85-95.
- [26] Hartley, J. L., Davenport, M., and Kelly, D. A. Biliary atresia. Lancet 374 (November 2009) : 1704-13.
- [27] Hsiao, C. H., Chang, M. H., Chen, H. L., Lee, H. C., Wu, T. C., Lin, C. C., et al; Taiwan Infant Stool Color Card Study Group. Universal screening for biliary atresia using an infant stool color card in Taiwan. Hepatology 47 (April 2008) : 1233-40.
- [28] Tseng, J. J., Lai, M. S., Lin, M. C., and Fu, Y. C. Stool color card screening for biliary atresia. Pediatrics 128 (November 2011) : e1209-15.



- [29] Khalil, B. A., Perera, M. T., and Mirza, D. F. Clinical practice: management of biliary atresia. Eur J Pediatr 169 (April 2010) : 395-402.
- [30] Sydney, M. Extra-hepatic biliary atresia: diagnosis methods. J Pediatr 79 (2003) :107-14.
- [31] Mieli-Vergani, G., and Vergani, D. Biliary atresia. Semin Immunopathol 31 (June 2009) : 371-81.
- [32] Schweizer, P., and Kerremans, J. Discordant findings in extrahepatic bile duct atresia in 6 sets of twins. Z Kinderchir 43 (April 1988) : 72-5.
- [33] Hyams, J. S., Glaser, J. H., Leichtner, A. M., and Morecki, R. Discordance for biliary atresia in two sets of monozygotic twins. J Pediatr 107 (September 1985) : 420-2.
- [34] Poovorawan, Y., Chongsrisawat, V., Tanunythawongse, C., Norapaksunthorn, T., Mutirangura, A., and Chandrakamol, B. Extrahepatic biliary atresia in twins: zygosity determination by short tandem repeat loci. J Med Assoc Thai 79 (December 1996) : 119-24.
- [35] Davenport, M., Savage, M., Mowat, A. P., and Howard, E. R. Biliary atresia splenic malformation syndrome: an etiologic and prognostic subgroup. Surgery 113 (June 1993) : 662-8.
- [36] Mazziotti, M. V., Willis, L. K., Heuckeroth, R. O., LaRegina, M. C., Swanson, P. E., Overbeek, P. A., et al. Anomalous development of the hepatobiliary system in the Inv mouse. Hepatology 30 (August 1999) : 372-8.
- [37] Yokoyama, T., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Montgomery, C. A., Elder, F. F., and Overbeek, P. A. Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation. Science 260 (April 1993) : 679-82.
- [38] Schön, P., Tsuchiya, K., Lenoir, D., Mochizuki, T., Guichard, C., Takai, S., et al. Identification, genomic organization, chromosomal mapping and mutation analysis of the human INV gene, the ortholog of a murine gene implicated in left-right axis development and biliary atresia. Hum Genet 110 (February 2002) : 157-65.

- [39] Bamford, R. N., Roessler, E., Burdine, R. D., Saplakoğlu, U., dela Cruz, J., Splitt, M., et al. Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. Nat Genet 26 (November 2000) : 365-9.
- [40] Jacquemin, E., Cresteil, D., Raynaud, N., and Hadchouel, M. CFC1 gene mutation and biliary atresia with polysplenia syndrome. J Pediatr Gastroenterol Nutr 34 (March 2002) : 326-7.
- [41] Kohsaka, T., Yuan, Z. R., Guo, S. X., Tagawa, M., Nakamura, A., Nakano, M., et al. The significance of human jagged 1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. Hepatology 36 (October 2002) : 904-12.
- [42] Clotman, F., Lannoy, V. J., Reber, M., Cereghini, S., Cassiman, D., Jacquemin, P., et al. The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. Development 129 (April 2002): 1819-28.
- [43] Campbell, K. M., Arya, G., Ryckman, F. C., Alonso, M., Tiao, G., Balistreri, W. F., et al. High prevalence of alpha-1-antitrypsin heterozygosity in children with Chronic liver disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 44 (January 2007) : 99-103.
- [44] Desmet, V. J. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme "ductal plate malformation". Hepatology 16 (October 1992) : 1069-83.
- [45] Hinds, R., Davenport, M., Mieli-Vergani, G., Hadzic, N. Antenatal presentation of biliary atresia. J Pediatr 144 (January 2004) : 43-6.
- [46] Klippel, C. H. A new theory of biliary atresia. J Pediatr Surg 7 (December 1972) : 651-4.
- [47] Pickett, L. K., and Briggs, H. C. Biliary obstruction secondary to hepatic vascular ligation in fetal sheep. J Pediatr Surg 4 (February 1969) : 95-101.
- [48] Ho, C. W., Shioda, K., Shirasaki, K., Takahashi, S., Tokimatsu, S., and Maeda, K. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the

- hepatobiliary system and the hepatic artery. J Pediatr Gastroenterol Nutr 16 (January 1993) : 53-60.
- [49] Clotman, F., Lannoy, V. J., Reber, M., Cereghini, S., Cassiman, D., Jacquemin, P., et al. The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. Development 129 (April 2002) : 1819-28.
- [50] Sokol, R. J., and Mack, C. Etiopathogenesis of biliary atresia. Semin Liver Dis 21 (November 2001) : 517-24.
- [51] Landing, B. H. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst--the concept of infantile obstructive cholangiopathy. Prog Pediatr Surg 6 (1974) : 113-39.
- [52] Mohanty, S., Shah, I., and Bhatnagar, S. Evolving biliary atresia with cytomegalovirus. Indian Pediatr 48 (August 2011) : 644-6.
- [53] Domiati-Saad, R., Dawson, D. B., Margraf, L. R., Finegold, M. J., Weinberg, A. G., and Rogers, B. B. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. Pediatr Dev Pathol 3 (July-August 2000) : 367-73.
- [54] Drut, R., Drut, R. M., Gómez, M. A., Cueto Rúa, E., and Lojo, M. M. Presence of human papillomavirus in extrahepatic biliary atresia. J Pediatr Gastroenterol Nutr 27 (November 1998) : 530-5.
- [55] Drut, R., Gómez, M. A., Drut, R. M., Cueto, R. E., and Lojo, M. [Human papillomavirus, neonatal giant cell hepatitis and biliary duct atresia]. Acta Gastroenterol Latinoam 28 (1998) : 27-31.
- [56] Fjaer, R. B., Bruu, A. L., and Nordbo, S. A. Extrahepatic bile duct atresia and viral involvement. Pediatr Transplant 9 (February 2005) : 68-73.
- [57] Kahn, E. Biliary atresia revisited. Pediatr Dev Pathol 7 (March-April 2004) : 109-24.
- [58] Bangaru, B., Morecki, R., Glaser, J. H., Gartner, L. M., and Horwitz, M. S. Comparative studies of biliary atresia in the human newborn and reovirus-

- induced cholangitis in weanling mice. Lab Invest 43 (November 1980) : 456-62.
- [59] Morecki, R., Glaser, J. H., Cho, S., Balistreri, W. F., and Horwitz, M. S. Biliary atresia and Reovirus type 3 infection. N Engl J Med 310 (June 1984) : 481-4.
- [60] Glaser, J. H., Balistreri, W. F., and Morecki, R. Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis. J Pediatr 105 (December 1984) : 912-5.
- [61] Richardson, S. C., Bishop, R. F., and Smith, A. L. Reovirus serotype 3 infection in infants with extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis. J Gastroenterol Hepatol 9 (May-June 1994) : 264-8.
- [62] Tyler, K. L., Sokol, R. J., Oberhaus, S. M., Le, M., Karrer, F. M., Narkewicz, M. R., et al. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. Hepatology 27 (June 1998) : 1475-82.
- [63] Steele, M. I., Marshall, C. M., Lloyd, R. E., and Randolph, V. E. Reovirus 3 not detected by reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction analysis of preserved tissue from infants with cholestatic liver disease. Hepatology 21 (March 1995) : 697-702.
- [64] Saito, T., Shinozaki, K., Matsunaga, T., Ogawa, T., Etoh, T., Muramatsu, T. et al. Lack of evidence for reovirus infection in tissues from patients with biliary atresia and congenital dilatation of the bile duct. J Hepatol 40 (February 2004) : 203-11.
- [65] Morecki, R., Glaser, J. H., Johnson, A. B., and Kress, Y. Detection of reovirus type 3 in the porta hepatis of an infant with extrahepatic biliary atresia: ultrastructural and immunocytochemical study. Hepatology 4 (November-December 1984) : 1137-42.
- [66] Rosenberg, D. P., Morecki, R., Lollini, L. O., Glaser, J., Cornelius, C. E. Extrahepatic biliary atresia in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Hepatology 3 (July-August 1983) : 577-80.

- [67] Steele, T. A., and Cox, D. C. Reovirus type 3 chemoimmunotherapy of murine lymphoma is abrogated by cyclosporine. Cancer Biother 10 (1995) : 307-15.
- [68] Papadimitriou, J. M. The biliary tract in acute murine reovirus 3 infection. Light and electron microscopic study. Am J Pathol 52 (March 1968) : 595-611.
- [69] Szavay, P. O., Leonhardt, J., Czech-Schmidt, G., and Petersen, C. The role of reovirus type 3 infection in an established murine model for biliary atresia. Eur J Pediatr Surg 12 (August 2002) : 248-50.
- [70] Riepenhoff-Talty, M., Schaekel, K., Clark, H. F., Mueller, W., Uhnoo, I., Rossi, T., et al. Group A rotaviruses produce extrahepatic biliary obstruction in orally inoculated newborn mice. Pediatr Res 33 (April 1993) : 394-9.
- [71] Riepenhoff-Talty, M., Gouvea, V., Evans, M. J., Svensson, L., Hoffenberg, E., Sokol, R. J., et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. J Infect Dis 174 (July 1996) : 8-15.
- [72] Soomro, G. B., Abbas, Z., Hassan, M., Luck, N., Memon, Y., and Khan, A. W. Is there any association of extra hepatic biliary atresia with cytomegalovirus or other infections?. J Pak Med Assoc 61 (March 2011) : 281-3.
- [73] Fischler, B., Woxenius, S., Nemeth, A., and Papadogiannakis, N. Immunoglobulin deposits In liver tissue from infants with biliary atresia and the correlation to cytomegalovirus infection. J Pediatr Surg 40 (March 2005) : 541-6.
- [74] Xu, Y., Yu, J., Zhang, R., Yin, Y., Ye, J., Tan, L., et al. The perinatal infection of cytomegalovirus is an important etiology for biliary atresia in China. Clin Pediatr (Phila) 51 (February 2012) : 109-13.
- [75] Fischler, B., Ehrnst, A., Forsgren, M., Orvell, C., and Nemeth, A. The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between cytomegalovirus infection and extrahepatic biliary atresia. J Pediatr Gastroenterol Nutr 27 (July 1998) : 57-64.
- [76] De Tommaso, A. M., Andrade, P. D., Costa, S. C., Escanhoela, C. A., and Hessel, G. High frequency of human cytomegalovirus DNA in the liver of

- infants with extrahepatic neonatal cholestasis. BMC Infect Dis 5 (December 2005) : 108.
- [77] Jevon, G. P., and Dimmick, J. E. Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study. Pediatr Dev Pathol 2 (January-February 1999) : 11-4.
- [78] Harper, P., Plant, J. W., and Unger, D. B. Congenital biliary atresia and jaundice in lambs and calves. Aust Vet J 67 (January 1990) : 18-22.
- [79] Bill, A. H., Haas, J. E., and Foster, G. L. Biliary Atresia: histopathologic observations and reflections upon its natural history. J Pediatr Surg 12 (December 1977) : 977-82.
- [80] Ohya, T., Fujimoto, T., Shimomura, H., and Miyano, T. Degeneration of intrahepatic bile duct with lymphocyte infiltration into biliary epithelial cells in biliary atresia. J Pediatr Surg 30 (April 1995) : 515-8.
- [81] Schreiber, R. A., and Kleinman, R. E. Genetics, immunology, and biliary atresia: an opening or a diversion?. J Pediatr Gastroenterol Nutr 16 (February 1993) : 111-3.
- [82] Silveira, T. R., Salzano, F. M., Donaldson, P. T., Mieli-Vergani, G., Howard, E. R., and Mowat, A. P. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. J Pediatr Gastroenterol Nutr 16 (February 1993) : 114-7.
- [83] Kobayashi, H., Tamatani, T., Tamura, T., Kusafuka, J., Yamataka, A., Lane, G. J., et al. Maternal microchimerism in biliary atresia. J Pediatr Surg 42 (June 2007) : 987-91.
- [84] Broomé, U., Nemeth, A., Hultcrantz, R., and Scheynius, A. Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and Byler's disease. J Hepatol 26 (April 1997) : 857-62.
- [85] Donaldson, P. T., Clare, M., Constantini, P. K., Hadzic, N., Mieli-Vergani, G., Howard, E., et al. HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia. Liver 22 (June 2002) : 213-9.

- [86] A-Kader, H. H., El-Ayyouti, M., Hawas, S., Abdalla, A., Al-Tonbary, Y., Bassiouny, M., et al. HLA in Egyptian children with biliary atresia. J Pediatr 141 (September 2002) : 432-3.
- [87] Davenport, M., Gonde, C., Redkar, R., Koukoulis, G., Tredger, M., Mieli-Vergani G, et al. Immunohistochemistry of the liver and biliary tree in extrahepatic biliary atresia. J Pediatr Surg 36 (July 2001) : 1017-25.
- [88] Bezerra, J. A., Tiao, G., Ryckman, F. C., Alonso, M., Sabla, G. E., Shneider, B., et al. Genetic induction of proinflammatory immunity in children with biliary atresia. Lancet 360 (November 2002) : 1653-9.
- [89] Sokol, R. J., Mack, C., Narkewicz, M. R., and Karrer, F. M. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. J Pediatr Gastroenterol Nutr 37 (July 2003) : 4-21.
- [90] Lu, B. R., Brindley, S. M., Tucker, R. M., Lambert, C. L., and Mack, C. L.  $\alpha$ -enolase autoantibodies cross-reactive to viral proteins in a mouse model of biliary atresia. Gastroenterology 139 (November 2010) : 1753-61.
- [91] Bernal, W., Moloney, M., Underhill, J., and Donaldson, P. T. Association of tumor Necrosis factor polymorphism with primary sclerosing cholangitis. J Hepatol 30 (February 1999) : 237-41.
- [92] Mitchell, S. A., Grove, J., Spurkland, A., Boberg, K. M., Fleming, K. A., Day, C. P., et al; European Study Group of Primary Sclerosing Cholangitis. Association of the tumour necrosis factor alpha -308 but not the interleukin 10 -627 promoter polymorphism with genetic susceptibility to primary sclerosing cholangitis. Gut 49 (August 2001) : 288-94.
- [93] Donaldson, P., Agarwal, K., Craggs, A., Craig, W., James, O., and Jones, D. HLA and interleukin 1 gene polymorphisms in primary biliary cirrhosis: associations with disease progression and disease susceptibility. Gut 48 (March 2001) : 397-402.
- [94] Narayanaswamy, B., Gonde, C., Tredger, J. M., Hussain, M., Vergani, D., and Davenport, M. Serial circulating markers of inflammation in biliary atresia--

- evolution of the post-operative inflammatory process. Hepatology 46 (July 2007) : 180-7.
- [95] Dillon, P., Belchis, D., Tracy, T., Cilley, R., Hafer, L., and Krummel, T. Increased expression of intercellular adhesion molecules in biliary atresia. Am J Pathol. 145 (August 1994) : 263-7.
- [96] Davenport, M., Gonde, C., Narayanaswamy, B., Mieli-Vergani, G., and Tredger J. M. Soluble adhesion molecule profiling in preoperative infants with biliary atresia. J Pediatr Surg 40 (September 2005) : 1464-9.
- [97] Santos, J. L., Carvalho, E., and Bezerra, J. A. Advances in biliary atresia: from patient care to research. Braz J Med Biol Res 43 (June 2010) : 522-7.
- [98] Oshio, C., and Phillips, M. J. Contractility of bile canaliculi: implications for liver function. Science 212 (May 1981) : 1041-2.
- [99] Shteyer, E., Ramm, G. A., Xu, C., White, F. V., and Shepherd, R. W. Outcome after portoenterostomy in biliary atresia: pivotal role of degree of liver fibrosis and intensity of stellate cell activation. J Pediatr Gastroenterol Nutr 42 (January 2006) : 93-9.
- [100] Sharma, J. N. Hypertension and the bradykinin system. Curr Hypertens Rep 11 (June 2009) : 178-81.
- [101] Zhao, A., Lew, J. L., Huang, L., Yu, J., Zhang, T., Hrywna, Y., et al. Human kininogen gene is transactivated by the farnesoid X receptor. J Biol Chem 278 (May 2003) : 28765-70.
- [102] Calandra, T., and Roger, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. Nat Rev Immunol 3 (October 2003) : 791-800.
- [103] Huang, Q., and Fu, W.L. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. Clin Chem Lab Med 43 (2005) : 841-2.
- [104] Albarghouthi, M. N, and Barron, A. E. Polymeric matrices for DNA sequencing by capillary electrophoresis. Electrophoresis 21 (December 2000) : 4096-111.



- [105] Vejchapipat, P., Jirapanakorn, N., Thawornsuk, N., Theamboonlers, A., Chongsrisawat, V., Chittmittrapap, S., et al. There is no association between K469E ICAM-1 gene polymorphism and biliary atresia. World J Gastroenterol 11 (August 2005) : 4886-90.
- [106] Trivedi, M., and Bergasa, N. V. Serum concentrations of substance P in cholestasis. Ann Hepatol 9 (April-June 2010) : 177-80.

ภาคผนวก

**ภาคผนวก**  
**การเตรียมสารเคมี**

1. สารละลาย Red Cell Lysis Buffer (RCLB)

1M TRIS-HCl (pH 7.6)	10	มิลลิลิตร
5M NaCl	2	มิลลิลิตร
1M MgCl <sub>2</sub>	5	มิลลิลิตร
Distilled water เป็น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS)

PBS	9.88	กรัม
Distilled water เป็น	1,000	มิลลิลิตร

นำไป autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลาย lysis buffer

Tris-HCl	0.105	กรัม
EDTA	0.1245	กรัม
SDS	0.335	กรัม
Distilled water เป็น	50	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย 20 mg/ml Proteinase K

Proteinase K	2	มิลลิลิตร
Distilled water เป็น	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

## 5. 2M Sodium acetate (2M NaOAc)

Sodium acetate	4.92	กรัม
Distilled water เป็น	30	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

6. Chloroform (CHCl<sub>3</sub>):Isoamyl alcohol (IAA) (49:1)

Isoamyl alcohol	1	มิลลิลิตร
Choroform	49	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

## 7. 70% Ethanol

Absolute ethanol	70	มิลลิลิตร
Distilled water เป็น	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

## 8. 5xTris borate buffer (5x TBE)

Tris-base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
Distilled water เป็น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 9. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	4	กรัม
1 x TBE	200	มิลลิลิตร

ละลายด้วยการอุ่นในเตาไมโครเวฟแล้วผสมให้เข้ากันจนกว่า agarose gel

จะละลายหมด

## 10. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	ไมโครลิตร
Distilled water	300	มิลลิลิตร

## 11. Loading dye

0.25% Bromphenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวสรันนุช แก้วเกียรติยศ  
(ภาษาอังกฤษ) Miss Sarannut Kaewkiattiyot

อายุ 24 ปี เกิด 28 มีนาคม 2531

สัญชาติ ไทย เชื้อชาติ ไทย ศาสนา คริสต์

ที่อยู่ปัจจุบัน 33 หมู่ 3 ต. วัดเพลง อ. วัดเพลง จ.ราชบุรี 70170

### ประวัติการศึกษา

**ระดับปริญญาตรี** สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี (วท.บ.) สาขาชีวเคมี คณะ  
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2549-2552

**ระดับปริญญาโท** เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) หลักสูตรชีวเคมี  
ทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2553

### ผลงานตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

หัวข้อเรื่อง : Association of X-prolyl aminopeptidase 1 rs17095355 polymorphism with  
biliary atresia in Thai children

รายชื่อผู้นิพนธ์ : Kaewkiattiyot, S., Honsawek, S., Vejchapipat, P., Chongsrisawat, V., and  
Poovorawan, Y.

ตีพิมพ์ในวารสาร : Hepatology Research ปี 2011 ฉบับที่ 41 หน้า 1249-1252 ซึ่งอยู่ใน  
ฐานข้อมูล ISI