

ความถี่ของ TA repeat บริเวณ promoter และ ตำแหน่ง 211G>A ของยีน *UGT1A1*
ในกลุ่มเด็กแรกเกิดชาวไทยที่มีภาวะตัวเหลือง

นางสาวกรจริม นิลยนิมิต

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.

FREQUENCY OF PROMOTER TA REPEAT AND 211G>A OF *UGT1A1* GENE
AMONG THAI INFANTS WITH NEONATAL JAUNDICE

Miss Pornjarim Nilyanimit

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	ความถี่ของ TA repeat บริเวณ promoter และ ตำแหน่ง 211G>A ของยีน <i>UGT1A1</i> ในกลุ่มเด็กแรกเกิดชาวไทยที่มีภาวะตัวเหลือง
โดย	นางสาวกรจริม นิลยนิมิต
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง พิมลรัตน์ ไทยธรรมยานนท์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โสภณ นภทร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิสิฏฐ์ ประพันธ์วัฒนะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง พิมลรัตน์ ไทยธรรมยานนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วรนุช จงศิริสวัสดิ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(พันโทหญิง แพทย์หญิง นภอร ภาวิจิตร)

กรจริม นิลยนิมิต : ความถี่ของ TA repeat บริเวณ promoter และ ตำแหน่ง 211G>A ของ ยีน *UGT1A1* ในกลุ่มเด็กแรกเกิดชาวไทยที่มีภาวะตัวเหลือง (FREQUENCY OF PROMOTER TA REPEAT AND 211G>A OF *UGT1A1* GENE AMONG THAI INFANTS WITH NEONATAL JAUNDICE) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ.นพ.ยง ภู่วรรณ, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ.พญ.พิมลรัตน์ ไทยธรรมยานนท์, 80 หน้า.

ปัญหาที่พบบ่อยในเด็กแรกเกิด คืออาการตัวเหลือง ซึ่งเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น การไม่เข้ากันของหมู่เลือด ABO, การทำงานผิดปกติของเอนไซม์ glucose – 6 –phosphate dehydrogenase (G6PD), การดื่มนมแม่, Gilbert syndrome และ Crigler – Najjar syndrome เป็นต้น การกลายพันธุ์ของยีน *Uridine glucuronosyltransferase1 (UGT1A1)* ทำให้เกิดการสะสมของบิลิรูบินในเลือด โดยการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* พบมากบริเวณ TA promoter โดยมี TA ซ้ำเพิ่มขึ้นหรือลดลง และ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 211G>A ของ exon1 โดยเปลี่ยนจากกรดอะมิโนไกลซีนเป็นอาร์จินีน ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 71 (G71R) การกลายพันธุ์ของทั้งสองตำแหน่งนี้ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว นอกจากการกลายพันธุ์ของยีนนี้แล้ว ยังขึ้นกับความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละเชื้อชาติ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความถี่ของยีน *UGT1A1* ในเด็กแรกเกิดชาวไทยและหาความเกี่ยวข้องของการกลายพันธุ์กับการเกิดอาการตัวเหลือง ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษาจำนวน 71 ราย และกลุ่มคนไทยปกติจำนวน 115 ราย โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction และ direct sequencing จากการศึกษาพบว่า ในคนไทยปกติและในเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษา ทั้งสองกลุ่มมีค่าความถี่ของอัลลีล A(TA)_nTAA เท่ากันคือ 0.15 ส่วนในตำแหน่ง 211G>A มีความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 0.12 และ 0.09 ตามลำดับ หากคัดกลุ่มเด็กตัวเหลืองที่ทราบสาเหตุออกจำนวน 17 รายจะพบว่าค่าความถี่ของอัลลีล A(TA)_nTAA เท่ากับ 0.14 และตำแหน่ง 211G>A มีความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 0.10 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ทั้งตำแหน่ง TA promoter และ 211G>A บริเวณ exon1 ยังพบว่าไม่มีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับการก่อให้เกิดอาการตัวเหลืองโดย มีค่า *p* – value เท่ากับ 0.90 และ 0.55 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TA promoter และ 211G>A บริเวณ exon1 ไม่มีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดอาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิดชาวไทย

ภาควิชาชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์..... ลายมือชื่อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา2554..... ลายมือชื่อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5374651430: MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: URIDINE GLUCURONOSYLTRANSFERASE (*UGT1A1*) / TA PROMOTER / 211G>A / NEONATAL JAUNDICE / PHOTOTHERAPY

PORNJARIM NILYANIMIT: FREQUENCY OF PROMOTER TA REPEAT AND 211G>A OF *UGT1A1* GENE AMONG THAI INFANTS WITH NEONATAL JAUNDICE. ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., CO - ADVISOR: PROF. PIMOLRAT THAITHUMYANON, M.D., 80 pp.

Neonatal jaundice or hyperbilirubinemia is a common problem in newborns. There are various factors contribute to jaundice such as ABO incompatibility, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD), breast milk feeding, Gilbert syndrome (GB), Crigler – Najjar syndrome (CN). Mutation of *Uridine glucuronosyltransferase1 (UGT1A1)* gene can cause jaundice by accumulation of unconjugated bilirubin in plasma. The number of TA repeats in the gene promoter and the mutation of 211G>A in exon1 (G71R) are associated with the enzyme activity. The mutations are associated with jaundice. Moreover, these mutations are different among ethnic groups. Therefore, the aim of this study was to assess the frequency of the two polymorphisms of the *UGT1A1* gene in Thai population and their association with unconjugated hyperbilirubinemia in neonates. In this study, 71 samples of newborns with unconjugated hyperbilirubinemia who were treated with phototherapy and 115 healthy adult controls were recruited. The promoter and exon1 of *UGT1A1* were directly sequenced from the DNA products obtained by polymerase chain reaction. The association between *UGT1A1* promoter, 211G>A of exon1 and neonatal hyperbilirubinemia was evaluated by using chi – square test. Both jaundice newborns and healthy Thai adults have similar frequency of A(TA)₇TAA allele (0.15) and the frequency of 211G>A allele are 0.12 and 0.09, respectively. When exclude the newborn who know the cause of jaundice, the result showed that no significant association between *UGT1A1* promoter (p – value = 0.90), 211G>A of exon1 (p – value = 0.55). In conclusion, the *UGT1A1* promoter and 211G>A mutation were not associated with Thai neonatal jaundice.

Department:Biochemistry..... Student’s Signature

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

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

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต และได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียบพร้อม พร้อมทั้งกรุณาให้ คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง พิมลรัตน์ ไทยธรรมยานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้และแก้ไขเนื้อหาในวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญาโทมหาบัณฑิตในครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ ที่คอยให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกคนที่เกี่ยวข้องของหน่วยโลหิต สภากาชาดไทยและเจ้าหน้าที่หน่วยทารกแรกเกิด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในการเก็บตัวอย่างเลือดทั้งในเด็กแรกเกิดและในประชากรไทย ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมถึงผู้ป่วยที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านและพี่ๆในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาทางคลินิก ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ตลอดจน ดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษากระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัวเป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสทางการศึกษาที่มีคุณค่า รวมทั้งสนับสนุน ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
สารบัญแผนภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
คำถามของการวิจัย.....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐาน.....	4
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	5
คำสำคัญ.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7
เด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลือง.....	7
กลไกการเกิดและกำจัดบิลิรูบิน.....	7
ความผิดปกติเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของบิลิรูบิน.....	8
สาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลือง.....	10
โรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน <i>UGT1A1</i>	15
ยีน <i>Uridine glucuronosyltransferase1A1 (UGT1A1)</i>	16
ลักษณะอาการทางคลินิก.....	18
การวินิจฉัยอาการตัวเหลืองโดยการตรวจวัดปริมาณบิลิรูบินในกระแสเลือด.....	19

	หน้า
การรักษาอาการตัวเหลือง.....	19
การป้องกันภาวะตัวเหลืองในเด็ก.....	21
อุบัติการณ์ของการเกิดโรค.....	22
การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นในการสังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอ.....	22
หลักการพื้นฐานของ Polymerase Chain Reaction (PCR).....	23
หลักการพื้นฐานของ Real-time PCR แบบ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).....	25
การวิเคราะห์ Melting curve analysis.....	26
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
รูปแบบการวิจัย.....	28
ประชากรศึกษา.....	28
เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	30
การเก็บตัวอย่าง.....	33
การสกัดดีเอ็นเอ.....	33
การเตรียม Positive control ด้วยวิธี cloning.....	34
การออกแบบไพรเมอร์.....	36
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR.....	39
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....	40
การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์.....	41
การทำ real – time PCR ด้วย Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).....	41
การวิเคราะห์ผลการทดลองจากการทำ Real – time PCR ด้วย FRET.....	42
การตรวจสอบข้อมูล.....	43
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	43
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	45
ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR.....	45
ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing.....	46
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	50

ผลการตรวจการกลายพันธุ์บริเวณ TA repeat ด้วยเทคนิค Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).....	57
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	61
รายการอ้างอิง.....	66
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก.....	73
ภาคผนวก ข.....	76
ภาคผนวก ค.....	79
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR และขนาดผลิตภัณฑ์.....	39
2 แสดงสารเคมีและปริมาณในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....	39
3 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน TATA box.....	40
4 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน 211G>A.....	40
5 แสดงลำดับเบสของ primer และ probe บริเวณ promoter ที่ใช้ในการทำ Real – time PCR.....	41
6 แสดงสารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการทำ Real – time PCR บริเวณ promoter.....	42
7 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ Real – time PCR ในส่วน promoter.....	42
8 แสดงข้อมูลทางสถิติของเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและได้รับการส่องไฟ รักษา.....	51
9 แสดงค่าความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการ ตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษาและกลุ่มคนไทยปกติ.....	50
10 แสดงค่าความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการ ตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษาโดยไม่ทราบสาเหตุและกลุ่มคนไทยปกติ.....	54
11 แสดงสาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลืองกับการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง TA repeat และ 211G>A.....	56
12 แสดงค่า Tm ในการแยกแต่ละจีโนไทป์.....	58

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงวิธีการสลายตัวของฮีม.....	8
2 แผนภาพแสดงการเปลี่ยน NADPH เป็น NADP โดยมีเอนไซม์ G6PD เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา.....	12
3 แผนภาพแสดงชนิดของธาตุสี่เหลี่ยมและลักษณะของแอลฟาฮีม.....	13
4 แผนภาพแสดงรูปแบบของยีน <i>UGT1A1</i>	17
5 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการส่งไฟรีกษา.....	20
6 หลักการทำงานของ Real – time PCR แบบ FRET.....	25
7 แสดงการวัด fluorescence จากผลิตภัณฑ์ PCR.....	27
8 ผลการ BLAST ของ <i>UGT1A1_F</i> เทียบกับในฐานข้อมูล.....	37
9 ผลการ BLAST ของ <i>UGT1A1_Rpromoter</i> เทียบกับในฐานข้อมูล.....	37
10 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ <i>UGT1A1_F</i> กับ <i>UGT1A1_Rpromoter</i>	38
11 ผลการ BLAST ของ <i>UGT1A1_F2</i> เทียบกับในฐานข้อมูล.....	38
12 ผลการ BLAST ของ <i>UGT1A1_2R1</i> เทียบกับในฐานข้อมูล.....	38
13 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ <i>UGT1A1_F2</i> กับ <i>UGT1A1_2R1</i>	39
14 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของยีน <i>UGT1A1</i> บริเวณ promoter.....	45
15 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของยีน <i>UGT1A1</i> บริเวณ exon1.....	45
16 ผลการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง TA box บริเวณ promoter กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล.....	46
17 ผลการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง 211G>A บริเวณ exon1 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล.....	46
18 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของยีน <i>UGT1A1</i> บริเวณ TA repeat แสดงลักษณะจีโนไทป์ 3 รูปแบบ.....	47
19 แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน <i>UGT1A1</i> บริเวณ TA box ในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและในกลุ่มคนไทยปกติ.....	48

ภาพที่	หน้า
20 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของยีน <i>UGT1A1</i> บริเวณ exon1 ตำแหน่ง 211 G>A แสดงลักษณะจีโนไทป์ 3 รูปแบบ.....	49
21 แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน <i>UGT1A1</i> บริเวณ 211G>A ในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและในกลุ่มคนไทยปกติ.....	50
22 แสดงการตัดช่วงอุณหภูมิเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ melt curve genotyping โดยมีพลาสติกเป็น template.....	57
23 แสดงผลของการกลายพันธุ์ของทั้ง 3 จีโนไทป์โดยใช้เทคนิค FRET.....	57
24 แสดงการตัดช่วงอุณหภูมิเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ melt curve genotyping โดยใช้ DNA ของเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและประชากรไทยเป็น template.....	59
25 แสดงผลของการกลายพันธุ์ของทั้ง 3 จีโนไทป์ของตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค FRET.....	59

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่	หน้า
1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย.....	5

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALT	Alanine Aminotransferase
AST	Aspartate Aminotransferase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
μl	Microliter
μM	Micromolar
ml	Mililiter
mM	Milimolar
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>p</i> – value	Probability Value
NaOAc	Sodium acetate
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
SGOT	Serum glutamic oxaloacetic transaminase
SGPT	Serum glutamic pyruvic transaminase
<i>UGT1A1</i>	<i>Uridine Glucuronosyltransferase</i>

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัญหาที่พบได้บ่อยในเด็กแรกเกิด คืออาการตัวเหลือง ซึ่งอาการนี้เกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น การไม่เข้ากันของหมู่เลือด ABO, การทำงานผิดปกติของเอนไซม์ glucose - 6 - phosphate dehydrogenase (G6PD), การดื่มนมแม่, Gilbert syndrome และ Crigler - Najjar syndrome เป็นต้น [1 - 4] โดยสาเหตุที่ทำให้เด็กมีอาการตัวเหลืองเกิดจากการสะสมของบิลิรูบินในเลือดมากเกินไป ถ้าหากมีการสะสมของบิลิรูบินสูงมากอาจจะทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนทางสมอง (Kernicterus) เกิดอาการชัก และมีการทำลายเนื้อสมองอย่างถาวร นอกจากนี้ยังพบว่า 25% ของเด็กที่มีความผิดปกติของเอนไซม์นี้ มีโอกาสเสี่ยงในการเกิดภาวะ I.Q. ต่ำ หรือ ความฉลาดลดลงได้ รวมถึงอาจเกิดภาวะการได้ยินผิดปกติ (Sensory neural hearing loss) ความพิการทางสมอง และมีความผิดปกติต่อระบบประสาท [4] นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายนอกที่สนับสนุนให้เกิดอาการตัวเหลือง เช่น การรับประทานยา ปริมาณแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ อายุ เพศ เป็นต้น [5]

ในการกำจัดบิลิรูบินออกจากร่างกายทำได้โดยอาศัยเอนไซม์ Uridine glucuronosyltransferase (UGT) เอนไซม์นี้สร้างจากยีน *UGT1A1* สามารถแบ่งได้ เป็น 3 families คือ *UGT1*, *UGT2* และ *UGT8* โดยที่ *UGT1* family ประกอบด้วย isoform ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา Glucuronidation ของบิลิรูบิน ควินิด และฟีนอล ซึ่ง isoform *UGT1A1* เป็นรูปที่มีความจำเพาะต่อบิลิรูบิน ในเด็กที่มีการทำงานของเอนไซม์ *UGT1A1* ผิดปกติทำให้มีการกำจัดบิลิรูบินได้ไม่ดี จึงมีอาการตัวเหลืองอันเกิดจากการสะสมของบิลิรูบินชนิด unconjugated ในเลือด การทำงานผิดปกติของเอนไซม์ *UGT1A1* ส่วนหนึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* บริเวณ promoter ซึ่งมักพบ TATA box บริเวณ promoter ของยีนเป็น 7 ซ้ำของ TA ($(A(TA)_7TAA)$) หรือเรียกว่า *UGT1A1*28* นอกจากนี้ยังสามารถพบ 5 ซ้ำของ TA ($(A(TA)_5TAA)$) หรือเรียกว่า *UGT1A1*36*, และ 8 ซ้ำของ TA ($(A(TA)_8TAA)$) หรือเรียกว่า *UGT1A1*37* ในชาวแอฟริกัน [6] ในคนปกติจะพบ 6 ซ้ำของ TA ($(A(TA)_6TAA)$) หรือเรียกว่า *UGT1A1*1* ซึ่งในเด็กแรกเกิดช่วงระหว่าง 5 วันแรกมักพบอาการตัวเหลืองประมาณ 50 % และจะมีการทำงานของเอนไซม์ที่สมบูรณ์ภายใน 3 เดือน ความผิดปกติของเอนไซม์ *UGT1A1* ก่อให้เกิด Gilbert syndrome และ Crigler-

Najjar syndrome ซึ่ง Gilbert syndrome เกิดจากเอนไซม์ทำงานผิดปกติเล็กน้อย ส่วน Crigler-Najjar แบ่งได้ 2 ชนิดโดยชนิดที่ 1 มีความรุนแรงมากกว่าชนิดที่ 2 [5] นอกจากการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* บริเวณ promoter แล้ว ยังพบว่ามักมีการกลายพันธุ์บริเวณ 211G>A ของ exon1 โดยเปลี่ยนจากกรดอะมิโนไกลซีนเป็นอาร์จินีน ที่ตำแหน่ง 71 (G71R) [7] ซึ่งส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ *UGT1A1* ลดลงและกระตุ้นการก่อให้เกิดการสะสมของบิลิรูบินในเลือดมากขึ้น [8] ในการรักษาเด็กที่มีอาการตัวเหลืองสามารถรักษาได้ด้วยวิธีดังนี้ การรับประทานยา Phenobarbital และการส่องไฟรักษา (Phototherapy) หรือ กำจัดบิลิรูบินออกจากร่างกายโดยตรงด้วยการเปลี่ยนถ่ายเลือด (Blood transfusion) [4]

อุบัติการณ์ในการเกิดอาการตัวเหลืองในแต่ละเชื้อชาติจะมีความแตกต่างกัน เช่น ในชาว Caucasian มีความถี่ของอัลลีล A(TA)_nTAA เท่ากับ 0.36 – 0.39 ในชาวแอฟริกันมีความถี่ของอัลลีล A(TA)_nTAA เท่ากับ 0.43 ในชาวมอลเดเชียและชาวญี่ปุ่นมีความถี่ของอัลลีล A(TA)_nTAA เท่ากับ 0.16 และ 0.15 ตามลำดับ [6, 8, 9] การศึกษาหาความถี่ของอัลลีล 211G>A พบว่าในประชากรญี่ปุ่นมีความถี่ของอัลลีลเท่ากับ 0.16 ในประชากรมาเลเซียเท่ากับ 0.03 [9, 10] และไม่เคยพบการกลายพันธุ์นี้ในประชากรแอฟริกันและไม่มีการรายงานการกลายพันธุ์ของตำแหน่งนี้ในชาว Caucasian [11] นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ในครอบครัวชาวไทยครอบครัวหนึ่ง ซึ่งพบว่ามีกรรมพันธุ์ของกรดอะมิโนลิซีนเป็นฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่ง 83 (F83L) [12] ในปัจจุบันมีการศึกษาสาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลืองอย่างจริงจังแต่ยังไม่มีผู้ใดทราบถึงสาเหตุที่แท้จริงในการเกิดพยาธิสภาพของอาการตัวเหลือง

จากตัวอย่างการศึกษาสาเหตุของ Gilbert syndrome พบว่ามีความสัมพันธ์กับพันธุกรรมของผู้ป่วย โดยมีการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ sequencing, fragment analysis, high resolution melting curve analysis (HRM) และยังมีการใช้เทคนิค Real – time PCR แบบ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) ด้วย เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีความไว มีความจำเพาะสูงและยังช่วยลดการปนเปื้อน [13, 14]

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาหาความถี่ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TATA box และ 211G>A ในกลุ่มคนไทยปกติและกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลือง เพื่อนำข้อมูลที่ได้มา

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางพันธุกรรมกับความเสี่ยงในการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง

คำถามของการวิจัย

1. ความถี่ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TATA box ในกลุ่มคนไทยปกติและกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษามีความแตกต่างกันหรือไม่
2. ความถี่ของยีน *UGT1A1* บริเวณ 211G>A ในกลุ่มคนไทยปกติและกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษามีความแตกต่างกันหรือไม่
3. ความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* มีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดอาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษาหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาความถี่ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TATA box ของ promoter โดยเปรียบเทียบกลุ่มคนไทยปกติและกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษา
2. เพื่อศึกษาหาความถี่ของยีน *UGT1A1* บริเวณ 211G>A ของ exon1 โดยเปรียบเทียบกลุ่มคนไทยปกติและกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษา
3. เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* กับการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง โดยเปรียบเทียบกลุ่มคนไทยปกติและกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษา
4. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาลักษณะของ TATA box บริเวณ promoter ของยีน *UGT1A1* ด้วยวิธี Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

สมมติฐาน

1. ความถี่ของ TA บริเวณ promoter ของยีน *UGT1A1* ในกลุ่มคนไทยปกติและกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองมีความแตกต่างกัน โดยในกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองจะมีความถี่ของ TA บริเวณ promoter ที่ผิดปกติมากกว่าในกลุ่มคนไทยปกติ
2. ความถี่ของ 211G>A บริเวณ exon1 ของยีน *UGT1A1* ในกลุ่มคนไทยปกติและกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีความแตกต่างกัน โดยในกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองจะมีความถี่ของ 211G>A ที่ผิดปกติมากกว่าในกลุ่มคนไทยปกติ
3. ความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* มีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง โดย กลุ่มที่มี TATA box ยาวกว่าปกติจะมึการทำงานของเอนไซม์ *UGT1A1* ลดลง และ กลุ่มที่มีกรดอะมิโนอาร์จินีนจะมึการทำงานของเอนไซม์น้อยกว่ากลุ่มที่มีกรดอะมิโนไกลซีน
4. สามารถพัฒนาวิธีการตรวจ TA repeat บริเวณ promoter ด้วยเทคนิค FRET

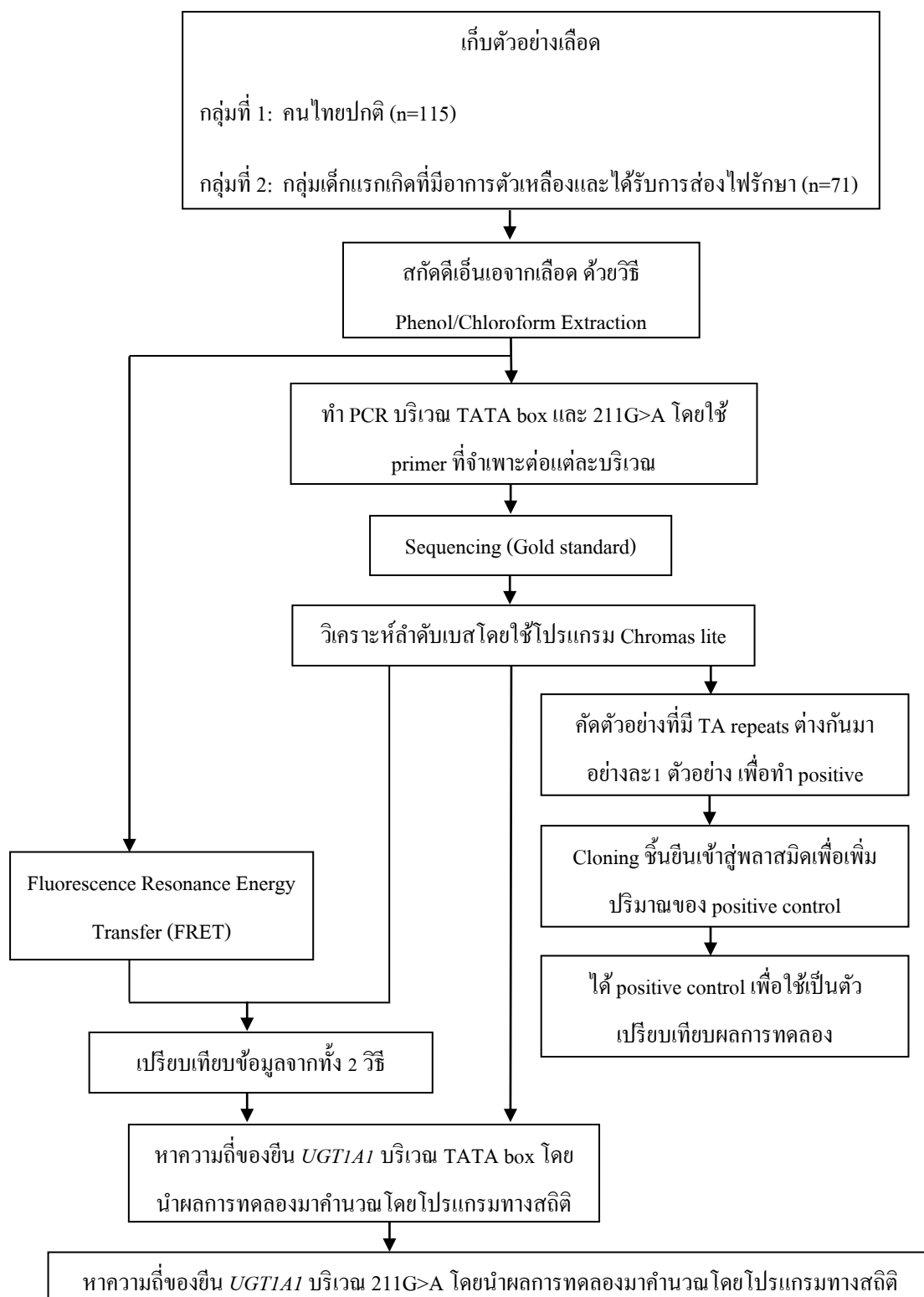
ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจากตัวอย่างในประชากรไทยเป็นตัวอย่างเลือดที่เหลือจากศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่เปิดเผยข้อมูล ทำให้ขาดข้อมูลทางคลินิก จึงทำให้เกิดอุปสรรคแก่การวิเคราะห์ข้อมูล

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Wild-type คือ ลักษณะทางพันธุกรรมบริเวณ TATA box ของ promoter ที่มี TA ซ้ำกัน 6 คู่ เป็น homozygous type โดยใช้เครื่องหมายแทนดังนี้ $A(TA)_6TAA$

กรอบแนวความคิดในการวิจัย



แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

คำสำคัญ

Uridine glucuronosyltransferase (UGT1A1)

TATA box

211G>A

Adult Thai population

Neonatal jaundice

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงความถี่ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TATA box และ 211G>A ในคนไทยปกติและในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลือง
2. ทำให้ทราบถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ต่อความเกี่ยวข้องในการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง
3. นำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยไปประกอบการรักษาและป้องกันการเกิดอาการตัวเหลือง
4. สามารถพัฒนาเทคนิคในการตรวจการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง TA repeat บริเวณ promoter ของยีน *UGT1A1* ด้วยเทคนิค FRET
5. ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 เรื่อง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเลือด
2. สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol – Chloroform Extraction
3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)
4. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR โดยใช้ Agarose gel electrophoresis
5. ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง TATA box และ 211G>A ด้วยวิธี direct sequencing
6. พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง TATA box ด้วยเทคนิค real – time PCR โดยใช้ Fluorescence Energy Transfer (FRET)
7. เก็บรวบรวมข้อมูลและทำการวิเคราะห์ผล

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลือง

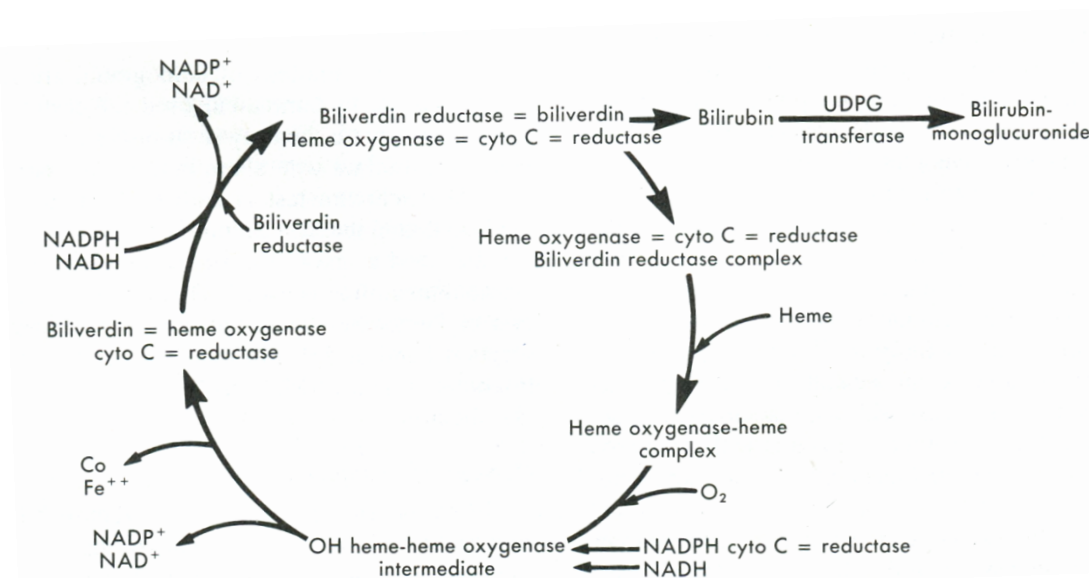
อาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิด (Neonatal jaundice) เกิดจากการสะสมของบิลิรูบินในกระแสเลือด ซึ่งบิลิรูบินเป็นสารสีเหลืองที่เกิดจากการสลายตัวของเม็ดเลือดแดง โดยอาการตัวเหลืองเป็นอาการที่พบได้บ่อยในเด็กแรกเกิดและยังเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องทำการวินิจฉัย และต้องรักษาในระยะเวลาที่เหมาะสม ถ้าไม่ได้รับการรักษาในเวลาที่เหมาะสม เด็กอาจเกิดความผิดปกติของบางอวัยวะ หรืออาจจะสูญเสียอวัยวะจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ในบางรายอาจเกิดการสะสมของบิลิรูบินสูงจนส่งผลกระทบต่อการทำงานของสมอง ในช่วงอายุ 1 – 2 สัปดาห์แรกเด็กแรกเกิดที่คลอดครบกำหนดจะพบอาการตัวเหลืองร้อยละ 25 – 50 และจะพบมากขึ้นในเด็กที่คลอดก่อนกำหนด

ในเด็กแรกเกิดจะอยู่โรงพยาบาล 2 – 3 วัน เพื่อให้ให้แพทย์สังเกตอาการตัวเหลือง โดยอาการตัวเหลืองจะเริ่มสังเกตได้จากใบหน้าของเด็ก แล้วจะเริ่มเกิดอาการเหลืองไปที่ตัว ขา และเท้า แต่การสังเกตนี้ไม่สามารถบอกได้อย่างละเอียด แพทย์จึงต้องทำการเจาะเลือดเพื่อดูระดับของบิลิรูบินในกระแสเลือดและทำการประเมินว่าเด็กมีอาการตัวเหลืองในระดับใด เพื่อที่จะทำการรักษาได้อย่างถูกต้อง

กลไกการเกิดและการกำจัดบิลิรูบิน

เมตาบอลิซึมของบิลิรูบินเกิดขึ้นในหลายเนื้อเยื่อ บิลิรูบินเป็นสารสีเหลืองที่ไม่ละลายน้ำ เกิดจากการสลายตัวของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงซึ่งจะอยู่ในรูป unconjugated bilirubin การสลายตัวของเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุส่วนใหญ่จะเกิดที่ตับ ม้าม ต่อม้ำเหลืองและไขกระดูก (reticuloendothelial system) และได้จากการสลายของ hemoprotein ที่ไม่ใช่ฮีโมโกลบิน เช่น คีโตะเลส มัยโอโกลบิน ซัยโตโครม และเพอร์รอกซิเดส เมื่อมีการสลายตัวของเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบินจะถูกปล่อยออกมาและถูกสลายด้วยเอนไซม์ heme oxygenase ทำให้ porphyrin ring แตกออกเป็น

biliverdin ซึ่งมีสีเขียวและคาร์บอนมอนอกไซด์ จากนั้น biliverdin จะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ biliverdin reductase จะได้บิลิรูบิน จากนั้นบิลิรูบินจะจับกับอัลบูมินในกระแสเลือดเพื่อส่งเข้าสู่ตับ และจะถูกทำให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น โดยการ conjugate กับ glucuronic acid 2 โมเลกุล ซึ่งมีเอนไซม์ uridine glucuronosyltransferase (UGT) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อบิลิรูบิน conjugate กับ glucuronic acid 2 โมเลกุลจะได้ bilirubin diglucuronide แสดงคังภาพที่ 1 ซึ่งอยู่ในรูปที่พร้อมทำการขับออกทางน้ำดีและเปลี่ยนแปลงที่ลำไส้ ส่วนใหญ่ขับออกทางอุจจาระ และส่วนน้อยขับออกทางปัสสาวะ บิลิรูบินบางส่วนที่ถูกเปลี่ยนเป็น unconjugated bilirubin ในลำไส้จะถูกดูดซึมกลับผ่านทาง portal system [15]



ภาพที่ 1 แสดงวิถีการสลายตัวของฮีม [16]

ความผิดปกติเกี่ยวกับเมตาบอลิซึมของบิลิรูบิน

ในภาวะปกติ บิลิรูบินในเลือดเกือบทั้งหมดเป็นชนิด unconjugated bilirubin โดยมีค่าประมาณ 0.3 – 1.0 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ถ้าหากมีปริมาณของบิลิรูบินรวม (total bilirubin) สะสมในเลือดมากกว่า 2.0 – 3.0 มิลลิกรัม/เดซิลิตร จะทำให้เกิดภาวะดีซ่าน (jaundice) ซึ่งจะมีการสะสมของบิลิรูบินบริเวณเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ผิวหนัง เยื่อของลูกตา และมีอาการตัวเหลืองตาเหลือง และถ้าระดับของบิลิรูบินในเลือดชนิด conjugated bilirubin สูงกว่า 0.5 มิลลิกรัม/เดซิลิตร จะตรวจพบ

บิลิรูบินในปัสสาวะร่วมด้วย โดยภาวะที่มีปริมาณบิลิรูบินในเลือดสูง (hyperbilirubinemia) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ unconjugated hyperbilirubinemia และ conjugated hyperbilirubinemia

ชนิด unconjugated hyperbilirubinemia

unconjugated hyperbilirubinemia เกิดจากมีการสะสมของบิลิรูบินที่ยังไม่ได้ conjugation กับ glucuronic acid โดยภาวะนี้อาจเกิดจาก มีการสร้างบิลิรูบินมากขึ้น เช่น ภาวะที่เม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) หรือมีการสลายตัวของเม็ดเลือดแดงก่อนกำหนดเนื่องจากเม็ดเลือดแดงมีความผิดปกติ (ineffective erythropoiesis) หรือ อาจเกิดจากการทำงานของตับในการกำจัด unconjugated bilirubin เกิดความผิดปกติ ซึ่ง unconjugated bilirubin สามารถส่งผ่าน blood brain barrier ได้ และทำให้ส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบประสาท เกิดการสะสมของบิลิรูบินในนิวเคลียสของสมองทำให้สมองเกิดการอักเสบ (kernicterus) โดยปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิด unconjugated hyperbilirubinemia ในเด็กแรกเกิดสามารถแบ่งตามปัจจัยการเกิดได้ 3 ปัจจัย

1. ปัจจัยจากแม่ : เชื้อชาติ, โรคแทรกซ้อนอื่นๆ เช่น การไม่เข้ากันของหมู่เลือด ABO, การไม่เข้ากันของหมู่ Rh, โรคเบาหวาน , การให้นมแม่ซึ่งประกอบไปด้วยสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ uridine glucuronosyltransferase
2. ปัจจัยที่เกิดจากระหว่างช่วง 5 เดือนก่อนคลอดและ 1 เดือนหลังคลอด : เกิดบาดแผล เช่น เลือดออกใต้ผิวหนัง (ecchymoses), ก้อนเลือดใต้หนังศีรษะทารก (cephalhematoma) , การติดเชื้อไวรัส หรือเชื้อแบคทีเรีย ตั้งแต่ในครรภ์ เช่น ติดเชื้อหัดเยอรมัน ซิฟิลิส หรือเชื้อซีเอ็มวี (CMV, Cytomegalovirus)
3. ปัจจัยจากเด็ก : คลอดก่อนกำหนด, เกิดจากความผิดปกติทางด้านพันธุกรรม เช่น Crigler – Najjar syndrome, Gilbert syndrome , เกิดจากความผิดปกติของเอนไซม์ เช่น glucose – 6 – phosphate dehydrogenase (G6PD), pyruvate kinase deficiency, hexokinase deficiency, congenital erythropoietic porphyria , เม็ดเลือดแดงผิดปกติ เช่น ความผิดปกติของรูปร่างเม็ดเลือดแดง (Spherocytosis หรือ Elliptocytosis),

ภาวะที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงมากเกินไป (polycythemia) , เกิดจากการได้ดื่มนมแม่น้อยเกินไป

ชนิด conjugated hyperbilirubinemia

Conjugated hyperbilirubinemia เป็นภาวะที่มีการสะสมของ conjugated bilirubin ในกระแสเลือดมากเกินไป ซึ่งแสดงว่าการทำงานของตับและกระบวนการขับบิลิรูบินออกมีความผิดปกติจนทำให้ปริมาณ conjugated bilirubin มีปริมาณสูงจนเกิดการย้อนกลับเข้าสู่ระบบการไหลเวียนของเลือด โดยปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิด conjugated hyperbilirubinemia เช่น เกิดจากการติดเชื้อ ได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ ท่อน้ำดีตีตัน (biliary atresia), galactosemia, cystic fibrosis [17]

สาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลือง

1. ภาวะตัวเหลืองปกติ (Physiological jaundice)

ภาวะตัวเหลืองปกติ (Physiological jaundice) เป็นภาวะที่เกิดจากเด็กแรกเกิดมีการทำงานของตับยังไม่สมบูรณ์เต็มที่และมีเม็ดเลือดแดงอายุสั้นกว่าในผู้ใหญ่ทำให้มีปริมาณของบิลิรูบินสูงในระดับหนึ่งและจะไม่สูงขึ้นเร็ว โดยอาการเหล่านี้มักเกิด 2 – 4 วันหลังจากคลอด เด็กจะไม่ซึม และไม่มีอาการอื่นๆแทรกซ้อน เช่น ภาวะติดเชื้อ โดยทั่วไปอาการตัวเหลืองจะหายไปภายใน 7 วัน แต่ในเด็กที่คลอดก่อนกำหนด อาการตัวเหลืองจะหายไปภายใน 2 สัปดาห์ [18]

2. ภาวะตัวเหลืองทางพยาธิวิทยา (Pathophysiological jaundice)

อาการตัวเหลืองที่ไม่ปกติเกิดได้จากหลายสาเหตุ โดยเด็กจะมีอาการตัวเหลืองช่วง 1 - 2 วันแรกหลังจากคลอดและตัวเหลืองขึ้นอย่างรวดเร็ว เด็กจะมีอาการซึมและเมื่อทำการตรวจระดับของบิลิรูบินในเลือดจะมีปริมาณสูงกว่าระดับปกติ ซึ่งแพทย์จะทำการวิเคราะห์หาสาเหตุ ซึ่งจะแยกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เด็กที่อาการตัวเหลืองภายใน 7 วัน และเด็กที่มีอาการตัวเหลืองหลัง 7 วัน นอกจากนี้เด็กที่มีอาการตัวเหลืองภายใน 7 วัน ยังสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือเกิดอาการเหลืองในวันแรก และเกิดอาการเหลืองในวันที่ 2 ถึงวันที่ 7 ถ้าเด็กมีอาการตัวเหลืองหลังอายุ 7 วันไปแล้ว

จะต้องมีการตรวจหาสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการตัวเหลืองอื่นๆ เช่น อาจเกิดจากไวรัสตับอักเสบ หรือ อาจมีการตีบตันของท่อน้ำดี เป็นต้น

2.1 อาการตัวเหลืองจากการสลายตัวของเม็ดเลือดแดง (hemolytic causes)

2.1.1 การไม่เข้ากันของหมู่เลือด ABO (ABO incompatibility)

สาเหตุหลักที่พบบ่อยของการเกิดหมู่เลือดของแม่และลูกไม่ตรงกันคือ ลูกมีหมู่เลือด A หรือ B ที่เกิดจากแม่ที่มีหมู่เลือด O โดยแม่จะสร้างแอนติบอดีแล้วส่งมาสู่ลูกโดยผ่านทางรก สารดังกล่าวจะจับกับผนังของเซลล์เม็ดเลือดแดงของลูก ซึ่งร่างกายของลูกมีกลไกในการกำจัดเม็ดเลือดแดงเหล่านี้จึงทำให้เม็ดเลือดแดงของลูกแตก

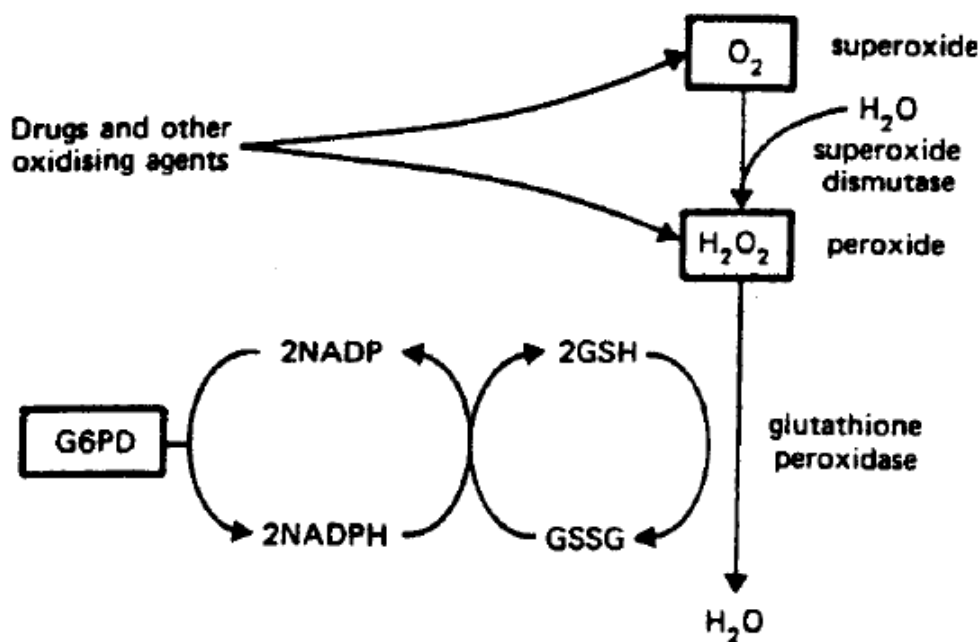
2.1.2 การไม่เข้ากันของหมู่เลือด Rh (Rhesus incompatibility)

การไม่เข้ากันของหมู่เลือด Rh มักเกิดในทารกที่มีหมู่เลือด Rh+ และมารดามีหมู่เลือด Rh- โดยปฏิกิริยาส่วนใหญ่จะเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ครรภ์ที่สองเป็นต้นไป เนื่องจากมารดาจะต้องเคยได้รับเลือด Rh+ (antigen D) จากการตั้งครรภ์ในครั้งแรกมาก่อน แล้วถูกกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดี (anti-D) ขึ้น ซึ่งเป็นชนิด IgG และสามารถผ่านรกเข้าไปทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของทารกในครรภ์ต่อไป วิธีการป้องกันไม่ให้มารดาสร้างแอนติบอดีต่อ Rh สามารถทำได้โดยการฉีด anti-Rh immunoglobulin (RhIg) ให้แก่มารดาที่มี Rh- โดยฉีดภายใน 72 ชั่วโมงหลังคลอดทุกๆ การตั้งครรภ์ RhIg จะไปทำลายเม็ดเลือดแดง Rh+ ของทารกที่ผ่านเข้ามาในกระแสเลือดของมารดา ก่อนที่จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สร้างแอนติบอดี [19]

2.1.3 ภาวะพร่องเอนไซม์ glucose -6-phosphate dehydrogenase(G6PD deficiency)

เอนไซม์ glucose - 6 - phosphate dehydrogenase (G6PD) เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการของวิถี Pentose Phosphate Pathway (PPP) ของน้ำตาลกลูโคส โดยเปลี่ยนกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์ให้อยู่ในรูปรีดิวซ์โดยใช้ไฮโดรเจนไอออน (H^+) จาก NADPH ซึ่ง NADPH เกิดจาก nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) โดยมีเอนไซม์ G6PD เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงดังภาพที่ 2 ซึ่งเอนไซม์นี้ส่งผลต่อการทำลายสารอนุมูลอิสระ (Oxidants) ต่าง ๆ

เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่เป็นพิษต่อเซลล์ในร่างกายโดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นเอนไซม์ G6PD จึงเป็นเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันเม็ดเลือดแดงจากการทำลายของสารอนุมูลอิสระ คนที่เกิดภาวะพร่องเอนไซม์ชนิดนี้แล้วจะทำให้เกิดอาการเม็ดเลือดแดงแตก (Hemolysis) ได้ง่าย โดยภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบ X-linked recessive โรคนี้จึงพบในผู้ชายได้มากกว่าผู้หญิง [20, 21] ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD มักพบบ่อยในประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งภาวะพร่องของเอนไซม์นี้เป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ทารกเกิดความผิดปกติและตายเนื่องจากอาการตัวเหลืองได้ [22]



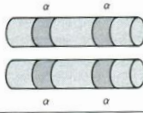
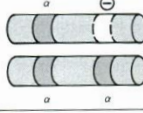
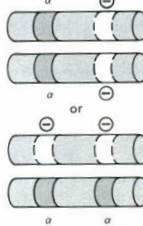
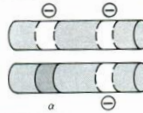
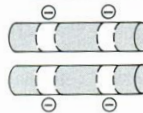
ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงการเปลี่ยน NADPH เป็น NADP โดยมีเอนไซม์ G6PD เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา [21]

โดยปกติแล้วอาการตัวเหลืองที่มีสาเหตุจากภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD จะทำให้เกิดเม็ดเลือดแดงแตก (hemolysis) นอกจากนี้ความเสี่ยงในการเกิดอาการตัวเหลืองอาจเกิดจากอาการตัวเหลืองร่วมกับการเกิดภาวะพร่อง G6PD หรืออาจเกิดจากสาเหตุอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับ G6PD เช่น การสร้างบิลิรูบินชนิด conjugate ได้น้อยลง ซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะของ promoter ของยีน *UGT1A1* [7] หรือการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ตำแหน่ง 211G>A บริเวณ exon1 ร่วมกับภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD [23]

2.1.4 โรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia)

โรคธาลัสซีเมียเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมทำให้มีการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเม็ดเลือดผิดปกติ จึงทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ แดงง่าย ถูกทำลายง่าย ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้อาจมีเลือดจาง โรคนี้อพบได้ทั้งหญิงและชายปริมาณเท่าๆ กัน ถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่ทางพันธุกรรม

ธาลัสซีเมียสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แอลฟาธาลัสซีเมียและเบต้าธาลัสซีเมีย โดยถ้ามีความผิดปกติของสายแอลฟาจะเรียกว่า แอลฟาธาลัสซีเมีย และถ้ามีความผิดปกติของสายเบต้าจะเรียกว่า เบต้าธาลัสซีเมีย [24]

Phenotype	Genotype	Comment
Normal		Hematologically normal
α -Thalassemia-2 trait		Hematologically normal but has Hb Bart's (1 α) in the newborn period (1%-2%)
α -Thalassemia-1 trait		Mild microcytic hypochromic anemia with 2%-10% Hb Bart's in the newborn period
Hemoglobin H disease		Moderately severe anemia with 20%-30% Hb Bart's as a newborn
Hydrops fetalis secondary to α -thalassemia		> 80% Hb Bart's and usually incompatible with long-term survival

α = Normal Alpha Gene
 \ominus = Absent or Nonfunctional Alpha Gene

ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงชนิดของธาลัสซีเมียและลักษณะของแอลฟาอิน [25]

2.2 อาการตัวเหลืองที่ไม่ได้เกิดจากการสลายของเม็ดเลือดแดง (non - hemolytic causes)

2.2.1 Hepatocellular jaundice

ภาวะนี้เกิดจากเซลล์ตับถูกทำลายด้วยสาเหตุต่างๆ เช่น ไวรัสตับอักเสบ A, B, C, D, G รับประทานยา เช่น Carbon tetrachloride, ยาชนิดต่างๆ เช่น การได้รับยา paracetamol มากเกินไป, ดื่มแอลกอฮอล์มากเป็นเวลานานจนตับเสียหรืออาจเกิดจากภาวะช็อค

ภาวะต่างๆนี้จะทำให้มีการตายของเซลล์ตับหรือเซลล์ตับขาดพลังงานจนไม่สามารถจับบิลิรูบินชนิด conjugated ได้ รวมทั้งทำให้กระบวนการ conjugation ลดลงด้วย การเกิดการอักเสบของตับจะทำให้ผู้ป่วยมีอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ผู้ป่วยอาจมีอาการจุกแน่นชายโครงขวาเนื่องจากอาการตับโต ลักษณะของผู้ป่วยกลุ่มนี้คือจะมีการเพิ่มของระดับเอนไซม์ AST(SGOT) และ ALT(SGPT) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึง hepatocellular injury

2.2.2 Obstructive Jaundice

เป็นการอุดตันของทางเดินน้ำดี ซึ่งจะให้มีอาการตัวเหลืองโดยเกิดการอุดตันของทางเดินน้ำดีส่วนที่อยู่นอกตับ สาเหตุอาจเกิดจากก้อนนี้ ก้อนเนื้องอกหรือการตีตันของทางเดินน้ำดี (Biliary atresia) การอุดตันของทางเดินน้ำดีจะทำให้บิลิรูบินชนิด conjugated ไม่สามารถขับออกมาได้ จึงล้นกลับไปในกระแสเลือดส่งผลทำให้เกิดอาการตัวเหลืองได้ นอกจากนี้การอุดตันจะมีผลทำให้การทำงานของตับผิดปกติ ความสามารถในการ uptake และ conjugation ลดลง ทำให้บิลิรูบินชนิด unconjugated เพิ่มขึ้นด้วย ทำให้ไม่สามารถใช้อัตราส่วนของบิลิรูบินชนิด conjugated และ unconjugated แยก obstructive กับ hepatocellular jaundice ได้ หากมีการอุดตันโดยสมบูรณ์จะทำให้ไม่มีน้ำดีออกมาในอุจจาระ ทำให้อุจจาระสีซีด และตรวจไม่พบ urobilinogen ในปัสสาวะ [26]

2.2.3 Breastfeeding jaundice

เป็นภาวะที่ลำไส้ขับตัวเคลื่อนไปหวน้อยในเด็กแรกเกิดที่ยังรับนมแม่ได้น้อย เนื่องจากแม่มีน้ำนมไม่เพียงพอในช่วงแรกๆ จึงส่งผลทำให้มีการกั่งของน้ำดี ทำให้น้ำดีถูกดูดซึมเข้ากระแส

เลือดมากขึ้นจึงเกิดอาการตัวเหลือง แต่จะมีอาการดีขึ้นเมื่อให้ดูคนแม่บ่อยๆ ทั้งกลางวันและกลางคืน

2.2.4 Breast milk jaundice

เด็กบางคนอาจเกิดอาการตัวเหลืองจากนมแม่ โดยอาการจะแสดงเมื่อเด็กอายุหลังสัปดาห์ที่ 1 จนถึงสัปดาห์ที่ 2-3 หรืออาจนานกว่านั้น ซึ่งกลไกการเกิดอาการตัวเหลืองยังไม่แน่ชัดทั้งหมด แต่เมื่อลดองหุคนมแม่ 2-3 วัน จะมีปริมาณบิลิรูบินลดลงมาก เป็นการพิสูจน์ว่าภาวะตัวเหลืองเกิดจากนมแม่ หลังจากนั้นให้นมแม่ต่อได้ เพราะเด็กจะไม่เหลืองมากกว่าเดิม และมักจะไม่มีเกิดภาวะบิลิรูบินไปจับที่สมอง อาการของเด็กในภาวะนี้จะปกติ ไม่ซึม ภาวะนี้หากเหลืองมากจะดีขึ้นด้วยการส่องไฟรักษา

2.2.5 ความผิดปกติของเอนไซม์ Uridine glucuronosyltransferase (UGT1A1)

ความผิดปกติของเอนไซม์ UGT1A1 เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนบิลิรูบินจากสารที่ไม่ละลายน้ำไปเป็นสารที่ละลายน้ำและขับออกจากร่างกายได้ หากเอนไซม์นี้ผิดปกติ หรือหากมียา หรือสารชนิดอื่นมาแย่งจับ หรือขัดขวางการทำงานของเอนไซม์นี้จะทำให้บิลิรูบินไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่ขับออกได้ จึงมีสารบิลิรูบินคั่งอยู่ในเลือดจำนวนมาก โดยความผิดปกติของยีนนี้จะก่อให้เกิดโรค Crigler – Najjar syndrome และ Gilbert syndrome

โรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1*

1. โรค Crigler – Najjar syndrome

โรค Crigler – Najjar สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด คือ Crigler-Najjar Type I และ Crigler-Najjar Type II โดย Crigler-Najjar Type I เอนไซม์ UGT1A1 จะไม่สามารถทำงานได้เลย จะก่อให้เกิดโรคเนื้อเยื่อสมองเสื่อม และทำให้เด็กไม่สามารถเจริญเติบโตได้ มักมีอาการตัวเหลืองมาก มีอาการรุนแรงและเสียชีวิตตั้งแต่อายุ 1-2 ปี สามารถรักษาได้ด้วยการปลูกถ่ายตับใหม่ และการส่องไฟรักษาเพื่อลดปริมาณบิลิรูบินซึ่งช่วยได้เล็กน้อย โรคนี้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ

autosomal recessive และ Crigler-Najjar Type II เอนไซม์ UGT1A1 สามารถทำงานได้บางส่วน [27] ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนบิลิรูบินชนิด unconjugated เป็นบิลิรูบินชนิด conjugated ได้หมด ระดับบิลิรูบินชนิด unconjugated ในเลือดจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น อาจมีค่าสูงถึง 6 - 25 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ซึ่งมีการถ่ายทอดแบบ autosomal recessive เช่นกัน แต่พบได้น้อย ความผิดปกตินี้สามารถรักษาด้วยการกินยา Phenobarbital เพื่อช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 เพิ่มขึ้น และลดปริมาณ unconjugated bilirubin ลงหรืออาจทำการเปลี่ยนถ่ายเลือด (blood transfusion) เพื่อลดปริมาณบิลิรูบินโดยตรง [8, 28, 29]

2. โรค Gilbert syndrome

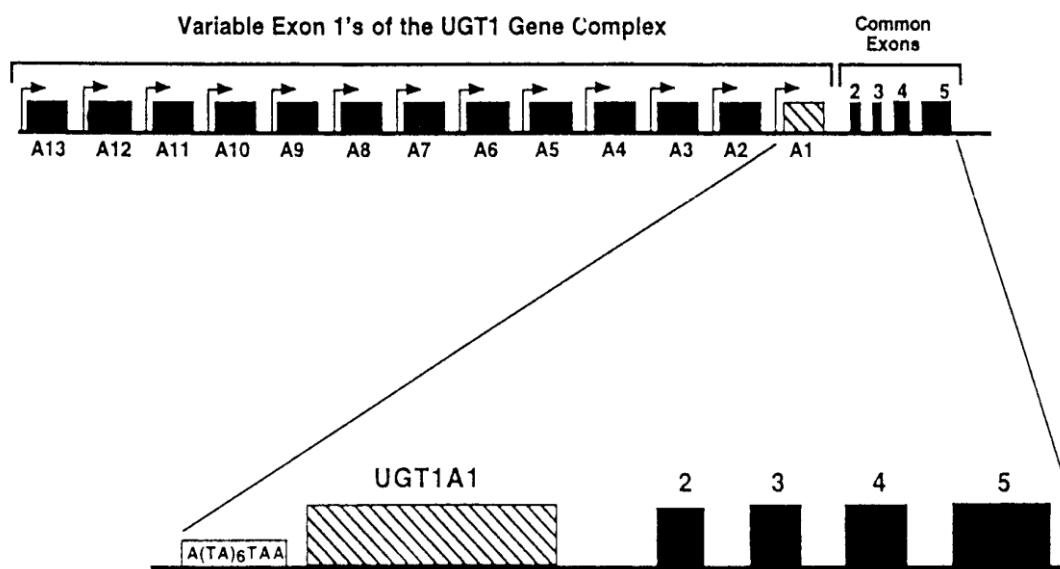
โรค Gilbert syndrome มี activity ของเอนไซม์ UGT1A1 ลดลงเช่นกัน แต่ขาดเอนไซม์น้อยกว่าผู้ป่วยโรค Crigler-Najjar ผู้ป่วยส่วนใหญ่ตัวไม่เหลืองและมักมีบิลิรูบินชนิด unconjugated ไม่เกิน 6.0 มิลลิกรัม/เดซิลิตร บางรายจะแสดงอาการเฉพาะช่วงอดอาหารหรือป่วย ซึ่งจะมีการทำงานเอนไซม์ UGT1A1 ลดลง

ยีน *Uridine glucuronosyltransferase1A1 (UGT1A1)*

เอนไซม์ Uridine glucuronosyltransferase (UGTs) อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์กลุ่ม glycosyltransferase โดย UGTs ในคนสามารถแบ่งได้ 3 families คือ *UGT1*, *UGT2* และ *UGT8* โดยแบ่งตามความเหมือนของลักษณะ sequence และโครงสร้างของยีน โดยที่ *UGT1* family ประกอบด้วย isoform ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา Glucuronidation ของบิลิรูบิน ควินิด และ ฟีนอล ซึ่ง *UGT1A1* และ *UGT1A4* เป็น isoform ที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยา Glucuronidation ของบิลิรูบิน แต่ในคนจะมีเฉพาะ *UGT1A1* ที่มีความจำเพาะต่อบิลิรูบิน [30]

ยีน *UGT1A1* อยู่บนโครโมโซมที่ 2q37 ประกอบด้วย 5 exon ที่บริเวณปลาย 3' (ตั้งแต่ exon 2 – 5) ทางด้านปลาย Carboxy ของยีน *UGT* ทุก isoform จะถอดรหัสเป็น โปรตีนซึ่งจะจับกับ Glucuronic acid และที่ปลาย N-terminal (exon1) มีตำแหน่งจับจำเพาะกับสารตั้งต้นที่ต่างกัน ซึ่ง *UGT1A1* จะจับจำเพาะกับบิลิรูบิน และอย่างน้อย 13 exon ของยีน *UGT1A1* ถึง *UGT1A13* จะอยู่บริเวณเหนือ exon2 [4, 6, 12] ดังภาพที่ 4

เอนไซม์ UGT1A1 ทำหน้าที่ conjugate บิลิรูบินกับ glucuronic acid ได้เป็น bilirubin diglucuronide (ประมาณ 80%) และ bilirubin monoglucuronide (ประมาณ 20%) ซึ่งบิลิรูบินชนิด conjugated ทั้ง 2 ชนิดละลายน้ำได้ดี



ภาพที่ 4 แผนภาพแสดงรูปแบบของยีน *UGT1A1* [31]

ยีน *UGT1A1* ในช่วง 500 เบสของ Transcription start site มีรูปแบบปกติของ (TATA box) promoter ของยีน *UGT1A1* แบบ $A(TA)_6TAA$ หรือเรียกว่า $UGT1A1*1$ หากเกิด $A(TA)_7TAA$ ($UGT1A1*28$) หรือ $A(TA)_8TAA$ ($UGT1A1*37$) จะทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง แต่ถ้าเป็น $A(TA)_5TAA$ ($UGT1A1*36$) จะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่ง $A(TA)_5TAA$ และ $A(TA)_8TAA$ จะพบได้ในแถบแอฟริกา [10, 32] นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ในบริเวณ exon1 ซึ่งเปลี่ยนจากเบส G เป็น A ณ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 211 จะเปลี่ยนกรดอะมิโนจากไกลซีนเป็นอาร์จินีนที่ตำแหน่ง 71 (G71R) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับบริเวณที่มีการกลายพันธุ์จากเบส T เป็น G ณ ตำแหน่ง -3279 (T-3279G) ตำแหน่ง -3279 อยู่ในบริเวณ Phenobarbital responsive enhancer module (PBREM) จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าลักษณะ promoter $A(TA)_7TAA$ มีความสัมพันธ์กับ T-3279G แบบ Linkage disequilibrium ในการทำให้เกิดโรค Gilbert syndrome [9, 33, 34] การกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งที่ 71 (G71R) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบมากในเด็กแรกเกิดใน

ประเทศญี่ปุ่น แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้ในชาวยุโรป ซึ่งการกลายพันธุ์ชนิดนี้ทำให้การทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ลดลง ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบ heterozygous type โดยที่การทำงานของ UGT1A1 จะลดลง 40% และลดลง 70% ในการกลายพันธุ์แบบ homozygous type [5, 6] งานวิจัยของ Maruo และคณะ ทดลองหาการแสดงออกของการกลายพันธุ์แบบ G71R ในหลอดทดลองพบว่า homozygous type มีประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ลดลง 68% แต่ heterozygous type การทำงานของเอนไซม์จะลดลง 40% จากปกติ [9]

นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ที่เปลี่ยนจากเบส T เป็นเบส C ณ ตำแหน่ง 247 ใน exon1 แพลรหัสจากกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนเป็นลิซีนที่ตำแหน่ง 83 (F83L) (ไม่พบการกลายพันธุ์บริเวณ TATA box) ในชาวไทยครอบครัวหนึ่ง ซึ่งเป็นแบบ homozygous type โดยที่พ่อและแม่มีความผิดปกติแบบ heterozygous การกลายพันธุ์เช่นนี้พบได้ยากและไม่พบในชาวญี่ปุ่น [12] งานวิจัยของ Ernest Beutler และคณะ ได้ศึกษา TATA box ของยีน *UGT1A1* เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในเซลล์ Hep G2 และ HuH ซึ่งพบว่าเอนไซม์มีความสามารถในการ conjugate กับ bilirubin ได้ดี และพบว่าหากความยาวของ TA ยิ่งมาก การทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ก็จะลดลง ทำให้มีปริมาณของบิลิรูบินสูงขึ้น [6]

ลักษณะอาการทางคลินิก

ในเด็กจะมีผิวหนังเป็นสีเหลือง หากมีปริมาณบิลิรูบินชนิด Unconjugated มากเกินไป ถ้ามากเกินไปที่โปรตีนอัลบูมินในเลือดจะจับไว้ได้หมด บิลิรูบินส่วนที่เหลือจะผ่านเข้าไปสู่สมอง ส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลางและไปจับที่เนื้อสมองทำให้สมองผิดปกติ เรียกว่า Kernicterus ในระยะต้นเด็กจะมีอาการเกร็ง ชิม คุณคนไม่ดี อาเจียน ร้องเสียงแหลม จากนั้นจะมีการเกร็งมากขึ้น ชักหลังแอ่น มีไข้ ตาเหลืองลง เด็กหลายรายจะเสียชีวิตในระยะนี้ หากเด็กรอดชีวิตผ่านระยะนี้ไป จะไปสู่ระยะท้าย คือหลังแอ่นชัดเจน ความตึง หรือเกร็งของกล้ามเนื้อลดลง หยุดหายใจ หมดสติ หรือเสียชีวิต หากไม่เสียชีวิตจะเกิดความพิการถาวร เช่น ชัก เกร็ง การเคลื่อนไหวผิดปกติ หูหนวก ปัญญาอ่อน และมีพัฒนาการช้า [18, 35]

การวินิจฉัยอาการตัวเหลืองโดยการตรวจวัดปริมาณบิลิรูบินในกระแสเลือด

เด็กแรกเกิดปกติจะมีการสร้างบิลิรูบินวันละประมาณ 6-10 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แต่ผู้ใหญ่จะมีการสร้างบิลิรูบินวันละ 3-4 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม อีกทั้งตัวของเด็กแรกเกิดยังทำงานไม่สมบูรณ์ ทำให้พบภาวะตัวเหลืองได้บ่อยในเด็กแรกเกิด (ขณะที่ทารกอยู่ในครรภ์ สารสีเหลืองจะผ่านรก เข้าสู่กระแสเลือดของแม่และขับออกทางตับของแม่) การวินิจฉัยอาการตัวเหลืองอย่างละเอียดทำได้โดยการตรวจวัดปริมาณบิลิรูบินในกระแสเลือด

บิลิรูบินในเลือดมี 2 ชนิด คือ

1. Conjugated หรือ Direct bilirubin เป็นบิลิรูบินที่จับกับ glucuronic acid สามารถทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วเมื่อใส่สีย้อม (diazo reagent) ลงในตัวอย่างเลือด ได้ผลิตภัณฑ์เป็น azobilirubin
2. Unconjugated bilirubin เป็นบิลิรูบินที่ไม่ได้จับกับ glucuronic acid ทำปฏิกิริยาช้ากว่า Conjugated bilirubin แต่ได้ผลิตภัณฑ์เช่นเดียวกัน

การเพิ่มเอทานอลจะทำให้บิลิรูบินทั้งหมด (total bilirubin, TBIL) พร้อมทำปฏิกิริยาได้ คือ การวัดได้ทั้ง conjugated bilirubin และ unconjugated bilirubin โดยสามารถคำนวณ indirect bilirubin ได้ โดย $\text{indirect bilirubin} = \text{total bilirubin} - \text{direct bilirubin}$ [36]

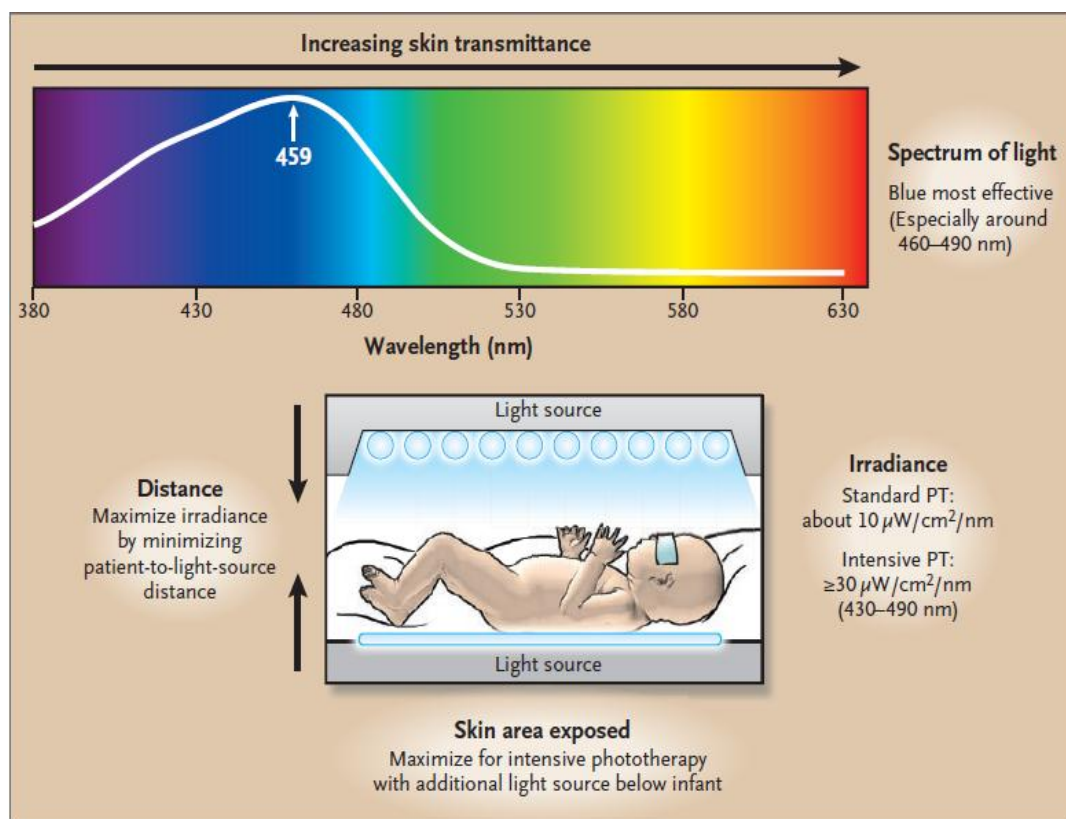
วิธีการวัดปริมาณบิลิรูบินในเด็กแรกเกิดส่วนใหญ่จะใช้เครื่องตรวจหาปริมาณบิลิรูบิน (Bilirubinometer, BM) โดยวัดที่ความยาวคลื่น 454 นาโนเมตรซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่บิลิรูบินในซีรัมหรือพลาสมาดูดแสงได้ โดยตัดสารที่รบกวนที่ความยาวคลื่น 540 หรือ 575 นาโนเมตรออก เนื่องจากใช้ตัวอย่างเลือดจำนวนน้อย (ไม่เกิน 50 ไมโครลิตร)

การรักษาอาการตัวเหลือง

การส่องไฟรักษา (phototherapy)

ใช้แสงไฟจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent lamp) ชนิดพิเศษ (Special blue light) ส่องไปที่ตัวเด็ก ซึ่งจะใช้จำนวนหลอดไฟและระยะห่างจากตัวเด็กตามมาตรฐาน โดยถอด

เสื้อผ้าเด็ก และปิดตาเด็กไว้เพื่อป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่ตา แสงสีฟ้าที่ใช้มีความยาวคลื่นประมาณ 425-475 นาโนเมตร จะถูกดูดซับโดยบิลิรูบินและจะช่วยเปลี่ยนบิลิรูบินให้เป็นชนิดที่ละลายน้ำได้ และถูกขับออกจากร่างกายผ่านทางน้ำดี ออกทางอุจจาระ และผ่านไตออกทางปัสสาวะ (ภาพที่ 5) การส่องไฟรักษาเด็กตัวเหลืองเป็นวิธีที่ช่วยลดการเปลี่ยนถ่ายเลือด [37] แต่อาการข้างเคียงจากการส่องไฟ เช่น เด็กอาจมีอุณหภูมิร่างกายสูงขึ้น ดังนั้นต้องให้นมหรือให้น้ำเด็กให้เพียงพอ อาจมีการบาดเจ็บของจอประสาทตา อาจมีผื่นขึ้นตามตัวบ้าง อาจมีอุจจาระเหลว ในเด็กที่มีบิลิรูบินชนิดละลายน้ำได้สูงอาจทำให้ผิวของเด็กมีสีเขียวๆ เหลืองๆ เป็นมัน เรียกว่า Bronze baby แต่ไม่อันตราย ภาวะแทรกซ้อนดังกล่าวสามารถป้องกันได้โดย ตรวจเช็คอุณหภูมิและเช็ดตัวกรณีมีไข้ กระตุ้นให้ทารกดื่มนมทุก 2 – 3 ชั่วโมง สวมผ้าปิดตาทุกครั้งที่ทำกาส่องไฟ



ภาพที่ 5 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการส่องไฟรักษา [38]

การให้ยา phenobarbital

ยา phenobarbital เป็นยาในกลุ่มบาร์บิทูเรต (Barbiturates) โดยปกติแล้วยานี้ทำให้มีการขับบิลิรูบินออกได้มากขึ้นและแก้ไขอาการชักจากภาวะที่มีบิลิรูบินสะสมในเนื้อสมอง นอกจากนี้ยา phenobarbital ยังเป็นยาที่กระตุ้นการทำงานของ Y protein โดยโปรตีนนี้อยู่ในไซโตซอล มีคุณสมบัติในการจับกับ lipophilic organic anion ซึ่งสามารถจับกับบิลิรูบินที่ความเข้มข้นต่ำได้ดี โดยปกติแล้วในทารกแรกเกิดจะมี Y protein ในปริมาณน้อยทำให้ตับไม่สามารถกำจัดบิลิรูบินออกได้หมดและยานี้ยังกระตุ้นการทำงานของน้ำดี ทำให้ช่วยขับบิลิรูบินออกจากร่างกายอีกทางหนึ่ง โดยผลข้างเคียงของยานี้จะทำให้เด็กมีอาการซึม [39, 40]

การเปลี่ยนถ่ายเลือด (blood transfusion)

การเปลี่ยนถ่ายเลือดเป็นวิธีการรักษาที่จะช่วยนำสารที่เป็นอันตรายที่อยู่ในกระแสเลือดให้ออกไปอย่างรวดเร็ว โดยการเอาเลือดของคนปกติที่ผ่านการตรวจสอบหมู่เลือด และการติดเชื้อในเลือด ตามวิธีมาตรฐานสากล แล้วนำเลือดในจำนวนมากกว่าเลือดเด็กอีกหนึ่งเท่าตัว แล้วจึงค่อยๆ ดูดเลือดเด็กออก ใส่เลือดใหม่เข้าไปสลับกัน โดยการเปลี่ยนถ่ายเลือดต้องทำในห้องที่ปลอดเชื้อและมีการตรวจสอบสัญญาณชีพของเด็กโดยตลอด นอกจากนี้ยังต้องมีการทดแทนสารน้ำและเกลือแร่ในเลือด เช่น แคลเซียมที่อาจลดต่ำลงจากการเปลี่ยนถ่ายเลือด ดังนั้น โอกาสติดเชื้อ หรือภาวะแทรกซ้อนจากกระบวนการทำจะมีน้อยมาก เมื่อเทียบกับผลดีที่ได้จากการรักษาโดยการเปลี่ยนถ่ายเลือด การเปลี่ยนเลือดใหม่ที่ไม่มีการบิลิรูบินเข้าไปทดแทนเลือดของเด็กจะทำให้เด็กมีอาการตัวเหลืองที่รุนแรงและให้การรักษาด้วยการส่องไฟแล้วยังคงมีอาการตัวเหลือง [41]

การป้องกันภาวะตัวเหลืองในเด็ก

ภาวะตัวเหลืองในเด็กหลายชนิดไม่สามารถป้องกันได้ แต่มีภาวะตัวเหลืองในเด็กบางภาวะสามารถป้องกันได้ เช่น ภาวะติดเชื้อระหว่างการจัดครรภ์ มารดาควรรับประทานวิตามินตั้งแต่ 3 เดือนแรกที่ตั้งครรภ์ ซึ่งจะทำการเจาะเลือดตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรม เช่น ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง และตรวจหาภาวะติดเชื้อในแม่ เช่น โรคไวรัสตับอักเสบบี โรคซิฟิลิส ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ทำให้สามารถทราบว่ามีโอกาสติดเชื้อในเด็กตั้งแต่ในครรภ์หรือไม่ เมื่อใกล้คลอดหรือในระหว่างให้ลูกกินนมแม่ แม่ควรระวังการใช้ยาบางอย่าง เช่น ยากลุ่มซัลโฟนา

ไมด์ (Sulfonamide) ซึ่งทำให้บิลิรูบินจับกับอัลบูมินได้ไม่ดี หรือทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในเด็กที่มีภาวะขาดเอนไซม์ G6PD แม่ควรรักษาให้ลูกได้ดื่มนมแม่เร็วที่สุดและให้ลูกดื่มนมแม่บ่อยๆ ประมาณ 10-12 ครั้งต่อวันเพราะจะทำให้ลำไส้ของลูกเคลื่อนไหวตัวได้ดี และช่วยขับบิลิรูบินออกจากกระแสเลือด ไม่อบผ้าอ้อมด้วยลูกเหม็นซึ่งเป็นสารที่อาจทำให้เด็กที่ขาดเอนไซม์ G6PD เกิดภาวะเม็ดเลือดแดงแตกมากขึ้น [42, 43]

อุบัติการณ์ของการเกิดอาการตัวเหลือง

ยีน *UGT1A1* มีการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ *UGT1A1* [44, 45] โดยในบริเวณ TATA box ของ promoter พบว่า ในชาว Caucasian มีความถี่ของอัลลีล A(TA)₇TAA เท่ากับ 0.36 – 0.39 ในชาวแอฟริกันมีความถี่ของอัลลีล A(TA)₇TAA เท่ากับ 0.43 ในชาวมาเลเซียและชาวญี่ปุ่นมีความถี่ของอัลลีล A(TA)₇TAA เท่ากับ 0.16 และ 0.15 ตามลำดับ [6, 8, 9] และจากการศึกษาในประชากรในสิงคโปร์พบว่า A(TA)₇TAA พบในเชื้อสายอินเดียและเชื้อสายมาเลย์มากกว่าเชื้อสายจีน[45] และยังพบ A(TA)₅TAA และ A(TA)₈TAA ในประชากรแอฟริกัน [6] นอกจากนี้ในตำแหน่ง 211G>A พบว่า ในประชากรญี่ปุ่นมีความถี่ของอัลลีลเท่ากับ 0.16 ในประชากรมาเลเซียมีความถี่ของอัลลีลเท่ากับ 0.03 [9, 10] และไม่เคยพบการกลายพันธุ์นี้ในประชากรแอฟริกันและไม่มีการรายงานการกลายพันธุ์ของตำแหน่งนี้ในชาว Caucasian [11] และในเชื้อสายจีนจะพบการกลายพันธุ์ 211G>A มากกว่าชาวอินเดีย [45] และยังพบว่าบริเวณ TATA box ของ promoter มีความสัมพันธ์กับปริมาณบิลิรูบินในชาวอเมริกาเหนือ ชาวแอฟริกัน และชาวยุโรป ส่วนในชาวญี่ปุ่น และในเอเชียมักพบการกลายพันธุ์แบบ 211G>A [6]

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นนิวคลีโอไทด์ตั้งต้นในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ

การออกแบบไพรเมอร์โดยออกแบบให้มีลำดับเบสคู่สม (complementary) กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวน เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับคู่ (anneal) กับดีเอ็นเอต้นแบบ และออกแบบให้ไพรเมอร์ทั้งคู่มีปลาย 3' ที่จำเพาะและมีเบสคู่สมที่ดี ขึ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มจำนวนไม่ควร มีขนาดใหญ่จนเกินไป ขนาดที่พอเหมาะคือไม่เกิน 1 kb ความยาวของไพรเมอร์ต้องพอเหมาะที่จะให้เบสคู่สมจับกับดีเอ็นเอต้นแบบโดยให้มีความจำเพาะเจาะจง ถ้าไพรเมอร์สั้นเกินไป ไพรเมอร์จะ

จับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายที่ทำให้ความจำเพาะในการเพิ่มจำนวนลดลง ถ้าหากไพรเมอร์ยาวจนเกินไป ทำให้เวลาที่จะไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเพิ่มขึ้น ทำให้ปฏิกิริยามีประสิทธิภาพและผลผลิตของดีเอ็นเอลดลง

หลักการออกแบบหรือคัดเลือกไพรเมอร์มีดังนี้

1. เลือกไพรเมอร์ที่มีขนาดประมาณ 15 – 25 นิวคลีโอไทด์
2. ไพรเมอร์ควรมีปริมาณ G + C ที่ใกล้เคียงกันทั้งสองสาย เพื่อดีเอ็นเอต้นแบบจะได้ใช้จับกับไพรเมอร์ทั้งสองสายอย่างมีความจำเพาะเจาะจงที่อุณหภูมิเดียวกัน และมีปริมาณ G + C ในช่วง 50 – 60 %
3. หลีกเลี่ยงการมีเบสซ้ำ (palindromic sequences) ทั้งในสายหรือระหว่างสายไพรเมอร์ โดยเฉพาะที่ปลาย 3' เพื่อหลีกเลี่ยงการจับกันเองระหว่างไพรเมอร์ (primer dimer) หรือการเกิด hairpin loop structure (secondary structure) ในสายเดียวกัน
4. ค่า melting temperature (T_m) ของแต่ละคู่ไพรเมอร์ควรมีค่าเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรมีค่าระหว่าง 55 – 75 องศาเซลเซียส โดยที่ ค่า T_m มีสูตรในการคำนวณดังนี้ $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (A + T) + 4^{\circ}\text{C} \times (C + G)$

การออกแบบไพรเมอร์สามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น Oligos หรือ โปรแกรมที่สามารถ download ได้จาก internet เป็นตัวช่วยในการออกแบบ เช่น การกลับลำดับนิวคลีโอไทด์ (reverse complement) หรือ ใช้ในการช่วยคำนวณค่า T_m และยังใช้ในการพิจารณา primer อีกด้วย

หลักการพื้นฐานของ Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction เป็นการจำลองหลักการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (replication) โดยที่มีดีเอ็นเอเป็นแม่แบบ (template) ซึ่งกระบวนการนี้เลียนแบบการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต

โดยองค์ประกอบที่สำคัญในการทำ PCR ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่แบบ (template), เอนไซม์ Taq DNA polymerase, โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (oligonucleotide primer) อย่างน้อย 1 คู่, Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dGTP, dCTP และ dTTP นอกจากนี้ยังมีสารละลายบัฟเฟอร์ ทำหน้าที่เป็นสารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำปฏิกิริยาให้

เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่างๆ เช่น Tris – HCl, KCl, MgCl₂ ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มการจับกันของไพร์เมอร์และดีเอ็นเอตัวอย่างได้อย่างจำเพาะมากยิ่งขึ้น

เทคนิคนี้มีความจำเพาะเนื่องจากไพร์เมอร์ที่ใช้ในการจับกับแม่แบบนั้น ต้องจับเฉพาะกับแม่แบบ (template) ที่เราต้องการศึกษาเท่านั้น ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1. การแยกสาย DNA จากสายคู่เป็นสายเดี่ยว (Denaturation) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิระหว่าง 90 – 95 องศาเซลเซียส โดยจะทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอถูกทำลาย ทำให้สายดีเอ็นเอสายคู่แยกออกเป็นสายเดี่ยว โดยขั้นตอนนี้จะแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ คือ ในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์เฮลิเคส (Helicase) ช่วยในการแยกสายและคลายเกลียวดีเอ็นเอ

2. การจับระหว่างไพร์เมอร์กับแม่แบบ (annealing) ไพร์เมอร์ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 20 – 30 เบส ที่มีลำดับเบสคู่สมกับลำดับเบสของสายดีเอ็นเอต้นแบบ (complement) จะเข้ามาจับกับดีเอ็นเอที่แยกเป็นเส้นเดี่ยวทั้งสองเส้นที่ตำแหน่งตรงข้าม และใช้อุณหภูมิในช่วงระหว่าง 45 – 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญต่อการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ถ้าอุณหภูมิในการจับของไพร์เมอร์กับแม่แบบสูงเกินไป จะส่งผลให้การจับระหว่างไพร์เมอร์กับแม่แบบเกิดได้ยาก แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปส่งผลให้ความจำเพาะต่อการจับลดลงไป ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีเอนไซม์ไพร์เมส (Primase) เป็นตัวสร้างอาร์เอ็นเอไพร์เมอร์

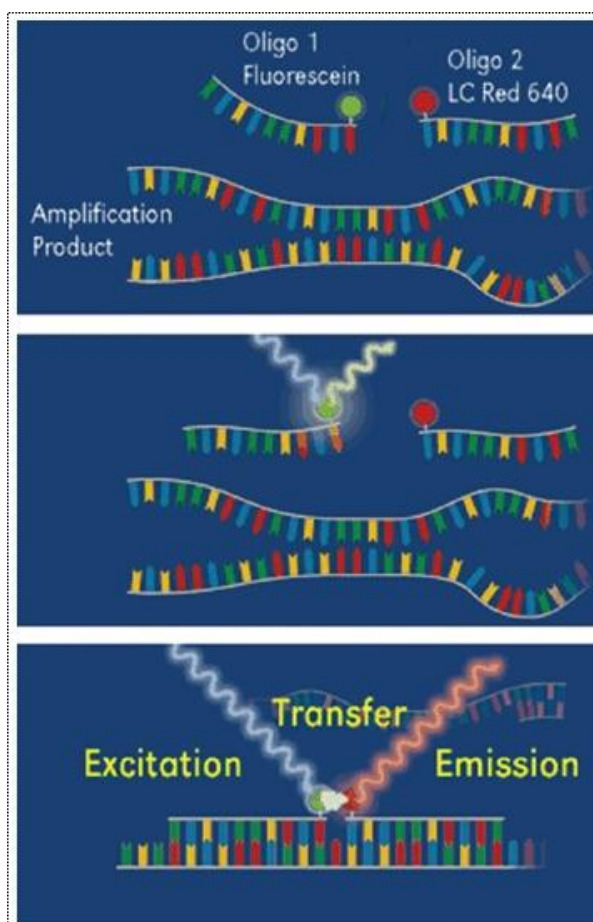
3. การเพิ่มความยาวของสายพันธุกรรม (extension) เมื่อไพร์เมอร์จับกับแม่แบบได้อย่างคู่สม (complement) แล้ว dNTP ทั้ง 4 ชนิด (dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) จะเข้ามาเข้าคู่กับสายแม่แบบ ส่งผลให้สายพันธุกรรมใหม่ยาวขึ้นในทิศทาง 5' ไปทาง 3' ของสายพันธุกรรมใหม่ โดยอาศัยเอนไซม์ Taq DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขั้นนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 70 -75 องศาเซลเซียส

โดยแต่ละขั้นตอนจะเกิดขึ้นซ้ำประมาณ 40 รอบ โดยแต่ละรอบเกิดการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมใหม่เป็น 2 เท่า ดังนั้นปริมาณของสารพันธุกรรมใหม่หลังจากสิ้นสุดเท่ากับ 2 ยกกำลังด้วยจำนวนรอบของการทำ PCR เมื่อปฏิกิริยา PCR ดำเนินมาประมาณ 20 รอบ ดีเอ็นเอเป้าหมายจะถูกสร้างขึ้นมาเป็นล้านเท่า ในขณะที่ไพร์เมอร์มีจำนวนลดลง และเอนไซม์ไม่เพียงพอในการที่จะใช้จับกับดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่ได้ทั้งหมด ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ควรจะได้มีปริมาณลดลง

และดีเอ็นเอเป้าหมายอาจจะจับคู่กันเอง ทำให้การจับของไพรเมอร์ลดลงด้วย อัตราการเพิ่มของจำนวนดีเอ็นเอจึงไม่เป็นแบบทวีคูณเหมือนในช่วงแรก และในที่สุดจะไม่มี的增加ของดีเอ็นเออีก

หลักการพื้นฐานของ Real-time PCR แบบ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Real - time PCR เป็นการทำ PCR ที่สามารถติดตามผลได้ขณะที่เกิดปฏิกิริยา โดยข้อดีของการทำ real -time PCR คือ สามารถติดตามผลได้ในขณะที่เกิดขึ้นจริง ไม่ต้องมีขั้นตอนหลังการทำ PCR ทำให้ลดโอกาสการปนเปื้อน การทำงานในแต่ละรอบมักจะมีความเร็วมากกว่า PCR ธรรมดา และวัดค่าได้มากขึ้นจนถึง 10^{10} เท่า (wide dynamic range) ในปฏิกิริยาของ real - time PCR ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorophore)



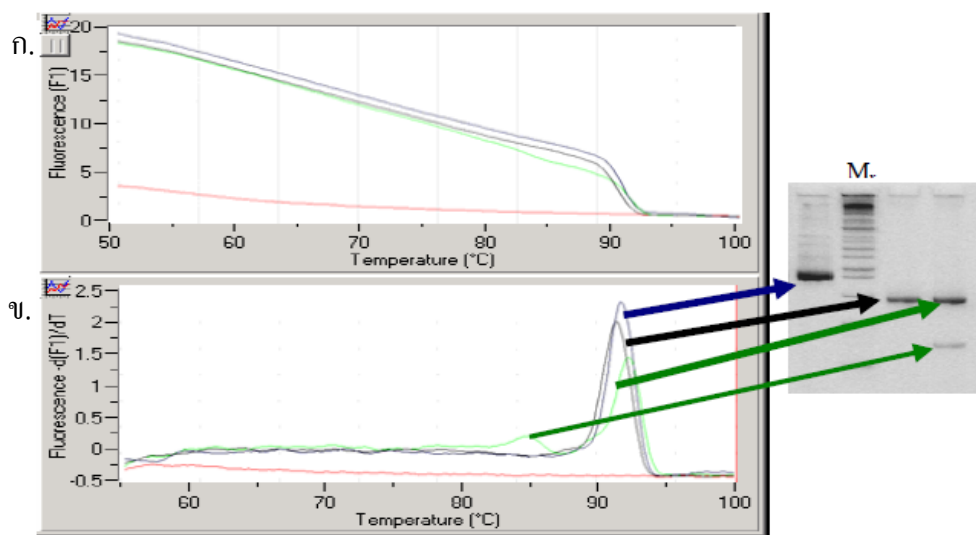
ภาพที่ 6 หลักการทำงานของ Real - time PCR แบบ FRET [46]

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) เป็น real – time PCR ที่ใช้ probe จับกับสายดีเอ็นเอ ซึ่ง probe จะเป็นสายดีเอ็นเอเส้นเดียวที่มีลำดับเบสที่ออกแบบไว้แล้วทำการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง โดย probe จะมีลักษณะเป็น Hybridization probes โดยมี probe สายสั้น 2 สาย [47] สายแรกจะติดฉลากที่ปลาย 3' ด้วย Fluorescein (เป็น Donor dye) ส่วนสายที่ 2 ติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วย Red 640 หรือ Red 705 (เป็น Acceptor dye) (ภาพที่ 6) โดย probe ทั้ง 2 สายจะมีลำดับเบสต่อเนื่องกันโดยเว้นช่องว่างระหว่างปลาย 3' ของเส้นแรก กับปลาย 5' ของเส้นที่ 2 ประมาณ 1-5 คู่เบส โดย donor dye จะถูกกระตุ้นด้วยแสงสีฟ้าที่มีความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร (nm) และปล่อยแสงสีเขียวที่มีความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (nm) เมื่อ probe ทั้ง 2 สายทำการ hybridization กับดีเอ็นเอเป้าหมาย จะทำให้เกิด Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) แล้ววัดแสงของ fluorescence ได้ [48] ซึ่งจะทำการวัดแสงในช่วง annealing phase และช่วงแรกของ extension phase ของปฏิกิริยา

การวิเคราะห์ Melting curve analysis

เป็นการใช้เพื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ที่เกิดขึ้น โดยมักจะทำทันทีหลังจากจบการทำ PCR โดยตั้งค่าให้มีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆจนถึง 95 องศาเซลเซียส และวัดสัญญาณ fluorescence ตลอดเวลา จะพบว่าสัญญาณจะค่อยๆลดลง ดังแสดงในภาพที่ 7ก. เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ที่เป็นสายคู่แยกตัวออกจากกัน ซึ่งดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดจะมี melting temperature (T_m) เฉพาะตัว คือจุดที่คู่ base pair ของนิวคลีโอไทด์จะแยกออกจากกันประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดทั้งหมด ทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณอย่างฉับพลัน ณ จุดนั้น โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นกับความยาวและปริมาณ G + C ที่มีในดีเอ็นเอแต่ละชนิด [49] ดังนั้นจึงสามารถใช้เพื่อแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ออกจากผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อนได้ เมื่อโปรแกรมนำสัญญาณ fluorescence ที่วัดได้ที่แต่ละอุณหภูมิมาเปลี่ยนให้เป็นกราฟระหว่าง dF/dT กับอุณหภูมิ ดังภาพ 7ข. จะได้เป็นรูป peak ของผลิตภัณฑ์แต่ละตัวที่ได้จากการทำ PCR โดยที่ถูกต้องมักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูง (โดยทั่วไปจะสูงกว่า 80°C) ในขณะที่ non-specific product หรือ primer-dimer จะให้ peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำกว่า ดังนั้น melting curve analysis ของผลิตภัณฑ์ PCR มัก

ใช้เพื่อยืนยันว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ทำให้ไม่ต้องมีการ run gel electrophoresis หลังจากการ PCR



ภาพที่ 7 แสดงการวัด fluorescence จากผลิตภัณฑ์ PCR ก. เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ
 ข. เมื่อเปลี่ยน scale ให้เป็น dF/dT ซึ่งแสดงอุณหภูมิที่เป็น melting temperature ของ
 ผลิตภัณฑ์ PCR แต่ละตัว โดยเทียบกับขนาดเมื่อ run gel electrophoresis ตามที่ลูกศรชี้ [50]

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Cross-sectional, descriptive research) ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee)

ประชากรศึกษา

ในการศึกษานี้ได้แบ่งประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population) และ กลุ่มควบคุม ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากทั้งสองกลุ่มตั้งแต่ สิงหาคม 2554 ถึง พฤศจิกายน 2554 โดยแต่ละตัวอย่างในแต่ละกลุ่มที่นำมาศึกษามีคุณสมบัติดังนี้

1. กลุ่มประชากรเป้าหมาย คือ กลุ่มเด็กแรกเกิดที่เป็นประชากรไทยอายุไม่เกิน 7 วันที่มีอาการตัวเหลืองและได้รับการรักษาด้วยการส่องไฟ

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษา (inclusion criteria)

กลุ่มเด็กแรกเกิดคลอดก่อนกำหนดที่มีปริมาณ total serum bilirubin (TB) มากกว่า 10 mg/dL หรือ กลุ่มเด็กแรกเกิดคลอดครบกำหนดที่มีปริมาณ total serum bilirubin (TB) มากกว่า 12 mg/dL และได้ทำการส่องไฟตามข้อบ่งชี้เพื่อการรักษา

เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกรอกจากการศึกษา (exclusion criteria)

- กลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่มีอาการหนัก ที่อยู่ในหอพักผู้ป่วยหนัก
- ผู้ปกครองหรืออาสาสมัครปฏิเสธการเข้าร่วมในการศึกษา

2. กลุ่มประชากรไทย ช่วงอายุ 20 – 60 ปี ที่มีสัญชาติไทย

ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)

การศึกษานี้กลุ่มประชากรจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มและเป็นอิสระต่อกัน จึงคำนวณหาจำนวนของกลุ่มตัวอย่างในผู้ใหญ่จากการประมาณค่าเฉลี่ย 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%

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

ดังนั้นต้องทำการศึกษาดูตัวอย่างผู้ป่วยอย่างน้อย 97 ราย จึงจะประมาณค่าร้อยละ โดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 10 สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมดเป็นจำนวน 115 ตัวอย่าง

และในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองจะคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อหาการกลายพันธุ์ ซึ่งในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลือง สามารถตรวจพบความถี่ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TATA box แบบ A(TA)₇TAA เป็น 0.04 [9] จึงใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$n = \frac{(Z^2 pq)}{d^2}$$

โดย Z = ค่า Z score ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

p = ความถี่ของยีน *UGT* บริเวณ TATA box แบบ A(TA)₇TAA

q = 1 - p

ค่าความคลาดเคลื่อน (d) = 5%

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.04)(1 - 0.04)}{(5/100)^2} = 59.01$$

ดังนั้นต้องทำการศึกษาจากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองจำนวนอย่างน้อย 59 คน จึงจะประมาณค่าร้อยละ โดยมีความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 5 ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมดเป็นจำนวน 71 ตัวอย่าง

และในกลุ่มผู้ป่วยเด็กที่มีอาการตัวเหลือง สามารถตรวจพบความถี่ของยีน *UGT1A1* บริเวณ 211G>A เป็น 0.15 [23] และใช้สูตรคำนวณเช่นเดียวกับเด็กแรกเกิดตัวเหลืองบริเวณ TATA box โดยมีค่าความผิดพลาดไม่เกินร้อยละ 10 พบว่าต้องทำการศึกษาจากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลืองจำนวนอย่างน้อย 49 ตัวอย่าง ซึ่งในการศึกษานี้ได้ใช้ตัวอย่างเด็กตัวเหลืองกลุ่มเดียวกันกับการกลายพันธุ์ตำแหน่ง TA repeat ดังนั้น การกลายพันธุ์ในบริเวณ 211G>A จึงใช้ตัวอย่างทั้งหมด 71 ตัวอย่าง

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml (Pyrex, USA)
- 1.2 Cuvett: 5 μ l, 10 μ l (MiralBio, Japan)
- 1.3 Cylinder: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.4 Flask: 250 ml (Pyrex, USA)
- 1.5 Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
- 1.6 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGen, USA)
- 1.7 Parafilm (American Nation Can, USA)
- 1.8 Pipet tip: 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (AxyGen, USA)
- 1.9 Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
- 1.10 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, USA)
- 1.11 Stirring-magnetic bar

2. อุปกรณ์

- 2.1 Autoclave (Sanyo, Japan)
- 2.2 Automatic adjustable micropipette: P10 (0.5-10 μ l), P20 (5-20 μ l), P200 (20-200 μ l), P1000 (100-1,000 μ l) (Eppendorf, Germany)
- 2.3 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.4 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)

- 2.5 Combs (Bio-RAD, Hercules, California)
- 2.6 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
- 2.7 Freezer-20°C (Sanyo, Japan)
- 2.8 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- 2.9 Incubator (Mettmert, Germany)
- 2.10 LightCycler[®] 480 (Roche, Germany)
- 2.11 Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)
- 2.12 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- 2.13 PCR Mastercycler personal (Eppendorf, Germany)
- 2.14 pH meter (Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.15 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- 2.16 Refrigerate microcentrifuge (Eppendorf, Germany)
- 2.17 Refrigerator 4°C (Mitsubishi, Japan)
- 2.18 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- 2.19 UV transilluminator (Fotodyne, USA)
- 2.20 Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- 2.21 Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1 สารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง

- 3.1.1 Lymphocyte separation medium (Wisent Inc., Canada)
- 3.1.2 Magnesium Chloride (Merck, Germany)
- 3.1.3 Phosphate Buffer Saline (BIO BASIC INC., NY, USA)
- 3.1.4 Sodium Chloride (Promega, CA, USA)
- 3.1.5 Tris-HCl (Sigma, Singapore)

3.2 สารเคมีสำหรับการสกัด DNA (DNA extraction)

- 3.2.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)

- 3.2.2 Chloroform (Sigma, MO, USA)
- 3.2.3 Glycogen (USB, Ohio, USA)
- 3.2.4 Isoamyl alcohol (BDH, UK)
- 3.2.5 Isopropanol (Sigma, Singapore)
- 3.2.6 Phenol (Amresco, OH, USA)
- 3.2.7 Proteinase K (5PRIME, Germany)
- 3.2.8 Sodium acetate (Sigma, Singapore)
- 3.2.9 Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Pharmacia biotech, Sweden)
- 3.3 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบและเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR
 - 3.3.1 5Prime PerfectTaq Plus MasterMix Kit (5PRIME, Germany)
- 3.4 สารเคมีสำหรับทำ gel electrophoresis
 - 3.4.1 Agarose molecular grade (Reserch Organics, OH, USA)
 - 3.4.2 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)
 - 3.4.3 GeneRuler 100 base pair DNA ladder (Fermentas, MD, USA)
- 3.5 สารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์
 - 3.5.1 Agarose GelExtract Mini Kits (5PRIME, Germany)
- 3.6 สารเคมีสำหรับ cloning และ transformation ใน *E.coli*
 - 3.6.1 Agar Bacteriological (GIBCO, NY, USA)
 - 3.6.2 FastPlasmid Mini (Eppendorf, Germany)
 - 3.6.3 IPTG (Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside) (Eppendorf, Germany)
 - 3.6.4 One Shot TOP10 Chemically Competent E.Coli (Invitrogen, NY, USA)
 - 3.6.5 pGEM-T Easy Vector System (Promega, CA, USA)
 - 3.6.6 Tryptone powder (BIO BASIC INC., NY, USA)
 - 3.6.7 X-Gal (Promega, CA, USA)
 - 3.6.8 Yeast Extract (GIBCO, NY, USA)

4. โปรแกรมสำหรับ bioinformatic และการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9)

4.2 Chromas Lite (version 2.01)

4.3 OLIGOS primer design software (version 9.1)

4.4 SPSS for Windows (version 13.0)

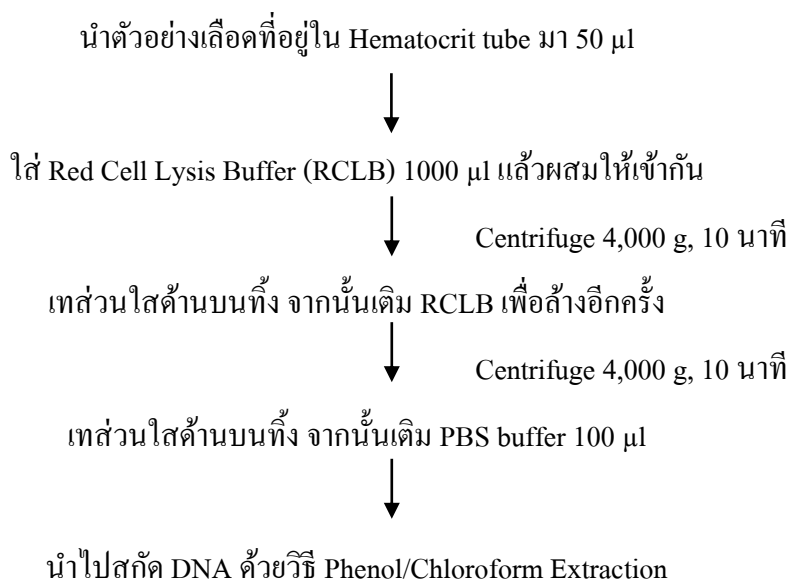
วิธีการดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่าง (Specimen collection)

- ในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองจะทำการเจาะเลือดและเก็บตัวอย่างเลือดใน Hematocrit tube 2 tube ประมาณ 100 ไมโครลิตร
- ในตัวอย่างเลือดผู้ใหญ่ (กลุ่มควบคุม) จะเจาะเลือดประมาณ 1 – 3 มิลลิลิตร จากหลอดเลือดดำโดยใช้เข็มปลอดเชื้อ ใส่ในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA จากนั้นปั่นแยกพลาสมาและเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งมีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น โดยใช้ lymphocyte separation medium (Wisent Inc., Quebec, Canada)

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

- จากตัวอย่างเลือดของเด็กแรกเกิด



● จากตัวอย่างเลือดของผู้ใหญ่ด้วยวิธี **Phenol/Chloroform Extraction**

นำตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ละลายอยู่ในสารละลาย PBS มา 100 μ l ใส่ใน

Lysis buffer 400 μ l + proteinase K 10 μ l



นำไป vortex แล้วบ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



เติม Phenol 250 μ l และ Chloroform: IAA(49:1) 250 μ l แล้วนำไป vortex



Centrifuge 13,000 g, 20 นาที

ดูดส่วนบนใส่ในสารละลาย Glycogen 4 μ l + 2M NaOAc 40 μ l + Absolute ethanol 800 μ l



Mix ให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ที่ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



Centrifuge 13,000 g, 30 นาที

เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม 70% ethanol 1 ml



Centrifuge 13,000 g, 20 นาที

เทสารละลายทิ้ง แล้วนำไป Dry ให้แห้ง



เติม Distilled Water 100 μ l

การเตรียม Positive control ด้วยวิธี cloning

1. Ligation ระหว่าง PCR product กับ plasmid (pGEM[®]-T Easy Vector) เตรียม mixture

ดังนี้

— 2x Rapid Ligation buffer	5.0 μ l
— T4 DNA ligase	1.0 μ l
— pGEM [®] -T Easy Vector	1.0 μ l
— PCR product	5.0 μ l

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมคืน

2. Transformation

เตรียม competent cells ปริมาตร 50 μl ใน tube 1.5 ml จากนั้นเติมสารละลาย

ligation ปริมาตร 3 μl



นำ tube ไป chill ice เป็นเวลา 20 นาที



นำ tube ไป heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที

แล้วกลับมา chill ice อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที



เติม SOC medium ปริมาตร 950 μl , 2M Mg^{2+} 10 μl , 2M glucose 10 μl



Shaking ที่ประมาณ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง



Centrifuge 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

เท supernatant ที่ทิ้ง ให้เหลือ pallet ประมาณ 100 μl



เติม x-gal 15 μl และ 200 mg/ml IPTG 4 μl mix ให้เข้ากัน



Spread plate และนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน

3. Colony selection

สังเกต colony ที่ขึ้นบน plate โดยจะเลือก colony ที่ใส แล้ว Pick colony ใส ลงใน LB broth จากนั้น Shaking 200 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4. Plasmid extraction ด้วย Fast Plasmid mini

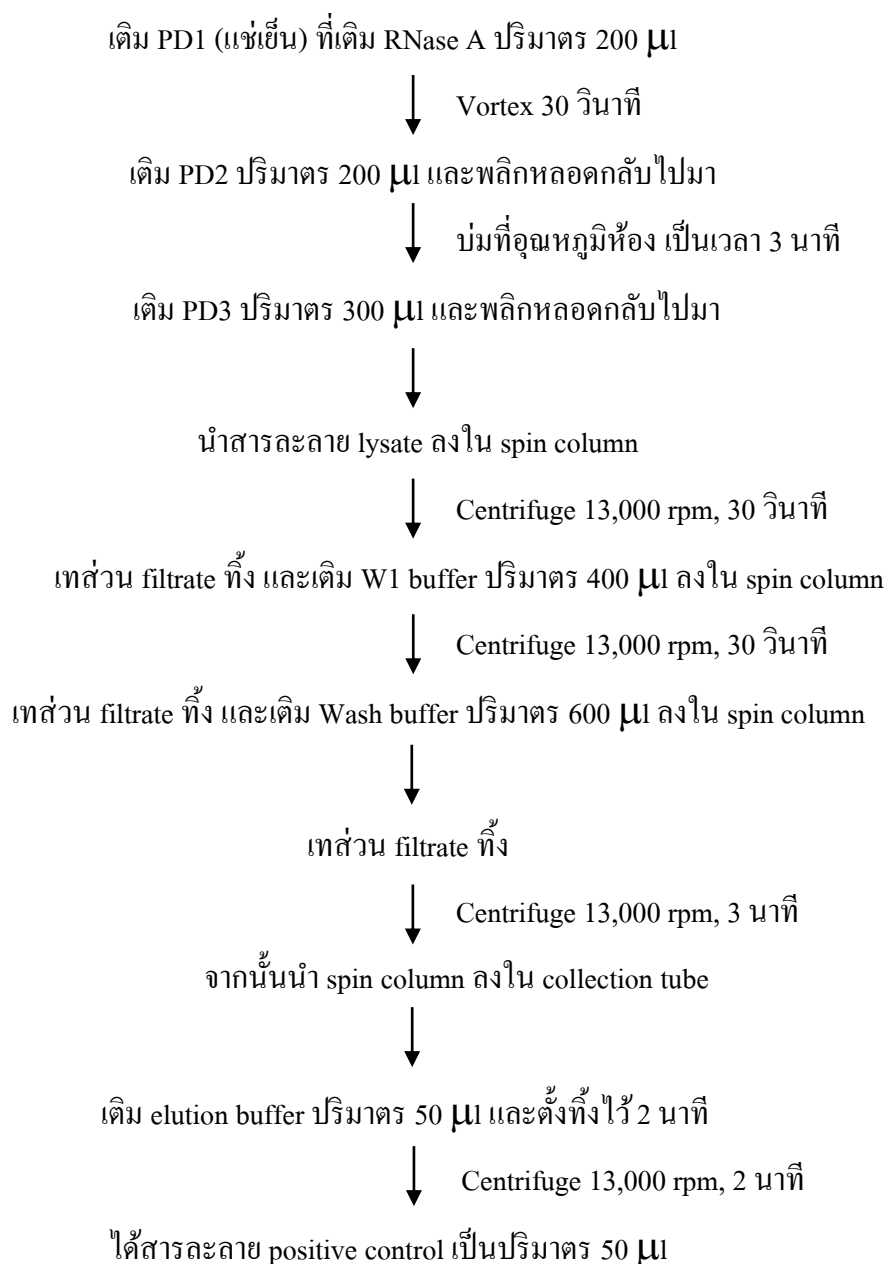
นำ bacterial culture 1.5 ml มาใส่ลงใน tube 1.5 ml



Centrifuge 13,000 rpm, 1 นาที

เท supernatant ที่ทิ้ง จะเหลือ pallet





การออกแบบไพรเมอร์ (primer)

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบยีน *UGT1A1* ที่บริเวณ promoter และ exon1 โดยนำข้อมูลยีน *UGT1A1* มาจากฐานข้อมูล Genbank เพื่อเป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้นิวคลีโอไทด์ NC_000002.11 เป็นตัวอ้างอิง เลือกบริเวณช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุด, มีค่า GC content ประมาณ 50-60% และ ค่า melting temperature (T_m)

ของไพรเมอร์ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 55-75°C โดยที่ไพรเมอร์คู่เดียวกันควรมีค่า Tm เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน ค่า Tm มีสูตรในการคำนวณดังนี้ $Tm = 2^{\circ}C \times (A + T) + 4^{\circ}C \times (C + G)$ ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์ 2 คู่ ดังนี้ ไพรเมอร์สำหรับ promoter: UGT1A1_F/ UGT1A1_Rpromoter มีขนาด 362 bp และ ไพรเมอร์สำหรับ exon1: UGT1A1_F2/ UGT1A1_2R1 มีขนาด 823 bp

จากนั้นตรวจสอบผลการออกแบบไพรเมอร์โดยการนำไพรเมอร์ไป BLAST เปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล NCBI และตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligos version 9.1 ได้ผลดังนี้

ผลการนำ UGT1A1_F BLAST เปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล NCBI

```
>ref|NT\_005120.16| D Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly
Length=5748237

Sort alignments for this subject sequence by:
E value  Score  Percent identity
Query start position  Subject start position

Features in this part of subject sequence:
  UDP-glucuronosyltransferase 1-8 precursor
  UDP-glucuronosyltransferase 1-10 precursor

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.001
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      ATTTGAGTATGAAATTCAGCC 22
            |||
Sbjct 614965 ATTTGAGTATGAAATTCAGCC 614986
```

ภาพที่ 8 ผลการ BLAST ของ UGT1A1_F เทียบกับในฐานข้อมูล

ผลการนำ UGT1A1_Rpromoter BLAST เปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล NCBI

```
>ref|NT\_005120.16| D Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly
Length=5748237

Sort alignments for this subject sequence by:
E value  Score  Percent identity
Query start position  Subject start position

Features in this part of subject sequence:
  UDP-glucuronosyltransferase 1-8 precursor
  UDP-glucuronosyltransferase 1-10 precursor

Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.16
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      CCAAGCATGCTCAGCCAG 18
            |||
Sbjct 615326 CCAAGCATGCTCAGCCAG 615309
```

ภาพที่ 9 ผลการ BLAST ของ UGT1A1_Rpromoter เทียบกับในฐานข้อมูล

ตรวจสอบการจับกันระหว่าง UGT1A1_F กับ UGT1A1_Rpromoter ด้วย Oligos version 9.1

ATTTGAGTATGAAATTCAGCC	Tm: 52.6	base: 22	<input type="checkbox"/> Link
CCAAGCATGCTCAGCCAG	Tm: 51.4	base: 18	Clear
Ta: 56.85 60.56		Exit	

ภาพที่ 10 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ UGT1A1_F กับ UGT1A1_Rpromoter

ผลการนำ UGT1A1_F2 BLAST เปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล NCBI

```
> ref|NT\_005120.16| D Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly
Length=5748237

Sort alignments for this subject sequence by:
E value  Score  Percent identity
Query start position  Subject start position

Features in this part of subject sequence:
  UDP-glucuronosyltransferase 1-8 precursor
  UDP-glucuronosyltransferase 1-10 precursor

Score = 36.2 bits (18), Expect = 0.16
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      CTGGCTGAGCAIGCTTGG  18
           |||
Sbjct 615309  CTGGCTGAGCAIGCTTGG  615326
```

ภาพที่ 11 ผลการ BLAST ของ UGT1A1_F2 เทียบกับในฐานข้อมูล

ผลการนำ UGT1A1_2R1 BLAST เปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล NCBI

```
> ref|NT\_005120.16| D Homo sapiens chromosome 2 genomic contig, GRCh37.p5 Primary Assembly
Length=5748237

Features in this part of subject sequence:
  UDP-glucuronosyltransferase 1-8 precursor
  UDP-glucuronosyltransferase 1-10 precursor

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.015
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      TGGGGCTAGTTAATCGATCC  20
           |||
Sbjct 616131  TGGGGCTAGTTAATCGATCC  616112
```

ภาพที่ 12 ผลการ BLAST ของ UGT1A1_2R1 เทียบกับในฐานข้อมูล

ตรวจสอบการจับกันระหว่าง UGT1A1_F2 กับ UGT1A1_2R1 ด้วย Oligos version 9.1

ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างไพรเมอร์ UGT1A1_F2 กับ UGT1A1_2R1

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างจำเพาะด้วยเทคนิค PCR (PCR amplification)

เพิ่มจำนวน DNA ของยีน *UGT1A1* ในส่วน TA repeats บริเวณ promoter และ 211G>A บริเวณ exon1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR และขนาดผลิตภัณฑ์

ตำแหน่ง	ไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับเบส (5' → 3')	Product size (bp)
TATA box	UGT1A1_F	Forward	ATTTGAGTATGAAATTCAGCC	362
	UGT1A1_Rpromoter	Reverse	CCAAGCATGCTCAGCCAG	
211G>A	UGT1A1_F2	Forward	CTGGCTGAGCATGCTTGG	823
	UGT1A1_2R1	Reverse	TGGGGCTAGTTAATCGATCC	

ตารางที่ 2 แสดงสารเคมีและปริมาณในการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สารเคมี	ปริมาณ(μl/tube)
Distilled water	10.5
2× Mastermix (5PRIME, Germany)	12.5
Forward primer (10 μM)	0.5
Reverse primer (10 μM)	0.5
DNA template	1
Total volume	25

ตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน TATA box

PCR cycle	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา
Pre-denaturing	94	5 นาที
Denaturing	94	30 วินาที
Annealing	55	30 วินาที
Extention	72	45 วินาที
Post-extention	72	7 นาที

ตารางที่ 4 แสดงอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน 211G>A

PCR cycle	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา
Pre-denaturing	94	5 นาที
Denaturing	94	45 วินาที
Annealing	61	45 วินาที
Extention	72	1.30 นาที
Post-extention	72	7 นาที

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

- หาขนาด PCR product ที่ต้องการด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel และใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker เพื่อตรวจสอบขนาดของ DNA ที่ต้องการ ย้อมดูแถบ DNA ที่ต้องการด้วยสารละลาย ethidium bromide นำไปส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสง ultraviolet (UV)
- ตัด gel โดยเลือกตัดในบริเวณที่มีแถบ PCR product ขนาดที่ต้องการ
- สกัด PCR product จาก gel ที่ตัดออกมาด้วย PCRExtract & GelExtract Mini Kits (5PRIME, Germany)
- นำ DNA ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratory SDN BHD (Malaysia)

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

โดยใช้โปรแกรม

- BioEdit เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการออกแบบ primers
- BLAST เพื่อนำผลของลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนใน GenBank
- Chromas Lite เป็นโปรแกรมที่ใช้ดูกราฟที่ได้จากการทำ sequencing
- Oligos เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปลี่ยนลำดับ sequence ที่เกิดจากการใช้ reverse primer และเป็นโปรแกรมที่ใช้ในการดู primer dimer

การทำ real – time PCR ด้วย Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสของ primer และ probe บริเวณ promoter ที่ใช้ในการทำ

Real – time PCR

	Primer	Type	Sequence (5' → 3')
Primer's name	UGT1A1_F1	Forward	GTCACGTGACACAGTCAAA
	UGT1A1_Rpromoter	Reverse	CCAAGCATGCTCAGCCAG
Probe's name	UGT1A1_sensor	Donor	TTTGCTCCTGCCAGAGGTTCCGCCCT[F1c]
	UGT1A1_anchor	Acceptor	[LC640]CCTACTTATATATATATATATATG GCAAAAAC[Phos]

ตารางที่ 6 แสดงสารเคมีและปริมาณที่ใช้ในการทำ Real – time PCR บริเวณ promoter

สารเคมี	ปริมาณ(μ l/tube)
Distilled water	6.5
2× Mastermix (5PRIME, Germany)	10
Forward primer (10 μ M)	0.5
Reverse primer (10 μ M)	0.5
Donor probe (5 μ M)	0.75
Acceptor probe (5 μ M)	0.75
DNA template	1.5
Total volume	20

ตารางที่ 7 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ Real – time PCR ในส่วน promoter

PCR cycle	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา
Pre-denaturing	95	5 นาที
Denaturing	95	10 วินาที
Annealing	60	30 วินาที
Denaturing	95	30 วินาที
Melting	45 – 70	(ramp rate 0.05 °C/sec)

การวิเคราะห์ผลการทดลองจากการทำ Real – time PCR ด้วย FRET

การวิเคราะห์ผลของ FRET จะใช้โปรแกรม LightCycler480 และวิเคราะห์โดยใช้ Melt curve genotyping และ Tm calling

การตรวจสอบข้อมูล

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing จะถูกวิเคราะห์รูปแบบของยีน (genotype) ในตำแหน่งที่สนใจ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast นอกจากนี้ยังใช้โปรแกรม Chromas lite และ Bioedit ในการดูผลกราฟ chromatogram

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ความถี่ของรูปแบบของยีน (genotype) บริเวณ TATA box และ 211G>A หาได้จากผลบวกของจีโนไทป์ที่พบจริงจากการจำแนกชนิดด้วยวิธี direct sequencing
- การคำนวณหาความถี่ของอัลลีล (Allele frequencies) สามารถคำนวณดังนี้

1. คำนวณจากความถี่ของจีโนไทป์

$$p = f(AA) + \frac{1}{2}f(Aa) = \text{ความถี่ของอัลลีล A}$$

$$q = f(aa) + \frac{1}{2}f(Aa) = \text{ความถี่ของอัลลีล a}$$

: $f(AA)$ คือ ความถี่ของจีโนไทป์ AA, $f(Aa)$ คือ ความถี่ของจีโนไทป์ Aa และ $f(aa)$ คือ ความถี่ของจีโนไทป์ aa

$$\text{โดยที่ } p + q = f(AA) + f(Aa) + f(aa) = 1$$

$$\text{จากสูตรทำให้ได้ } q = 1 - p \text{ และ } p = 1 - q$$

2. คำนวณจากจำนวนประชากรที่สำรวจ

$$p(AA) = \frac{2(AA) + (Aa)}{2(AA+Aa+aa)}$$

$$p(aa) = \frac{2(aa) + (Aa)}{2(AA+Aa+aa)}$$

: AA คือ ความถี่ของจีโนไทป์ AA, Aa คือ ความถี่ของจีโนไทป์ Aa, aa คือ ความถี่ของจีโนไทป์ aa

นอกจากนี้ใช้ค่าสถิติ Chi-square ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p - \text{value} < 0.05$) ในการหาความเกี่ยวข้องระหว่างการกลายพันธุ์ของบริเวณ TATA box บริเวณ promoter และ 211G>A บริเวณ exon1 กับการก่อให้เกิดอาการตัวเหลืองและหาความเสี่ยงในการทำให้เกิดอาการตัวเหลืองโดยใช้ค่าสถิติ Odd Ratio (OR) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 13.0

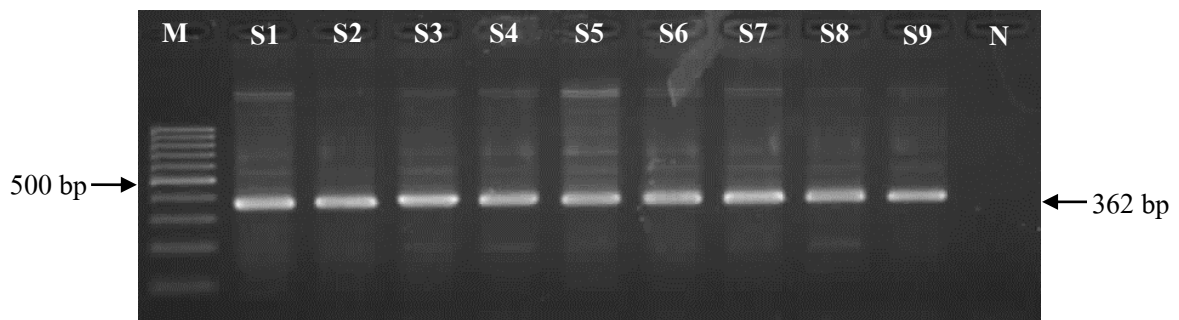
บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

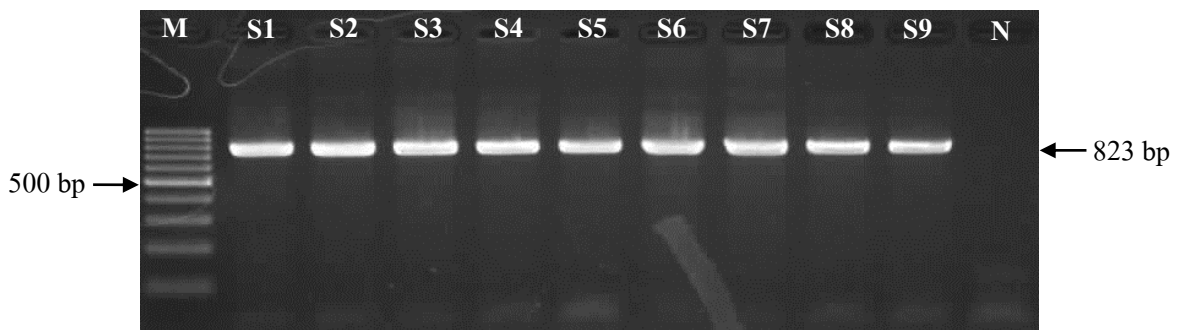
ผลการวิเคราะห์

1. ผลการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR

จากการนำตัวอย่างเลือดของเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษา จำนวน 71 คน และตัวอย่างเลือดจากคนไทยปกติที่ได้จากตัวอย่างที่เหลือจากสภากาชาดไทย จำนวน 115 คน แล้วทำการสกัด DNA ด้วยวิธี Phenol – chloroform extraction จากนั้นทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR และนำ PCR product มาทำ agarose gel electrophoresis ได้ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ในส่วน promoter ขนาดประมาณ 362 bp ดังภาพที่ 14 และ บริเวณ exon1 มีขนาดประมาณ 823 bp เพื่อวิเคราะห์จีโนไทป์บริเวณ 211G>A ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 14 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของยีน *UGT1A1* บริเวณ promoter ได้ผลผลิตขนาด 362 bp โดย M คือ 100 bp marker, S1 – S9 คือตัวอย่างที่ 1 – 9 และ N คือ negative control

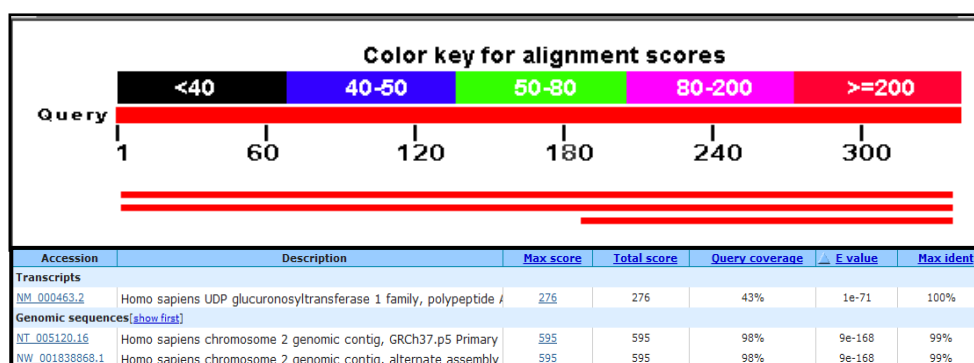


ภาพที่ 15 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของยีน *UGT1A1* บริเวณ exon1 ได้ผลผลิตขนาด 823 bp โดย M คือ 100 bp marker, S1 – S9 คือตัวอย่างที่ 1 – 9 และ N คือ negative control

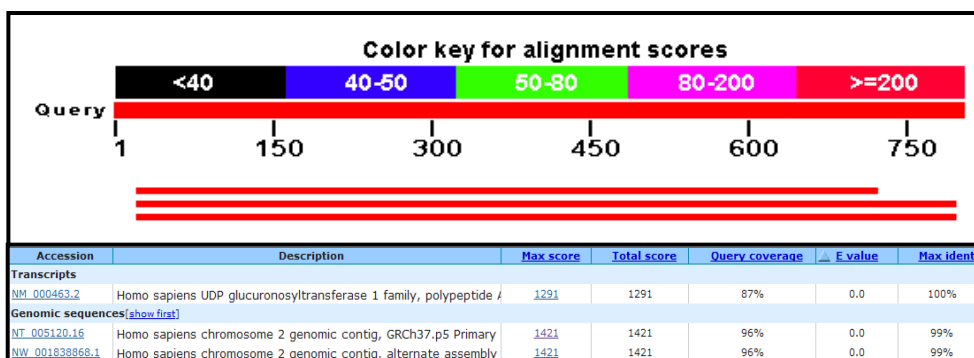
จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCRExtract & GelExtract Mini Kits (5PRIME, Germany) และ
หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งตรวจกับบริษัท First base laboratories SDN BHD

2. ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ direct sequencing ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอ
ไทด์โดยใช้โปรแกรม BLAST เปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank ในตำแหน่ง TA box
(ภาพที่ 16) พบว่ามีความเหมือนกับ Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 1 family,
polypeptide A (UGT1A1) (Identities = 149/149 bp, 100%) และในตำแหน่ง 211G>A (ภาพที่ 17)
พบว่ามีความเหมือนกับ Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A
(UGT1A1) (Identities = 699/699 bp, 100%)

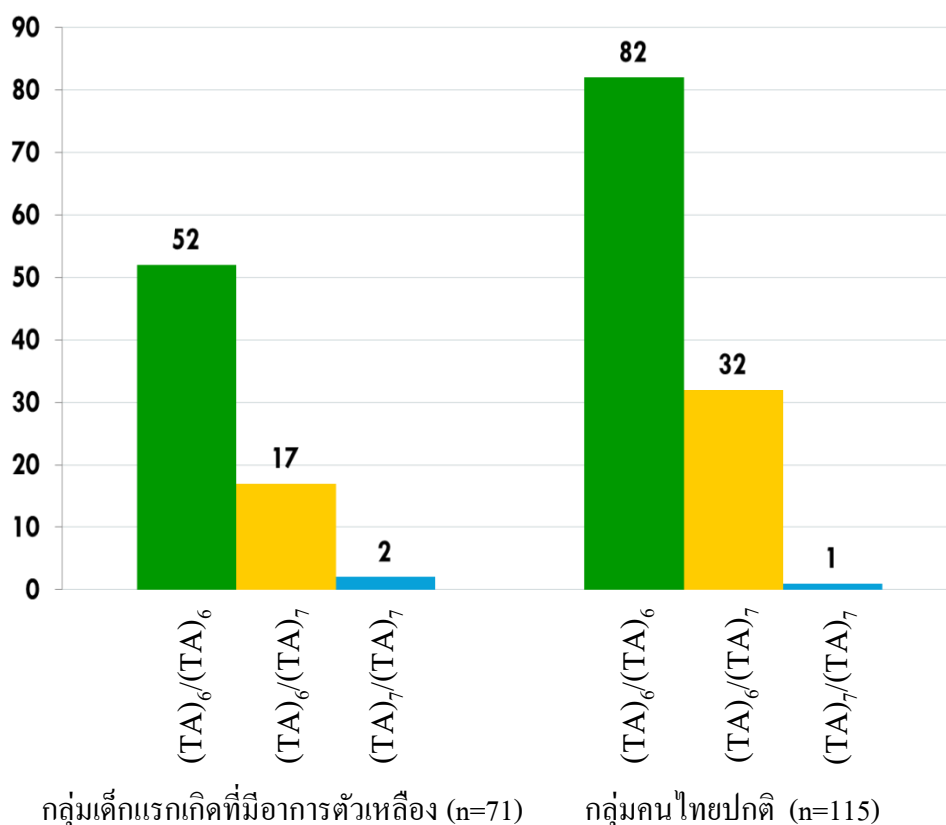


ภาพที่ 16 ผลการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง TA box บริเวณ promoter กับลำดับ
นิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล



ภาพที่ 17 ผลการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง 211G>A บริเวณ exon1 กับลำดับ
นิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

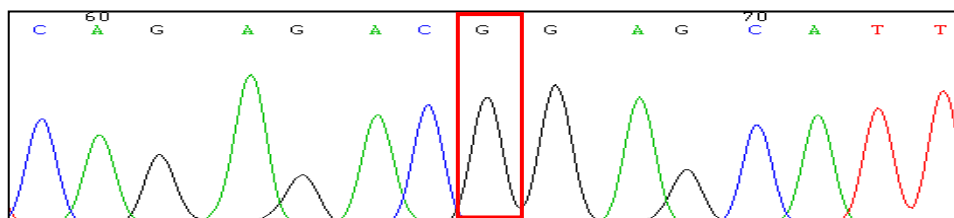
จากกลุ่มตัวอย่างเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและได้รับการทำการส่องไฟรักษาจำนวน 71 ราย พบความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous $A(TA)_6TAA$ จำนวน 52 ราย, แบบ heterozygous $A(TA)_6TAA / A(TA)_7TAA$ จำนวน 17 ราย และแบบ homozygous $A(TA)_7TAA$ จำนวน 2 ราย ในกลุ่มคนไทยปกติจำนวน 115 ราย มีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous $A(TA)_6TAA$ จำนวน 82 ราย, แบบ heterozygous $A(TA)_6TAA / A(TA)_7TAA$ จำนวน 32 ราย และแบบ homozygous $A(TA)_7TAA$ จำนวน 1 ราย แสดงดังภาพที่ 19



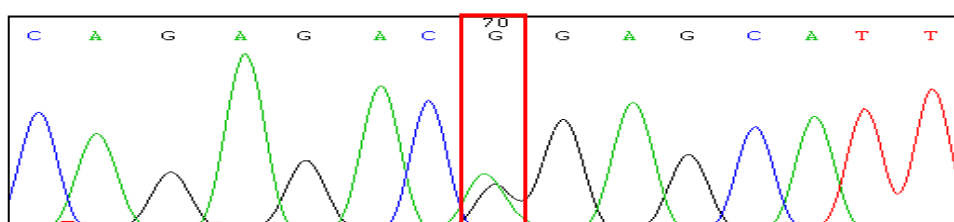
ภาพที่ 19 แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TA box ในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและในกลุ่มคนไทยปกติ

นอกจากนี้ผลการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ exon1 ตำแหน่ง 211G>A แสดงดังภาพที่ 20

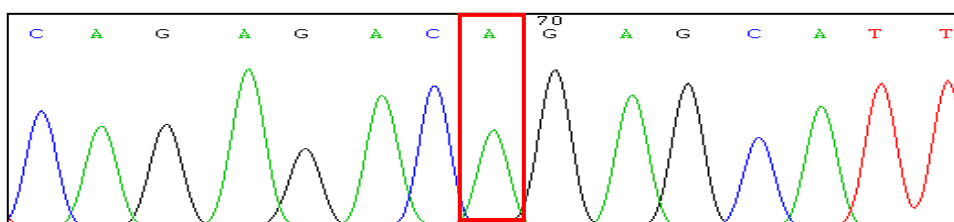
ก. G/G



ข. G/A

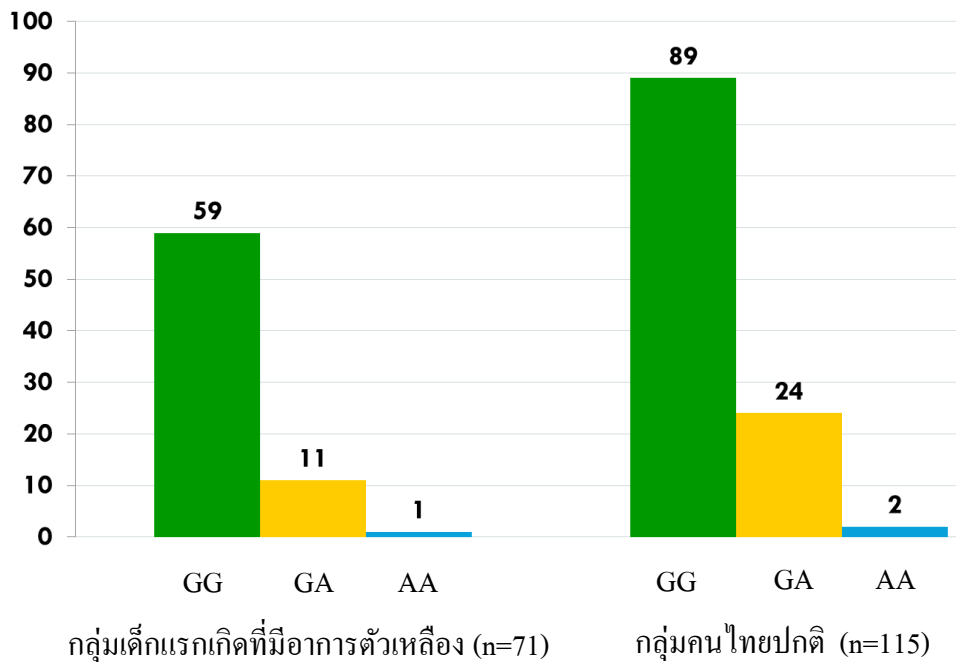


ค. A/A



ภาพที่ 20 แสดงตัวอย่าง Chromatogram ของยีน *UGT1A1* บริเวณ exon1 ตำแหน่ง 211G>A แสดงลักษณะจีโนไทป์ 3 รูปแบบ ก. แสดง Homozygous GG ข. แสดง Heterozygous GA ค. แสดง Homozygous AA ด้วยโปรแกรม Chromas lite

จากการวิเคราะห์ด้วย direct sequencing พบว่าจากกลุ่มตัวอย่างเด็กแรกเกิดตัวเหลือง จำนวน 71 ราย พบความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 59 ราย, แบบ heterozygous GA จำนวน 11 ราย และแบบ homozygous AA จำนวน 1 ราย ในกลุ่มคนไทยปกติจำนวน 115 ราย มีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 89 ราย, แบบ heterozygous GA จำนวน 24 ราย และแบบ homozygous AA จำนวน 2 ราย แสดงดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 แผนภูมิแท่งแสดงความถี่จีโนไทป์ของยีน *UGT1A1* บริเวณ 211G>A ในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและในกลุ่มคนไทยปกติ

3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการศึกษาในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษามีอายุไม่เกิน 7 วัน จำนวน 71 คน พบว่า เด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองที่ไม่ทราบสาเหตุมีจำนวน 54 ราย เด็กแรกเกิดที่มี ABO incompatibility จำนวน 6 ราย เด็กแรกเกิดที่มี cephalhematoma จำนวน 5 ราย เด็กแรกเกิดที่มี polycythemia จำนวน 1 ราย เด็กแรกเกิดที่มีความผิดปกติของเอนไซม์ G-6-PD จำนวน 2 ราย และเด็กแรกเกิดที่มี subgaleal hematoma จำนวน 3 ราย ซึ่งเด็กแรกเกิดที่มีความผิดปกติของเอนไซม์ G-6-PD และเด็กแรกเกิดที่มี subgaleal hematoma ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ทั้งในบริเวณ TATA box และ 211G>A ซึ่งข้อมูลทางสถิติของเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและได้รับการส่องไฟรักษาจำนวน 71 ราย แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงข้อมูลทางสถิติของเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและได้รับการส่องไฟรักษา

ข้อมูล	กลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลือง (n = 71)
เพศ (ชาย : หญิง)	43:28
อายุครรภ์(สัปดาห์)	38.38 ± 1.61
น้ำหนักแรกเกิด (กรัม)	3143.45 ± 398.42
ปริมาณบิลิรูบินสูงสุด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)	13.43 ± 1.77

จากตารางที่ 8 พบว่าจากเด็กแรกเกิดทั้งหมด 71 ราย มีเพศชายจำนวน 43 ราย และมีเพศหญิงจำนวน 28 ราย ค่าเฉลี่ยของอายุของอายุครรภ์มารดาเท่ากับ 38.38 ± 1.61 สัปดาห์ ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเด็กแรกเกิดเท่ากับ 3143.45 ± 398.42 กรัม และค่าปริมาณบิลิรูบินสูงสุดในเด็กแรกเกิดเท่ากับ 13.43 ± 1.77 มิลลิกรัม/เดซิลิตร

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ในตำแหน่ง TA box พบว่าในกลุ่มประชากรทั่วไปจำนวน 115 ราย มีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous $A(TA)_6TAA$ จำนวน 82 ราย (ร้อยละ 71.30), แบบ heterozygous $A(TA)_6TAA / A(TA)_7TAA$ จำนวน 32 ราย (ร้อยละ 27.83) และแบบ homozygous $A(TA)_7TAA$ จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 0.87) และในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous $A(TA)_6TAA$ จำนวน 52 ราย (ร้อยละ 73.24), แบบ heterozygous $A(TA)_6TAA / A(TA)_7TAA$ จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 23.94) และแบบ homozygous $A(TA)_7TAA$ จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 2.82) ความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและกลุ่มคนไทยปกติพบว่า อัลลีล $A(TA)_6TAA$ มีความถี่ 0.85 และ อัลลีล $A(TA)_7TAA$ มีความถี่ 0.15 ทั้งสองกลุ่ม เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบโดยใช้ค่าสถิติ chi-square ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p - value < 0.05$) พบว่า จีโนไทป์ $A(TA)_7TAA$ ไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง และในแต่ละจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p - value = 0.78$) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า TA repeat บริเวณ

promoter ไม่ก่อความเสี่ยงในการเกิดอาการตัวเหลือง โดยมีค่า Odd ratio เท่ากับ 1.10 (95%CI = 0.57 – 2.14) (ตารางที่ 9)

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติในตำแหน่ง 211G>A พบว่าในกลุ่มคนไทยปกติ จำนวน 115 ราย มีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 89 ราย (ร้อยละ 77.39), แบบ heterozygous GA จำนวน 24 ราย (ร้อยละ 20.87) และแบบ homozygous AA จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 1.74) และในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 59 ราย (ร้อยละ 83.10), แบบ heterozygous GA จำนวน 11 ราย (ร้อยละ 15.50) และแบบ homozygous AA จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 1.41) ความถี่ของอัลลีลในกลุ่มคนไทยปกติพบว่า อัลลีล G มีความถี่ 0.88 และ อัลลีล A มีความถี่ 0.12 ในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 0.91 และความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 0.09 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบโดยใช้ค่าสถิติ chi-square ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p – value < 0.05) พบว่า จีโนไทป์ AA ไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง และในแต่ละจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p – value = 0.35) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจีโนไทป์ GA และ AA ไม่ก่อให้ความเสี่ยงในการเกิดตัวเหลือง โดยมีค่า Odd ratio เท่ากับ 1.44 (95%CI = 0.67 – 3.07) (ตารางที่ 9)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการกลายพันธุ์ของทั้งสองตำแหน่งพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งค่าความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีล นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของทั้งสองตำแหน่งไม่มีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง และไม่พบว่าในเด็กแรกเกิดที่มีการกลายพันธุ์ A(TA)_nTAA มีการกลายพันธุ์ 211G>A ร่วมด้วย

ตำแหน่ง	ความถี่ของจีโนไทป์						ความถี่ของอัลลีล				Odd ratio	95% CI	P-value	
	เด็กแรกเกิดตัวเหลือง (n=71)			กลุ่มคนไทยปกติ (n=115)			เด็กแรกเกิดตัวเหลือง (n=71)		กลุ่มคนไทยปกติ (n=115)					
TA promoter	6/6	6/7	7/7	6/6	6/7	7/7	6/6	7/7	6/6	7/7				
	52	17	2	82	32	1	0.85	0.15	0.85	0.15	1.10	0.57 - 2.14	0.78	
211G>A	GG	GA	AA	GG	GA	AA	GG	AA	GG	AA				
	59	11	1	89	24	2	0.91	0.09	0.88	0.12	1.44	0.67 - 3.07	0.35	

ตารางที่ 9 แสดงค่าความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองที่ได้รับการ

ส่องไฟรักษาและกลุ่มคนไทยปกติ แสดงค่าOdd ratio, 95% CI และ ค่า p- value

นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยนำเด็กตัวเหลืองที่ไม่ทราบสาเหตุมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบกับกลุ่มคนไทยปกติ ซึ่งผลแสดงดังตารางที่ 10

ตำแหน่ง	ความถี่ของจีโนไทป์		ความถี่ของอัลลีล		Odd ratio	95% CI	P-value
	เด็กแรกเกิดตัวเหลือง (n=71)		เด็กแรกเกิดตัวเหลือง กลุ่มคนไทยปกติ (n=115)				
TA promoter	6/6	7/7	6/6	7/7	6/6	7/7	
	40	12	1	82	32	1	0.86
					0.14	0.85	0.15
211G>A	GG	GA	AA	GG	GA	AA	GG
	44	9	1	89	24	2	0.90
					0.10	0.88	0.12
					1.19	0.67 – 2.13	0.55

ตารางที่ 10 แสดงค่าความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองที่ได้รับการ

ส่องไฟรักษาโดยไม่ทราบสาเหตุและกลุ่มคนไทยปกติ แสดงค่าOdd ratio, 95% CI และค่า p-value

พบว่าบริเวณ TA promoter ของกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous A(TA)₆TAA จำนวน 40 ราย, แบบ heterozygous A(TA)₆TAA /A(TA)₇TAA จำนวน 13 ราย และแบบ homozygous A(TA)₇TAA จำนวน 1 ราย ความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองพบว่า อัลลีล A(TA)₆TAA มีความถี่ 0.86 อัลลีล A(TA)₇TAA มีความถี่ 0.14 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบโดยใช้ค่าสถิติ chi-square ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p - value < 0.05$) พบว่า จีโนไทป์ A(TA)₇TAA ไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง และในแต่ละจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p - value = 0.78$) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า TA repeat บริเวณ promoter ไม่ก่อความเสี่ยงในการเกิดอาการตัวเหลือง โดยมีค่า Odd ratio เท่ากับ 1.03 (95%CI = 0.63 – 1.69) (ตารางที่ 10)

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติในตำแหน่ง 211G>A พบว่าในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 44 ราย, แบบ heterozygous GA จำนวน 9 ราย และแบบ homozygous AA จำนวน 1 ราย ความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 0.90 และความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 0.10 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบโดยใช้ค่าสถิติ chi-square ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p - value < 0.05$) พบว่า จีโนไทป์ AA ไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง และในแต่ละจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p - value = 0.55$) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจีโนไทป์ GA และ AA ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดตัวเหลือง โดยมีค่า Odd ratio เท่ากับ 1.19 (95%CI = 0.67 – 2.13) (ตารางที่ 10)

เมื่อนำผลจากการทำ sequencing มาแยกตามสาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลืองและไม่ทราบสาเหตุของอาการตัวเหลือง พบว่าเด็กที่เป็น ABO incompatibility จำนวน 6 ราย มี homozygous A(TA)₆TAA จำนวน 5 ราย และ heterozygous A(TA)₆TAA /A(TA)₇TAA จำนวน 1 ราย เด็กที่เป็น Cephalohematoma จำนวน 5 ราย มี homozygous A(TA)₆TAA จำนวน 3 ราย heterozygous A(TA)₆TAA /A(TA)₇TAA จำนวน 1 ราย และ homozygous A(TA)₇TAA จำนวน 1 ราย เด็กที่เป็น Subgaleal hematoma จำนวน 3 ราย มี homozygous A(TA)₆TAA จำนวน 2 ราย heterozygous A(TA)₆TAA /A(TA)₇TAA จำนวน 1 ราย เด็กที่เป็น G-6-PD จำนวน 2 ราย มี homozygous A(TA)₆TAA จำนวน 2 ราย เด็กที่เป็น Polycythemia จำนวน 1 ราย มี heterozygous

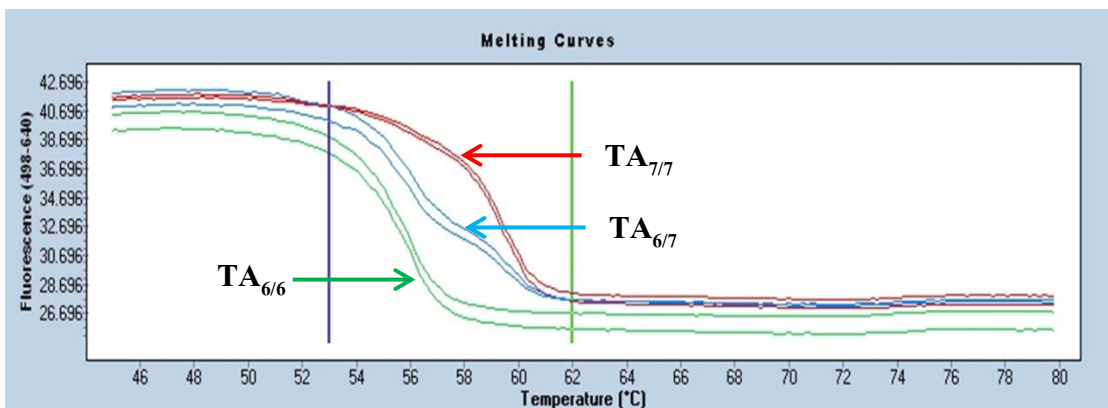
A(TA)₆TAA /A(TA)₇TAA จำนวน 1 ราย ส่วนอาการตัวเหลืองที่ไม่ทราบสาเหตุจำนวน 54 ราย พบว่ามี homozygous A(TA)₆TAA จำนวน 40 ราย และ heterozygous A(TA)₆TAA /A(TA)₇TAA จำนวน 13 ราย และ homozygous A(TA)₇TAA จำนวน 1 ราย ส่วนในตำแหน่ง 211G>A พบว่า ABO incompatibility จำนวน 6 ราย มี homozygous GG จำนวน 5 ราย และ heterozygous GA จำนวน 1 ราย เด็กที่เป็น Cephalohematoma จำนวน 5 ราย มี GG จำนวน 5 ราย เด็กที่เป็น Subgaleal hematoma จำนวน 3 ราย มี GG จำนวน 2 ราย GA จำนวน 1 ราย เด็กที่เป็น G-6-PD จำนวน 2 ราย มี GG จำนวน 2 ราย เด็กที่เป็น Polycythemia จำนวน 1 ราย มี GG จำนวน 1 ราย ส่วนอาการตัวเหลืองที่ไม่ทราบสาเหตุจำนวน 54 รายพบว่ามี GG จำนวน 44 ราย และ GA จำนวน 9 ราย และ AA จำนวน 1 ราย (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงสาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลืองกับการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง TA repeat และ 211G>A

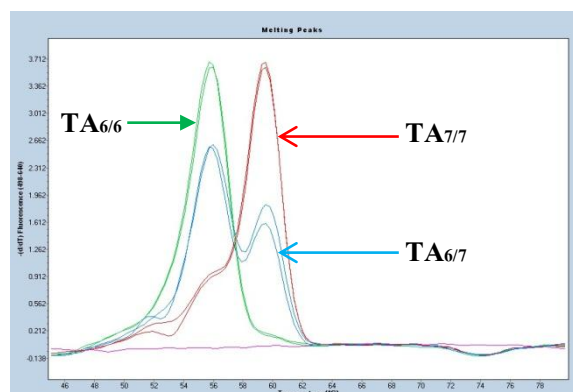
สาเหตุของการเกิด อาการตัวเหลือง	TA repeat			211G>A		
	6/6	6/7	7/7	G/G	G/A	A/A
ABO incompatibility (n=6)	5	1	-	5	1	-
Cephalohematoma (n=5)	3	1	1	5	-	-
Subgaleal hematoma(n=3)	2	1	-	2	1	-
G-6-PD (n=2)	2	-	-	2	-	-
Polycythemia (n=1)	-	1	-	1	-	-
Unspecified (n=54)	40	13	1	44	9	1

4. ผลการตรวจการกลายพันธุ์บริเวณ TA repeat ด้วยเทคนิค Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

จากการนำพลาสมิดที่ใส่ชิ้นยีนบริเวณ TA repeat มาเป็น template ในการทำ real – time PCR เพื่อพัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ TA repeat ของยีน *UGT1A1* จากการทำการทดลองโดย melting อยู่ในช่วง 45 – 70 °C และมี ramp rate 0.05 °C /S เมื่อได้ผลการทดลองแล้วทำการวิเคราะห์ด้วย melt curve genotyping โดยจะตัดช่วงอุณหภูมิที่มีความแตกต่างในแต่ละจีโนไทป์มากที่สุด ดังภาพที่ 22 จากนั้นทำการคำนวณโดยโปรแกรมของ LightCycler 480 (Roche, Germany) จะพบว่าสามารถแยกได้ทั้ง 3 จีโนไทป์ ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 22 แสดงการตัดช่วงอุณหภูมิเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ melt curve genotyping โดยมีพลาสมิดเป็น template



ภาพที่ 23 แสดงผลของการกลายพันธุ์ของทั้ง 3 จีโนไทป์โดยใช้เทคนิค FRET

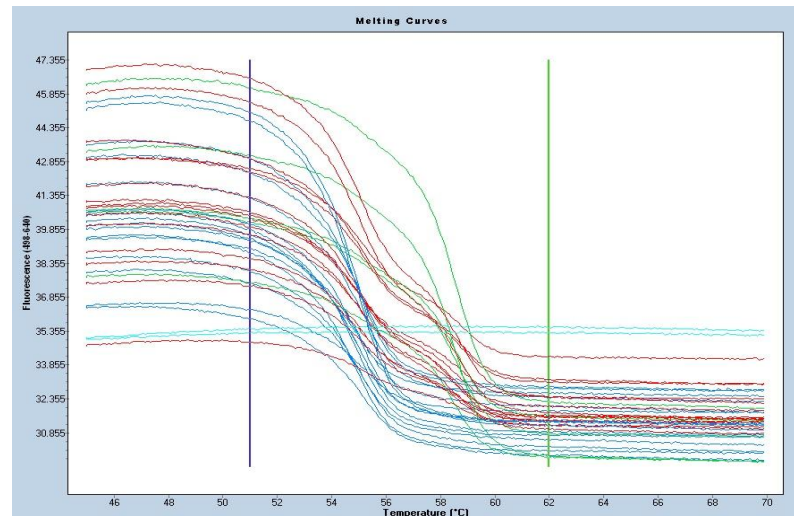
(สีเขียว : homozygous $A(TA)_6TAA$, สีฟ้า : heterozygous $A(TA)_6TAA/ A(TA)_7TAA$, สีแดง : homozygous $A(TA)_7TAA$)

นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้ Tm calling เพื่อแสดงให้เห็นถึงค่า Tm ในการแยกแต่ละ จีโนไทป์ แสดงดังตารางที่ 12 โดยจีโนไทป์ homozygous A(TA)₆TAA มี Tm ประมาณ 55 °C, จีโนไทป์ homozygous A(TA)₇TAA มี Tm ประมาณ 59 °C และ จีโนไทป์ heterozygous A(TA)₆TAA /A(TA)₇TAA จะพบว่าค่าของทั้งสองช่วงจึงมีค่า Tm สองค่า

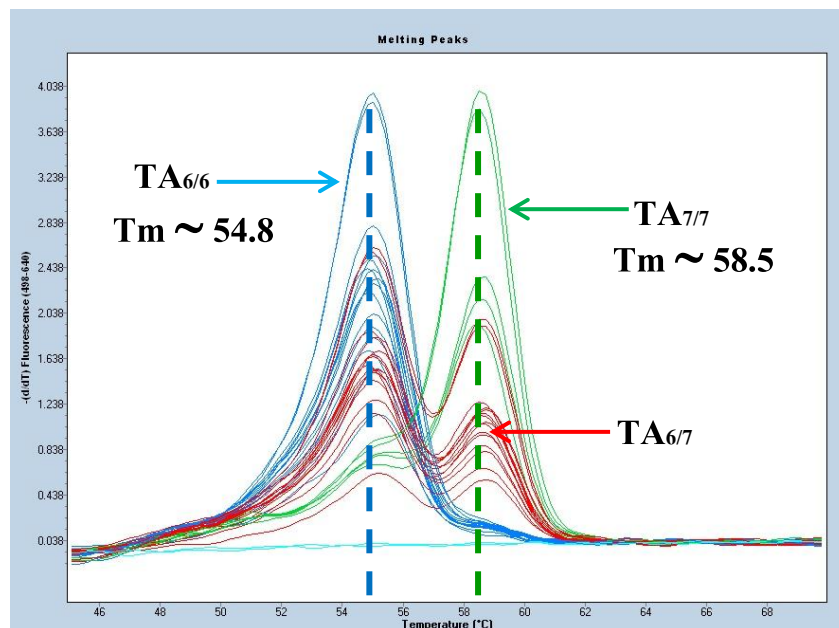
ตารางที่ 12 แสดงค่า Tm ในการแยกแต่ละจีโนไทป์

ตำแหน่ง	ชื่อ	Tm1	Tm2
A1	6/6	55.72	
A2	7/7	59.44	
A3	6/7	55.90	59.75
A4	NTC		
C1	6/6	55.65	
C2	7/7	59.48	
C3	6/7	55.78	59.62
C4	NTC		

และจากการนำ DNA ของเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและประชากรไทยเป็น template ในการ ทำ real-time PCR แล้วทำการวิเคราะห์ด้วย melt curve genotyping โดยจะตัดช่วงอุณหภูมิที่ Minimum Temperature 51°C และ Maximum Temperature 62°C โดยมีค่า Score Threshold เท่ากับ 0.72 และค่า Resolution Threshold เท่ากับ 0.10 ดังภาพที่ 24 และ ทำการคำนวณโดยใช้ โปรแกรม LightCycler พบว่าสามารถแยกได้ทั้ง 3 จีโนไทป์ ดังภาพที่ 25 นอกจากนี้ยังทำการ วิเคราะห์ผลโดยใช้ Tm calling เพื่อแสดงให้เห็นถึงค่า Tm ในการแยกแต่ละจีโนไทป์ โดย จีโนไทป์ homozygous A(TA)₆TAA มี Tm ประมาณ 54 – 55 °C, จีโนไทป์ homozygous A(TA)₇TAA มี Tm ประมาณ 58 – 59 °C และ จีโนไทป์ heterozygous A(TA)₆TAA /A(TA)₇TAA จะพบว่าค่า Tm อยู่ในช่วงของทั้งสองจีโนไทป์



ภาพที่ 24 แสดงการตัดช่วงอุณหภูมิเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ melt curve genotyping โดยใช้ DNA ของเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและคนไทยปกติเป็น template



ภาพที่ 25 แสดงผลของการกลายพันธุ์ของทั้ง 3 จีโนไทป์ของตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค FRET (สีฟ้า: homozygous A(TA)₆TAA, สีแดง: heterozygous A(TA)₆TAA/ A(TA)₇TAA, สีเขียว: homozygous A(TA)₇TAA)

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR และ เทคนิค real – time PCR ด้วย FRET พบว่า ทั้งในกลุ่มคนไทยปกติและกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีลักษณะของจีโนไทป์ทั้ง 3 จีโนไทป์เหมือนกันทั้งสองเทคนิค ซึ่งการทำ real – time PCR จะใช้เวลาน้อยกว่าเทคนิค PCR และลดการปนเปื้อนได้มากกว่า

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในเด็กแรกเกิดส่วนใหญ่มักพบอาการตัวเหลืองโดยไม่ทราบสาเหตุ ซึ่งทำให้ปริมาณบิลิรูบินในเลือดมีปริมาณสูง โดยสาเหตุที่ก่อให้เกิดอาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิดอาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่นความแตกต่างทางลักษณะพันธุกรรม ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ปัจจัยด้านความแตกต่างทางเชื้อชาติ น้ำหนักแรกเกิดน้อย การดื่มนมแม่ เป็นต้น การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการตัวเหลืองเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ *UGT1A1* ลดลง ส่งผลให้การกำจัดบิลิรูบินออกจากเลือดได้น้อยลง ทำให้เกิดการสะสมของบิลิรูบินเป็นจำนวนมาก โดยเอนไซม์ *UGT1A1* พบมากในตับ ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่พบมากคือตำแหน่ง TA repeat บริเวณ promoter ซึ่งมักพบเป็นจีโนไทป์ $A(TA)_7TAA$ และตำแหน่ง $211G>A$ บริเวณ exon1 ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ใน 2 ตำแหน่งนี้และศึกษาหาความเกี่ยวข้องของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* และการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง

ในการศึกษารุ่นนี้ได้ทำการศึกษาในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษาจำนวน 71 รายและในกลุ่มคนไทยปกติจำนวน 115 ราย วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ในทั้งสองตำแหน่งคือ วิธี PCR ซึ่งออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อการจับในช่วงของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งผลของการทำ PCR พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมาสำหรับงานวิจัยนี้มีความจำเพาะในการเพิ่มจำนวนของยีน และไม่มี non-specific amplification นอกเหนือจาก band ที่คาดไว้ นอกจากนี้ลักษณะของ band PCR product ที่ได้จากการทำ electrophoresis นั้นมีความชัดเจนและสามารถนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้โดยตรง ไม่ต้องทำ DNA cloning หลังจากการทำ direct sequencing แล้วนำผลที่ได้ไป BLAST เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล 100% ผลที่ได้แสดงถึงการจับกันอย่างจำเพาะของการออกแบบไพรเมอร์

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* บริเวณ TA repeat ของ promoter ในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษามีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous $A(TA)_6TAA$ จำนวน 52 ราย (ร้อยละ 73.24), แบบ heterozygous $A(TA)_6TAA / A(TA)_7TAA$ จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 23.94) และแบบ homozygous $A(TA)_7TAA$ จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 2.82) และในกลุ่มคนไทยปกติจำนวน 115 ราย มีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous $A(TA)_6TAA$ จำนวน 82 ราย (ร้อยละ 71.30), แบบ heterozygous $A(TA)_6TAA / A(TA)_7TAA$

จำนวน 32 ราย (ร้อยละ 27.83) และแบบ homozygous A(TA)_nTAA จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 0.87) ความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและกลุ่มคนไทยปกติพบว่า อัลลีล A(TA)_nTAA มีความถี่ 0.85 และ อัลลีล A(TA)_nTAA มีความถี่ 0.15 ทั้งสองกลุ่มประชากร เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบโดยใช้ค่าสถิติ chi-square ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p - value < 0.05$) พบว่าจีโนไทป์ A(TA)_nTAA ไม่มีความแตกต่างกันในเด็กแรกเกิดอาการตัวเหลืองและในกลุ่มคนไทยปกติ นอกจากนี้ จีโนไทป์ A(TA)_nTAA ไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง และในแต่ละจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p - value = 0.78$) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า TA repeat บริเวณ promoter ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดตัวเหลือง โดยมีค่า Odd ratio เท่ากับ 1.10 (95%CI = 0.57 – 2.14)

จากผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* บริเวณ 211G>A ของ exon1 ในกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษามีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 59 ราย (ร้อยละ 83.10), แบบ heterozygous GA จำนวน 11 ราย (ร้อยละ 15.50) และแบบ homozygous AA จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 1.41) และในกลุ่มคนไทยปกติจำนวน 115 ราย มีความถี่ของจีโนไทป์แบบ homozygous GG จำนวน 89 ราย (ร้อยละ 77.39), แบบ heterozygous GA จำนวน 24 ราย (ร้อยละ 20.87) และแบบ homozygous AA จำนวน 2 ราย (ร้อยละ 1.74) ในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 0.91 และความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 0.09 ความถี่ของอัลลีลในกลุ่มคนไทยปกติพบว่า อัลลีล G มีความถี่ 0.88 และ อัลลีล A มีความถี่ 0.12 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบโดยใช้ค่าสถิติ chi-square ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p - value < 0.05$) พบว่า จีโนไทป์ AA ไม่มีความแตกต่างกันในเด็กแรกเกิดตัวเหลืองและในกลุ่มคนไทยปกติ นอกจากนี้จีโนไทป์ AA ยังไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง และในแต่ละจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p - value = 0.35$) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจีโนไทป์ GA และ AA ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดตัวเหลือง โดยมีค่า Odd ratio เท่ากับ 1.44 (95%CI = 0.67 – 3.07)

นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ผลจากการ sequencing โดยนำกลุ่มเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษาและไม่ทราบสาเหตุของการตัวเหลืองมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มคนไทยปกติ พบว่าบริเวณ TA promoter มีความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองพบว่า อัลลีล A(TA)_nTAA มีความถี่ 0.86 อัลลีล A(TA)_nTAA มีความถี่ 0.14 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบโดยใช้ค่าสถิติ chi-square ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p - value < 0.05$) พบว่า จีโนไทป์ A(TA)_nTAA ไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง และในแต่ละจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p - value = 0.90$)

เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า TA repeat บริเวณ promoter ไม่ก่อความเสี่ยงในการเกิดอาการตัวเหลือง โดยมีค่า Odd ratio เท่ากับ 1.03 (95%CI = 0.63 – 1.69) และในการกลายพันธุ์ตำแหน่ง 211G>A พบว่า ความถี่ของอัลลีลในกลุ่มเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองมีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 0.90 และความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 0.10 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยค่าสถิติ chi-square ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (p – value < 0.05) พบว่า จีโนไทป์ AA ไม่มีความเกี่ยวข้องต่อการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง และในแต่ละจีโนไทป์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p – value = 0.55) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจีโนไทป์ GA และ AA ไม่ก่อให้ความเสี่ยงในการเกิดตัวเหลือง โดยมีค่า Odd ratio เท่ากับ 1.19 (95%CI = 0.67 – 2.13)

จากการทดลองทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า การกลายพันธุ์ของทั้งสองตำแหน่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งค่าความถี่ของจีโนไทป์และความถี่ของอัลลีล นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของทั้งสองตำแหน่งไม่มีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดอาการตัวเหลือง

ในการศึกษาหาความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TA repeat ของ promoter พบว่า A(TA)₇TAA เป็นจีโนไทป์ที่พบการกลายพันธุ์มากที่สุด โดยในชาว Caucasian มีความถี่ของอัลลีล A(TA)₇TAA เท่ากับ 0.36 – 0.39 ในชาวแอฟริกันมีความถี่ของอัลลีล A(TA)₇TAA เท่ากับ 0.43 ในชาวมลายูและชาวญี่ปุ่นมีความถี่ของอัลลีล A(TA)₇TAA เท่ากับ 0.16 และ 0.15 ตามลำดับ [6, 8, 9] ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าในคนไทยปกติมีความถี่ของอัลลีล A(TA)₇TAA เท่ากับ 0.15 ซึ่งในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองและได้รับการส่องไฟรักษามีค่าความถี่ของอัลลีลเช่นเดียวกับกลุ่มคนไทยปกติ โดยจากการวิจัยพบว่าความถี่ของอัลลีล A(TA)₇TAA ในเด็กแรกเกิดตัวเหลืองชาวไทยมีค่าสอดคล้องกับชาวเอเชียชาติอื่นๆ ซึ่งการกลายพันธุ์บริเวณ TA repeat ของ promoter เป็นสาเหตุหนึ่งในการก่อให้เกิด Gilbert syndrome หากเกิดการกลายพันธุ์บริเวณ coding region ร่วมด้วยจะก่อให้เกิด Crigler - Najjar syndrome [4] ในเด็กแรกเกิดที่มี homozygous A(TA)₇TAA พบว่า มี jaundice index เพิ่มขึ้นใน 2 วันแรกหลังจากคลอดเมื่อเปรียบเทียบกับ heterozygous A(TA)₆TAA/ A(TA)₇TAA และ homozygous A(TA)₆TAA [3] ในงานวิจัยของ Bosma และคณะ พบว่าจีโนไทป์ homozygous A(TA)₇TAA ไม่ได้เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิด Gilbert syndrome ในประชากรชาวผิวขาวพบว่า การกลายพันธุ์บริเวณ TA repeat เป็นการกลายพันธุ์ที่พบได้มากในผู้ป่วยที่เป็น Gilbert syndrome และการกลายพันธุ์แบบ A(TA)₇TAA หรือการกลายพันธุ์ที่มีจำนวน TA repeat เพิ่มมากขึ้นมีความสัมพันธ์ในการก่อให้เกิดการสะสมของบิลิรูบินมากยิ่งขึ้น [7] นอกจากนี้ยังพบ A(TA)₅TAA และ A(TA)₈TAA ในประชากรแอฟริกัน เมื่อมี TA repeat มากขึ้นกว่าปกติจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ลดลง ซึ่งความสัมพันธ์ของ TA repeat บริเวณ promoter และปริมาณบิลิรูบินในเลือด

ขึ้นกับเชื้อชาติ [6] โดยจากการศึกษานี้พบว่าในในเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่า $A(TA)_7TAA$ ไม่ได้เป็นหนึ่งในสาเหตุในการก่อให้เกิดอาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิดชาวไทย ซึ่งโดยปกติแล้วผู้ที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง TA repeat บริเวณ promoter ของยีน *UGT1A1* จะมีการทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ลดลง

นอกจากนี้ยังมีการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* บริเวณ 211G>A ของ exon1 โดยทำให้กรดอะมิโนไกลซีนเปลี่ยนเป็นอาร์จินีน ที่ตำแหน่ง 71[7] ซึ่งส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ทำงานได้ลดลงและกระตุ้นการก่อให้เกิดการสะสมของบิลิรูบินในเลือดมากขึ้น [8] การศึกษาหาความถี่ของอัลลีล 211G>A พบว่าในประชากรญี่ปุ่นมีความถี่ของอัลลีลเท่ากับ 0.16 ในประชากรมาเลเซียเท่ากับ 0.03 [9, 10] และไม่เคยพบการกลายพันธุ์นี้ในประชากรแอฟริกันและไม่มีการรายงานการกลายพันธุ์ของตำแหน่งนี้ในชาว Caucasian [11] จากการศึกษานี้พบว่าในชาวไทยปกติมีความถี่ของอัลลีลเท่ากับ 0.12 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันกับชาวญี่ปุ่น ส่วนในเด็กแรกเกิดอาการตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษามีความถี่อัลลีลเท่ากับ 0.09 จากการศึกษาด้วย meta – analysis พบว่า ในเด็กแรกเกิดที่มีจีโนไทป์ AA และ GA มีความเสี่ยงในการเกิดการสะสมของบิลิรูบินในเลือดมากกว่าเด็กแรกเกิดที่มีจีโนไทป์ GG [51] ในงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้มีรายงานว่า การกลายพันธุ์ตำแหน่ง 211G>A เป็นปัจจัยในการก่อให้เกิดการสะสมของบิลิรูบินในเลือดทั้งจีโนไทป์ homozygous AA และ heterozygous GA [9] และจากการทำการศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงว่าการกลายพันธุ์ตำแหน่ง 211G>A บริเวณ exon1 ไม่ได้ก่อให้เกิดอาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิด แต่ในการศึกษานี้ในกลุ่มประชากรไทยหรือกลุ่มควบคุมได้ทำการเก็บตัวอย่างจากสภากาชาดไทยในรูปนิรนามซึ่งไม่มีข้อมูลทางคลินิกทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิกที่ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ได้

นอกจากนี้สาเหตุในการก่อให้เกิดอาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิดนั้นอาจเกิดจากการผิดปกติอื่น เช่น ความผิดปกติของเอนไซม์ glucose – 6 –phosphate dehydrogenase (G6PD), โรคธาลัสซีเมีย (Thalassemia), ภาวะเลือดข้นเกินไป (Polycythemia), ภาวะเลือดออกบริเวณหนังศีรษะ (Cephalhematoma), ABO incompatibility เป็นต้น ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าในเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษาที่ไม่ทราบสาเหตุมีจำนวน 54 ราย เด็กแรกเกิดที่มี ABO incompatibility จำนวน 6 ราย เด็กแรกเกิดที่มี cephalhematoma จำนวน 5 ราย เด็กแรกเกิดที่มี polycythemia จำนวน 1 ราย เด็กแรกเกิดที่มีความผิดปกติของเอนไซม์ G6PD จำนวน 2 ราย และเด็กแรกเกิดที่มี subgaleal hematoma จำนวน 3 ราย ซึ่งเด็กแรกเกิดที่มีความผิดปกติของเอนไซม์ G6PD และเด็กแรกเกิดที่มี subgaleal hematoma ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ทั้งในบริเวณ TA repeat และ 211G>A โดยเด็กแรกเกิดในประเทศไทยพบว่า มีความชุกของ G6PD

เท่ากับ 22.1% (N = 140) ในผู้ชาย และ 10.1% (N=89) ในผู้หญิง [52] จากการศึกษาของ Prachukthum และคณะ พบว่า ในเด็กแรกเกิดชาวไทยมีความหลากหลายของยีน *UGT1A1* ตำแหน่ง 211G>A หรือ ร่วมกับการเกิดความผิดปกติของเอนไซม์ G6PD จะทำให้เกิดความเสี่ยงมากยิ่งขึ้น ในการก่อให้เกิดอาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิด [23] ในทางกลับกันจากการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 211G>A ไม่ก่อให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดอาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิด และไม่มีความแตกต่างกันทั้งในเด็กและผู้ใหญ่

นอกจากนี้ในการพัฒนาเทคนิค real – time PCR ด้วย FRET เพื่อตรวจวัดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TA promoter พบว่าสามารถแยกจีโนมไทป์ทั้ง 3 แบบได้ แสดงถึงการจับกันอย่างจำเพาะของ probe และ primer จากการจับกันอย่างจำเพาะของ template, probe และ primer ทำให้สามารถแยกแต่ละจีโนมไทป์ได้โดยที่แต่ละจีโนมไทป์มีความแตกต่างของค่า T_m เพียง 1 – 2 องศาเซลเซียสเท่านั้น ซึ่งการพัฒนาเทคนิคนี้ทำให้สามารถแยกแต่ละจีโนมไทป์ในเวลาที่รวดเร็วขึ้นและลดขั้นตอนในการเกิดการปนเปื้อน โดยการพัฒนาเทคนิคนี้ทำให้สามารถทราบถึงการกลายพันธุ์บริเวณ TA repeat ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ *UGT1A1* ได้ง่ายขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้เป็นอย่างดี

กล่าวโดยสรุปจากผลการวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลความถี่ของอัลลีลและความถี่ของจีโนมไทป์ของยีน *UGT1A1* บริเวณ TA repeat และ 211G>A ของคนไทยปกติและเด็กแรกเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษา โดยอาศัยเทคนิค PCR และทำการยืนยันผลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งการศึกษานี้จะใช้ในการศึกษาหาสาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลืองในเด็กแรกเกิด และยังทำให้ทราบว่า การกลายพันธุ์ของ TA repeat และ 211G>A ไม่ได้ก่อให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดอาการตัวเหลืองในคนไทยปกติและในเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลือง ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคลจะส่งผลต่อการเกิดอาการตัวเหลืองที่ต่างกัน นอกจากนี้ในการพัฒนาเทคนิคในการตรวจการกลายพันธุ์ด้วย FRET ทำให้สะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้นในตรวจสอบการกลายพันธุ์ นอกจากนี้การตรวจสอบการกลายพันธุ์นี้ยังมีประโยชน์ในการวางแผนเพื่อรักษาเด็กแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองด้วย

รายการอ้างอิง

- [1] Sampietro, M., et al. The expression of uridine diphosphate glucuronosyltransferase gene is a major determinant of bilirubin level in heterozygous beta-thalassaemia and in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Br J Haematol 99 (1997) : 437-439.
- [2] Kaplan, M., Hammerman, C., Renbaum, P., Klein, G., and Levy-Lahad, E. Gilbert's syndrome and hyperbilirubinaemia in ABO-incompatible neonates. Lancet 356 (2000) : 652-653.
- [3] Bancroft, J.D., Kreamer, B., and Gourley, G.R. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. J Pediatr 132 (1998) : 656-660.
- [4] Kadakol, A., Ghosh, S.S., Sappal, B.S., Sharma, G., Chowdhury, J.R., and Chowdhury, N.R. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. Hum Mutat 16 (2000) : 297-306.
- [5] Burchell, B., and Hume, R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. J Gastroenterol Hepatol 14 (1999) : 960-966.
- [6] Beutler, E., Gelbart, T., and Demina, A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter : a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) : 8170-8174.
- [7] Bosma, P.J., et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. N Engl J Med 333 (1995) : 1171-1175.
- [8] Sugatani, J., et al. Identification of a defect in the UGT1A1 gene promoter and its association with hyperbilirubinemia. Biochem Biophys Res Commun 292 (2002) : 492-497.

- [9] Maruo, Y., Nishizawa, K., Sato, H., Doida, Y., and Shimada, M. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP-glucuronosyltransferase polymorphism. Pediatrics 103 (1999) : 1224-1227
- [10] Yusoff, S., et al. Frequencies of A(TA)₇TAA, G71R, and G493R mutations of the UGT1A1 gene in the Malaysian population. Biol Neonate 89 (2006) : 171-176.
- [11] Kaniwa, N., et al. Racial variability in haplotype frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel single nucleotide polymorphism 686C>T (P229L) found in an African-American. Drug Metab Dispos 33 (2005) : 458-465.
- [12] Sutomo, R., et al. Novel missense mutation of the UGT1A1 gene in Thai siblings with Gilbert's syndrome. Pediatr Int 44 (2002) : 427-432.
- [13] Baudhuin, L.M., Highsmith, W.E., Skierka, J., Holtegaard, L., Moore B.E., and O'Kane, D.J. Comparison of three methods for genotyping the UGT1A1 (TA)_n repeat polymorphism. Clin Biochem 40 (2007) : 710-717.
- [14] Borlak, J., Thum, T., Landt, O., Erb, K., and Hermann, R. Molecular diagnosis of a familial nonhemolytic hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome) in healthy subjects. Hepatology 32 (2000) : 792-795.
- [15] Gowen, C.W. Anemia and hyperbilirubinemia. In: Kliegman R. Nelson Essentials of Pediatrics. 5th ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders, 2006 : 313–322.
- [16] Ibrahim, N.G., Friedland, M.L., and Levere, R.D. Heme metabolism in erythroid and hepatic cells. Prog Hematol 13 (1983) : 75-130.
- [17] Enid, Gilbert-Barness., and Lewis, A. Barness., Clinical Use of Pediatric Diagnostic Tests. Lippincott Williams & Wilkins (LWW). 1th ed. Philadelphia., Pa.: 2003

- [18] Moerschel, S.K., Cianciaruso, L.B., and Tracy, L.R. A practical approach to neonatal jaundice. Am Fam Physician 77 (2008) : 1255-1262.
- [19] Viele, M., Donegan, E., and Bossom, E.L. Blood banking & Immunohematology. In: Medical Immunology. 9th ed. Connecticut. Appleton & Lange, 1997 : 275-285.
- [20] Hammerman, C., et al. Protective effect of bilirubin in ischemia-reperfusion injury in the rat intestine. J Pediatr Gastroenterol Nutr 35 (2002) : 344-349.
- [21] Kaplan, M., and Hammerman, C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency : a potential source of severe neonatal hyperbilirubinaemia and kernicterus. Semin Neonatol 7 (2002) : 121-128.
- [22] WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Bulletin of the World Health Organization 67 (1989) : 601-611.
- [23] Prachukthum, S., et al. Genetic polymorphisms in Thai neonates with hyperbilirubinemia. Acta Paediatr 98 (2009) : 1106-1110.
- [24] Denis, R. Miller., and Robert, L. Baehner. Blood diseases of infancy and childhood: in the tradition of C.H. 7th ed. USA: Mosby-Year Book Inc., 1994. : 460-474
- [25] Schwartz, E., and Surrey, S. Molecular biologic diagnosis of the hemoglobinopathies. Hosp Pract 21 (1986) : 163-178.
- [26] A-kader, H.H., et al. Nelson Textbook of Pediatrics 19 th edition. Philadelphia, Elsevier: 2011. : 1385-1387.
- [27] Seppen, J., et al. Discrimination between Crigler-Najjar type I and II by expression of mutant bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase. J Clin Invest 94 (1994) : 2385-2391.

- [28] Petit, F., et al. Crigler-Najjar type II syndrome may result from several types and combinations of mutations in the UGT1A1 gene. *Clin Genet* 69 (2006) : 525-527.
- [29] Yamamoto, K., et al. Analysis of bilirubin uridine 5'-diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferase gene mutations in seven patients with Crigler-Najjar syndrome type II. *J Hum Genet* 43 (1998) : 111-114.
- [30] Bosma, P.J., et al. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 269 (1994) : 17960-17964.
- [31] Watchko, J.F., Daood, M.J., and Biniwale, M. Understanding neonatal hyperbilirubinaemia in the era of genomics. *Semin Neonatol* 7 (2002) : 143-152.
- [32] Minucci, A., Concolino, P., Giardina, B., Zuppi, C., and Capoluongo, E. Rapid UGT1A1 (TA)_n genotyping by high resolution melting curve analysis for Gilbert's syndrome diagnosis. *Clin Chim Acta* 411 (2010) : 246-249.
- [33] Maruo, Y., et al. Two linked polymorphic mutations (A(TA)₇TAA and T-3279G) of UGT1A1 as the principal cause of Gilbert syndrome. *Hum Genet* 115 (2004) : 525-526.
- [34] Matsui, K., Maruo, Y., Sato, H., and Takeuchi, Y. Combined effect of regulatory polymorphisms on transcription of UGT1A1 as a cause of Gilbert syndrome. *BMC Gastroenterol* 10 (2010) : 57.
- [35] หอผู้ป่วยพิเศษกุมารเวชกรรมและงานสุขศึกษา ศูนย์การแพทย์ปัญญานันทภิกขุชลประทาน มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. เอกสารเผยแพร่ความรู้ด้านสุขภาพ เรื่อง "ตัวเหลืองในทารกแรกเกิด". กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. (อัครสำเนา)
- [36] นิสารัตน์ โอภาสเกียรติกุล, วัฒนา เลี้ยววัฒนา, ดาราวรรณ วณิชานาวิน, มงคล คุณากร และ วนิตา วงศ์ธีรพร. *พยาธิวิทยาคลินิก พิมพ์ครั้งที่ 1*. กรุงเทพมหานคร: สมาคมพยาธิวิทยาคลินิกไทย (สพท.), 2545 : 124-126.

- [37] Xiong, T., Qu, Y., Cambier, S., and Mu, D. The side effects of phototherapy for neonatal jaundice: what do we know? What should we do? Eur J Pediatr 170 (2011) : 1247-1255.
- [38] Maisels, M.J., and McDonagh, A.F. Phototherapy for neonatal jaundice. N Engl J Med 358 (2008) : 920-928.
- [39] Hansen, T.W., and Tommarello, S. Effect of phenobarbital on bilirubin metabolism in rat brain. Biol Neonate 73 (1998) : 106-111.
- [40] Sinniah, D., Tay, L.K., Dugdale A.E. Phenobarbitone in neonatal jaundice. Arch Dis Child 46 (1971) : 712-715.
- [41] Denis, R. Miller., and Robert, L. Baehner. Blood diseases of infancy and childhood: in the tradition of C.H. 7th ed. USA: Mosby-Year Book Inc., 1994 : 85-86
- [42] Ambalavanan, N., and Carlo, W.A. Jaundice and hyperbilirubinemia in the newborn. In: Kliegman RM, Stanton BF, St. Geme JW, Schor NF, Behrman RE, eds. Nelson Textbook of Pediatrics 19th ed. Philadelphia: Elsevier, 2011 : 603-607.
- [43] ผกาพรหม เกียรติชูสกุล. ภาวะตัวเหลืองในเด็กแรกเกิด. ขอนแก่น: แอนนาออฟเซตการพิมพ์ , 2552 : 75-90.
- [44] Muslu, N., et al. The frequency of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter region (TA)₇ polymorphism in newborns and its relation with jaundice. J Trop Pediatr 53 (2007) : 64-68.
- [45] Zhou, Y.Y., et al. UGT1A1 haplotype mutation among Asians in Singapore. Neonatology 96 (2009) : 150-155.
- [46] อมรินทร์ ปรีชาวุฒิ. เรื่องเครื่อง Thermal cycler กับ เทคนิค PCR. [ออนไลน์]. 2554. แหล่งที่มา: <http://www.eqacenter.com/2010/11/blog-post.html>: ทัมเพลด Picture Window [15 เมษายน 2555]

- [47] Simon, A., et al. Use of fluorescence resonance energy transfer hybridization probes to evaluate quantitative real-time PCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis. J Clin Microbiol 42 (2004) : 3681-3685.
- [48] Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A., and Balis U.J. The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 22 (1997) : 176–181.
- [49] Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., and Wittwer, C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem 245 (1997) : 154-160.
- [50] อโณทัย โภคาธิกรณ์. Introduction to Real time-PCR and its applications. ใน เอกสารประกอบประชุมเชิงปฏิบัติการ, หน้า 1-6. 16 – 17 พฤศจิกายน ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549.
- [51] Long, J., Zhang, S., Fang, X., Luo, Y., and Liu, . Neonatal hyperbilirubinemia and Gly71Arg mutation of UGT1A1 gene: a Chinese case-control study followed by systematic review of existing evidence. Acta Paediatr 100 (2011) : 966-971.
- [52] Nuchprayoon, I., Sanpavat, S., and Nuchprayoon, S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD) mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) is the most common deficiency variant in the Thai population. Hum Mutat 19 (2002) : 185.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง

1. Red Cell Lysis Buffer (RCLB)

1 M Tris – HCl	10	มิลลิลิตร
5 M NaCl	2	มิลลิลิตร
1 M MgCl ₂	5	มิลลิลิตร

เติม distilled water จนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. Phosphate Buffer Saline (PBS)

PBS	9.88	กรัม
-----	------	------

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไป autoclave แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1. Lysis buffer

Tris – HCl	0.105	กรัม
EDTA	0.1245	กรัม
SDS	0.335	กรัม

จากนั้นเติม distilled water จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 °C

2. 20 mg/ml proteinase K

Proteinase K	2	มิลลิลิตร
--------------	---	-----------

จากนั้นเติม distilled water 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. 2M Sodium Acetate (2M NaOAc)

Sodium acetate	4.92	กรัม
----------------	------	------

เติมน้ำกลั่น 30 ml

4. Chloroform(CHCl₃) : Isoamyl Alcohol(IAA), 49:1

Isoamyl Alcohol	1	มิลลิลิตร
-----------------	---	-----------

เติม Chloroform ให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 ml

5. 70% Ethanol

Absolute Ethanol	70	มิลลิลิตร
------------------	----	-----------

เติมน้ำให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์

1. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	4	กรัม
1 x TBE	200	มิลลิลิตร

เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

2. 5xTris borate buffer (5 x TBE)

Tris-base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

4. Loading dye

0.25% Bromphenol blue
40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 °C

การเตรียมสารเคมีในการทำ cloning

1. LB agar 100 ml

agar	1.5	กรัม
yeast extract	0.5	กรัม
peptone	1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 ml แล้วนำไปผ่านการ autoclave จากนั้นรอให้อุณหภูมิตกลง เติม ampicilin 100 µg/ml แล้วเตรียมเทปริมาณ 35 mL ใส่ plate

2. LB broth 50 ml

yeast extract	0.25	กรัม
peptone	0.5	กรัม
NaCl	0.25	กรัม

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 ml แล้วนำไปผ่านการ autoclave

3. SOC medium 100 ml

yeast extract	0.5	กรัม
peptone	2	กรัม
NaCl	1	มิลลิลิตร
KCl	0.25	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 ml จากนั้นเติมกลูโคส 100 µl และ Mg²⁺ 100 µl

ภาคผนวก ข

ข้อมูลของเด็กแรกเกิดเกิดตัวเหลืองที่ได้รับการส่องไฟรักษา

ลำดับ	เพศ	ส่วนสูง (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	อายุครรภ์ (สัปดาห์)	อายุ (วัน)	สาเหตุอาการตัวเหลือง	บิลิรูบิน สูงสุด	TATA box	G71R
J11	หญิง	48.5	3105	37	2	Unspecified	16.5	TA6/6	G/G
J12	หญิง	50	3560	40	3	Unspecified	11.3	TA6/6	G/G
J13	หญิง	49.5	3260	36	1	ABO incompatibility	15.1	TA6/6	G/G
J14	ชาย	51	2775	35	2	Unspecified	10.5	TA6/6	G/G
J15	หญิง	52	3680	41	1	ABO incompatibility	11.2	TA6/6	G/G
J16	หญิง	52	3605	38	1	Unspecified	11.4	TA6/7	G/G
J17	ชาย	48	2640	35	3	Unspecified	16.3	TA6/7	G/G
J18	หญิง	54	3600	40	5	Unspecified	15.9	TA6/6	G/A
J19	หญิง	49.5	2865	43	3	ABO incompatibility	11.5	TA6/7	G/G
J20	ชาย	51.5	3495	40	3	Unspecified	13.4	TA6/6	G/G
J21	ชาย	47.5	2940	38	3	Unspecified	13.2	TA6/7	G/G
J22	หญิง	48	2955	39	4	Unspecified	11.9	TA6/6	G/G
J23	ชาย	51	3020	38	1	Subgaleal hematoma	15.8	TA6/6	G/G
J24	หญิง	51	3200	38	1	Unspecified	13.2	TA6/6	G/G
J25	ชาย	51	2750	40	3	skin ecchymosis	10.3	TA6/6	G/G
J26	ชาย	48.5	2790	35	5	Unspecified	14.7	TA6/7	G/G
J27	ชาย	46.5	3175	38	1	Unspecified	14.3	TA6/6	G/A
J28	ชาย	50	3245	39	3	Unspecified	12.2	TA6/6	G/G
J29	ชาย	50	3435	39	4	Unspecified	15.3	TA6/6	G/G
J30	หญิง	47	3040	37	4	Unspecified	14.7	TA6/7	G/G
J31	หญิง	49	3310	39	2	Unspecified	13.5	TA6/7	G/G
J32	หญิง	47.5	2320	40	1	Unspecified	12.2	TA6/6	G/G
J33	ชาย	50	2830	39	2	Unspecified	14.1	TA6/6	G/G
J34	ชาย	48.5	3010	38	4	Cephalohematoma	13.2	TA7/7	G/G

ลำดับ	เพศ	ส่วนสูง (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	อายุครรภ์ (สัปดาห์)	อายุ (วัน)	สาเหตุอาการตัวเหลือง	บิลิรูบิน สูงสุด	TATA box	G71R
J35	ชาย	50.5	3295	38	1	Unspecified	11.3	TA6/7	G/G
J36	ชาย	49.5	2665	36	3	Unspecified	14.1	TA6/6	G/G
J37	ชาย	50	2995	37	4	Cephalohematoma	12.7	TA6/6	G/G
J38	หญิง	50	3140	39	4	Unspecified	14	TA6/6	G/A
J39	หญิง	54	3935	39	1	Unspecified	13.5	TA6/6	G/G
J40	หญิง	48	2680	38	3	Subgaleal hematoma	15.6	TA6/7	G/A
J41	หญิง	48.1	2905	40	2	Unspecified	12	TA6/6	G/G
J42	ชาย	39	3215	39	3	Polycythemia	14.5	TA6/7	G/G
J43	ชาย	50.5	3320	39	2	Unspecified	15.6	TA6/6	G/A
J44	ชาย	47.7	2360	37	1	Unspecified	13.6	TA6/6	G/G
J45	ชาย	44.6	2260	36	4	Unspecified	14.9	TA6/6	G/G
J46	หญิง	52.5	3370	40	3	Cephalohematoma	15.2	TA6/6	G/G
J47	หญิง	47	2765	39	1	Unspecified	13.3	TA6/6	G/G
J48	ชาย	49	3170	38	1	Unspecified	13.5	TA6/6	G/G
J49	ชาย	47	2775	36	3	Unspecified	14.7	TA6/6	G/G
J50	ชาย	49	3300	38	4	G-6-PD	16.8	TA6/6	G/G
J51	ชาย	49	3040	39	3	Unspecified	14.2	TA6/6	G/A
J52	ชาย	50	3400	38	1	Unspecified	16.2	TA6/6	G/G
J53	ชาย	52.5	4310	38	1	Subgaleal hematoma	15.2	TA6/6	G/G
J54	ชาย	51	3485	39	1	Unspecified	15.2	TA6/7	G/G
J55	หญิง	52.5	3350	41	1	Unspecified	13.5	TA6/7	G/G
J56	ชาย	52	3755	40	3	ABO incompatibility	14.7	TA6/6	G/G
J57	ชาย	52.5	3330	40	1	Unspecified	13	TA6/6	G/G
J58	หญิง	52	4165	38	1	Unspecified	15.4	TA6/6	G/G
J59	หญิง	48	3000	40	2	Unspecified	16.2	TA7/7	G/G
J60	หญิง	49	3130	40	3	Unspecified	13.1	TA6/7	G/G
J61	ชาย	49	3010	37	5	Unspecified	10.5	TA6/6	G/G
J62	ชาย	50.5	3615	38	3	Unspecified	10.5	TA6/6	G/G

ลำดับ	เพศ	ส่วนสูง (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)	อายุครรภ์ (สัปดาห์)	อายุ (วัน)	สาเหตุอาการตัวเหลือง	บิลิรูบิน สูงสุด	TATA box	G71R
J63	ชาย	51	3220	39	3	G-6-PD	14.9	TA6/6	G/G
J64	ชาย	47.5	2640	34	3	Unspecified	11.3	TA6/6	G/G
J65	ชาย	49	3320	39	4	Unspecified	12.8	TA6/6	G/G
J66	ชาย	48.5	3140	39	4	Unspecified	13	TA6/6	G/A
J67	หญิง	49	2975	38	3	Unspecified	11.3	TA6/7	G/G
J68	หญิง	51	3890	39	1	Unspecified	11.3	TA6/6	G/G
J69	หญิง	47.5	2800	36	1	Cephalohematoma	11.3	TA6/6	G/G
J70	หญิง	49	3075	38	1	ABO incompatibility	14.2	TA6/6	G/A
J71	ชาย	48	2860	38	1	Unspecified	13.8	TA6/7	G/A
J72	ชาย	48.5	3000	37	2	Unspecified	15.9	TA6/6	A/A
J73	ชาย	47	2520	38	4	Unspecified	12	TA6/6	G/G
J74	ชาย	47.5	2660	37	3	Unspecified	9.7	TA6/6	G/G
J75	ชาย	51	3150	40	3	Cephalohematoma	11.2	TA6/7	G/G
J76	ชาย	50	3115	39	1	Unspecified	12.5	TA6/6	G/G
J77	ชาย	50	3530	41	2	Unspecified	13.3	TA6/7	G/A
J78	หญิง	50	3280	38	4	Unspecified	12.4	TA6/6	G/G
J79	ชาย	51	3510	40	2	ABO incompatibility	15	TA6/6	G/G
J80	ชาย	49	2985	38	4	Unspecified	12.1	TA6/6	G/A
J81	หญิง	54	3170	38	2	Unspecified	12.5	TA6/6	G/G

ภาคผนวก ค

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

1. คาดว่าจะได้ตีพิมพ์ในวารสาร BMC Research Notes หัวข้อเรื่อง Frequency of Promoter TA Repeat and 211G>A of *UGT1A1* Gene among Thai Infants with Neonatal Jaundice

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล ภรจริม นิลยนิมิต เพศ หญิง

อายุ 24 ปี เกิด 12 พฤศจิกายน 2530

สถานที่เกิด โรงพยาบาล สมเด็จพระศรีราชา จังหวัดชลบุรี

ที่อยู่ 51 ถนนประเสริฐนุกิจ ตำบลจรเข้บัว อำเภอลาดพร้าว จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10230

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีวเคมี)

จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2552

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2553

การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

เสนอผลงานหัวข้อเรื่อง : Frequency of Promoter TA Repeat and 211G>A of *UGT1A1* Gene

among Thai Infants with Neonatal Jaundice

เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร BMC Research Notes