

ภาวะพหุสัญญาณของยีน VDR และยีน TNFSF11 ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนชาวไทย



นางสาวมณีนญา เตชะปฎิภาณดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 University Graduate School.

POLYMORPHISMS OF *VDR* GENE AND *TNFSF11* GENE IN THAI OSTEOPOROSIS
PATIENTS

Miss Mananya Techapatiphandee

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะพหุสัญญาณของยีน VDR และยีน TNFSF11 ใน
	ผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนชาวไทย
โดย	นางสาวมณีนฎา เตชะปฎิภาณดี
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แอนนา วงษ์กุหลาบ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แอนนา วงษ์กุหลาบ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ. ดร. นครินทร์ กิตกำธร)

มณีนฎา เตชะปฎิภาณติ : ภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และยีน *TNFSF11* ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนชาวไทย. (POLYMORPHISMS OF *VDR* GENE AND *TNFSF11* GENE IN THAI OSTEOPOROSIS PATIENTS) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนียัจิต, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. แอนนา วงษ์กุลลาบ, 116 หน้า.

โรคกระดูกพรุนเป็นโรคที่มีความสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้นและพบบ่อยในหญิงสูงอายุที่หมดประจำเดือน จากการศึกษาพบว่าความเสี่ยงของการเกิดกระดูกหักจากโรคกระดูกพรุนมีสาเหตุมาจากมวลกระดูกที่ลดลง ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดโรคนี้นี้ได้แก่ ฮอรโมน สิ่งแวดล้อม และพันธุกรรม โดยที่ปัจจัยทางด้านพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อกระดูกจนทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนหรือกระดูกเปราะบางได้ในเวลาต่อมา ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ของโรคกระดูกพรุนกับยีน 2 ยีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ Vitamin D Receptor (*VDR*) gene และ Tumor necrosis factor superfamily member 11 (*TNFSF11*) gene ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน *TaqI* (rs731236) *FokI* (rs2228570) และ *BsmI* (rs1544410) ในยีน *VDR* และที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155) ในยีน *TNFSF11* โดยใช้กลุ่มตัวอย่างประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรคกระดูกพรุนจำนวน 105 คน และกลุ่มตัวอย่างประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนที่ไม่ได้เป็นโรคกระดูกพรุนจำนวน 132 คน โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด ศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีนทั้งสองด้วยวิธี PCR-RFLP และยีนย่นลำดับเบสอีกครั้ง และศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และ *TNFSF11* กับความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนของประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนด้วยวิธีทางสถิติ จากการวิเคราะห์พบว่าในกลุ่มของสปีปตำแหน่ง rs2228570 ของยีน *VDR* พบแอลลีล T ซึ่งมีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ($P = 0.0119$) โดยผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ที่เป็น TT จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 2.30 เท่า สำหรับรูปแบบแฮพลอไทป์ของยีน *VDR* (*TaqI BsmI* และ *FokI*) ที่สัมพันธ์ต่อการเกิดโรคมกที่สุดคือ CAA ($P=0.0204$) ในขณะที่สปีปอื่น ๆ ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อใช้คัดคณและประเมินโอกาสการเป็นโรคกระดูกพรุนต่อไปในอนาคตได้

ภาควิชา พฤษศาสตร์

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5372303723 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS: OSTEOPOROSIS / POSTMENOPAUSE / VITAMIN D RECEPTOR / TUMOR
NECROSIS FACTOR SUPERFAMILY MEMBER 11

MANANYA TECHAPATIPHANDEE: POLYMORPHISMS OF *VDR* GENE AND
TNFSF11 GENE IN THAI OSTEOPOROSIS PATIENTS. ADVISOR: ASST. PROF.
PATTAMAWADEE YANATASANEJIT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. ANNA
WONGKULARB, Ph.D., 116 pp.

Osteoporosis was associated with age and common disease affecting the old and especially menopause women. From several studies broken bones caused by osteoporosis can be resulted in the decreasing of bone strength. A range of hormone, environment and genetic factors can increase the risk of osteoporosis. Genetics is one of the most important factors in osteoporosis. The purpose of this study is to observe the association between single nucleotide polymorphism (SNPs) of Vitamin D Receptor (*VDR*) gene and Tumor necrosis factor superfamily member 11 (*TNFSF11*) gene and osteoporosis. Polymorphisms were studied at *TaqI* (rs731236), *FokI* (rs2228570) and *BsmI* (rs1544410) positions in *VDR* gene and at -290C>T (rs9525641), -643C>T (rs9533156) and -693G>C (rs9533155) positions in *TNFSF11* gene. Samples were drawn from 105 menopause patients with osteoporosis and 132 women with no osteoporosis. DNA was extracted from peripheral blood samples and then polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) were performed. To confirm PCR-RFLP, the PCR products were sent for sequencing. The association between SNPs of both genes and osteoporosis was statistically analyzed. The statistical analysis was shown that position rs2228570 of *VDR* gene with base T was the recessive allele. (P = 0.0119) and genotype TT was associated with osteoporosis of 2.30 folds. CAA haplotype (*TaqI BsmI* and *FokI*) was associated with osteoporosis (P = 0.0204). In other SNPs were no significant correlation with osteoporosis. These studies would be useful for the development of genetic markers as a new tool to predict and evaluate the probability of each one in getting osteoporosis in the future.

Department: Botany

Student's Signature

Field of Study: Genetics

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทูน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 20 (รหัสสนิสิตทูน 9020561125) สำหรับการสนับสนุนทุนในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำข้อมูลในการทำงานวิจัยและเขียนรายงานการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วิวัฒน์ วจนะศิษฐ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง มยุรี จิรภิญโญ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แอนนา วงษ์กุหลาบ จากคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดสำหรับงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ญัฐพล ธรรมโชติ จาก คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดสำหรับงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิตรางกูร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันทแพทย์. ดร. นครินทร์ กิตกำธร ที่ได้ให้ข้อเสนอแนะและข้อคิดเห็นรวมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณประกาศิต รัตนตันหยง และ โชติพร ชเลิศเพ็ชร ที่ให้คำปรึกษาเรื่องการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่และคุณแม่บุญธรรมที่คอยให้กำลังใจ เอาใจใส่และห่วงใยสุขภาพตลอดเวลา ตลอดจนให้กำลังใจและกำลังใจทรัพย์เรื่อยมา จนจบการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
วิธีดำเนินการวิจัย	4
ลำดับขั้นตอนในการวิจัย	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
องค์ประกอบของกระดูก	6
เซลล์กระดูก	7
การพัฒนาเซลล์สร้างกระดูก(osteoblast)และกระบวนการสร้างกระดูก	8
กระบวนการพัฒนาเซลล์สร้างกระดูก	8
กระบวนการสร้างกระดูก	9
การพัฒนาเซลล์ osteoclast และกระบวนการสลายกระดูก.....	10
กระบวนการพัฒนาเซลล์สลายกระดูก	10
กระบวนการสลายกระดูก	12
กระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling).....	13
วัฏจักรของกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling cycle)	14
การควบคุมกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling regulation).....	16
โรคกระดูกพรุนในหญิงวัยหมดประจำเดือน	17
ยี่นที่สนใจในการศึกษาในครั้งนี้.....	19

ยีน Vitamin D receptor (<i>VDR</i>).....	19
ยีน Tumor necrosis factor superfamily member 11 (<i>TNFSF11</i>)	20
ภาวะพหุสัณฐานของยีน (polymorphisms).....	21
แฮพลอไทป์ (SNP haplotype หรือ Haplotype block)	22
การใช้ประโยชน์จาก SNP	22
เทคนิคที่จะช่วยในการวิเคราะห์ ภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> และ ยีน <i>TNFSF11</i>	23
บทที่ 3 วิธีการศึกษา.....	24
1. กลุ่มตัวอย่าง.....	24
2. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	25
3. วิธีการทดลอง.....	27
3.1 คำนวณค่าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	27
3.2 เขียนขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์	28
3.3 การศึกษาภาวะพหุสัณฐานโดยวิธี PCR-RFLP.....	28
3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดโดยวิธี phenol/chloroform extraction ...	28
3.4 การศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> และ <i>TNFSF11</i>	29
3.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	29
3.4.2 การใช้ restriction enzyme ในการตรวจหา SNPs	31
3.5 ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาวิเคราะห์	34
3.5.1 PCR Product ของยีน <i>VDR</i> ที่ตำแหน่ง SNP <i>TaqI</i> (rs731236) ..	35
3.5.2 PCR Product ของยีน <i>VDR</i> ที่ตำแหน่ง SNP <i>FokI</i> (rs2228570). 35	
3.5.3 PCR Product ของยีน <i>VDR</i> ที่ตำแหน่ง SNP <i>BsmI</i> (rs1544410) 35	
3.5.4 PCR Product ของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ตำแหน่งบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -290C>T (rs9525641).....	36
3.5.5 PCR Product ของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ตำแหน่งบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -643C>T (rs9533156).....	36
3.5.6 PCR Product ของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ตำแหน่งบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -693G>C (rs9533155).....	36
3.6 สุ่มเลือกตัวอย่างเพื่อยืนยันลำดับเบส (Direct sequencing).....	36

4.	การวิเคราะห์ข้อมูล	37
4.1	การวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)	37
4.1.1	การวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) โดยใช้โปรแกรมจาก Web site.....	37
4.1.2	การวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) โดยใช้ Chi-square....	37
4.2	Single SNP-Disease association analysis.....	39
4.3	Haplotype analysis	40
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....		41
1.	ผลการศึกษาในกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา.....	41
2.	ผลจากการศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีนจากการตรวจหา SNPs โดยวิธี PCR-RFLP	41
2.1	ตำแหน่ง SNP <i>TaqI</i> (rs731236)	41
2.2	ตำแหน่ง SNP <i>FokI</i> (rs2228570).....	42
2.3	ตำแหน่ง SNP <i>BsmI</i> (rs1544410).....	43
2.4	ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641).....	44
2.5	ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156).....	45
2.6	ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155).....	46
3.	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยการ sequencing.....	47
3.1	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> ที่ SNP <i>TaqI</i> (rs731236)(จีโนไทป์ TT) 47	
3.2	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> ที่ SNP <i>TaqI</i> (rs731236)(จีโนไทป์ TC) 47	
3.3	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> ที่ SNP <i>TaqI</i> (rs731236)(จีโนไทป์ CC) 48	
3.4	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> ที่ SNP <i>FokI</i> (rs2228570)(จีโนไทป์ CC) 48	
3.5	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> ที่ SNP <i>FokI</i> (rs2228570)(จีโนไทป์ CT)49	
3.6	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> ที่ SNP <i>FokI</i> (rs2228570)(จีโนไทป์ TT)49	
3.7	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> ที่ SNP <i>BsmI</i> (rs1544410)(จีโนไทป์ GG)50	
3.8	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> ที่ SNP <i>BsmI</i> (rs1544410)(จีโนไทป์ GA) 50	
3.9	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>VDR</i> ที่ SNP <i>BsmI</i> (rs1544410)(จีโนไทป์ AA) 51	
3.10	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ SNP -290C>T (rs9525641) (จีโนไทป์ TT).....	51

3.11	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ SNP -290C>T (rs9525641) (จีโนไทป์ TC).....	52
3.12	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ SNP -290C>T (rs9525641) (จีโนไทป์ CC)	52
3.13	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ SNP -643C>T (rs9533156) (จีโนไทป์ TT).....	53
3.14	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ SNP -643C>T (rs9533156) (จีโนไทป์ TC).....	53
3.15	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ SNP -643C>T (rs9533156) (จีโนไทป์ CC)	54
3.16	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ SNP -693G>C (rs9533155) (จีโนไทป์ CC).....	54
3.17	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ SNP -693G>C (rs9533155) (จีโนไทป์ CG).....	55
3.18	ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ SNP -693G>C (rs9533155) (จีโนไทป์ GG).....	55
4.	ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยค่าทางสถิติ.....	56
4.1	Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)	56
4.2	การศึกษาความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน.....	56
4.2.1	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับความถี่แอลลีลของแต่ละ SNPs ในยีน <i>VDR</i>	57
4.2.2	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ของยีน <i>VDR</i> .	59
4.2.3	การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน <i>VDR</i> ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน (Mode of inheritance).....	61
4.2.4	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับความถี่แอลลีลของแต่ละ SNPs ในยีน <i>TNFSF11</i>	67
4.2.5	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ของยีน <i>TNFSF11</i>	69

4.2.6 การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน <i>TNFSF11</i> ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน (Mode of inheritance).....	71
4.2.7 การศึกษารูปแบบของแฮพลอไทป์ในแต่ละ SNPs ของยีน <i>VDR</i> และ <i>TNFSF11</i> ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุน	77
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	79
อภิปรายผลการทดลอง	79
สรุปผลการวิจัย	82
ข้อเสนอแนะ	82
รายการอ้างอิง.....	84
ภาคผนวก.....	92
ภาคผนวก ก.....	93
ภาคผนวก ข.....	95
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	116

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	Primer ที่ออกแบบได้ในแต่ละตำแหน่งภาวะพหุสัญญาณ.....	27
ตารางที่ 2	ตารางความเข้มข้นของสารประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละ SNPs.....	30
ตารางที่ 3	สถานะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละ SNPs	30
ตารางที่ 4	สารประกอบของเอนไซม์ตัดจำเพาะและอุณหภูมิในการป่ม	31
ตารางที่ 5	แสดงค่า Hardy-Weinberg equilibrium ใน SNPs ตำแหน่งต่างๆ.....	56
ตารางที่ 6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับภาวะพหุสัญญาณของยีน <i>VDR</i> ที่ตำแหน่ง SNPs <i>TaqI</i> (rs731236) <i>BsmI</i> (rs1544410) และ <i>FokI</i> (rs2228570).....	58
ตารางที่ 7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ของยีน <i>VDR</i>	60
ตารางที่ 8	ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน <i>VDR</i> ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP <i>TaqI</i> (rs731236) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค	61
ตารางที่ 9	ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน <i>VDR</i> ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP <i>TaqI</i> (rs731236) เมื่อแอลลีล T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค	62
ตารางที่ 10	ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน <i>VDR</i> ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP <i>BsmI</i> (rs1544410) เมื่อแอลลีล A มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค.....	63
ตารางที่ 11	ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน <i>VDR</i> ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP <i>BsmI</i> (rs1544410) เมื่อแอลลีล G มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค.....	64
ตารางที่ 12	ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน <i>VDR</i> ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP <i>FokI</i> (rs2228570) เมื่อแอลลีล T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค.....	65
ตารางที่ 13	ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน <i>VDR</i> ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP <i>FokI</i> (rs2228570) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค	66

ตารางที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับภาวะพหุ
 สัญญาณของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง SNPs -693G>C (rs9533155) -643C>T
 (rs9533156) และ -290C>T (rs9525641)..... 68

ตารางที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับรูปแบบการ
 ถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ของยีน *TNFSF11*..... 70

ตารางที่ 16 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ
 SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C
 (rs9533155) เมื่อแอลลีล G มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค 71

ตารางที่ 17 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ
 SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C
 (rs9533155) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค 72

ตารางที่ 18 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ
 SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T
 (rs9533156) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค 73

ตารางที่ 19 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ
 SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T
 (rs9533156) เมื่อแอลลีล T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค..... 74

ตารางที่ 20 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ
 SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T
 (rs9525641) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค 75

ตารางที่ 21 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ
 SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T
 (rs9525641) เมื่อแอลลีล T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค 76

ตารางที่ 22 ตารางแสดงการวิเคราะห์รูปแบบของแฮพลอไทป์ของ SNPs *TaqI* (rs731236) *BsmI*
 (rs1544410) และ *FokI* (rs2228570) ตามลำดับ (*VDR* gene)..... 77

ตารางที่ 23 ตารางแสดงการวิเคราะห์รูปแบบของแฮพลอไทป์ของ SNPs -693G>C (rs9533155) -
 643C>T (rs9533156) และ-290C>T (rs9525641) ตามลำดับ (*TNFSF11* gene)
 78

ตารางที่ 24 รูปแบบการแจกแจงความถี่..... 113

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	กระบวนการพัฒนาของเซลล์ osteoclast.....	11
รูปที่ 2	กระบวนการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูกจากเซลล์ต้นกำเนิด	12
รูปที่ 3	องค์ประกอบของเซลล์สลายกระดูก.....	13
รูปที่ 4	วัฏจักรของกระบวนการปรับแต่งกระดูก.....	16
รูปที่ 5	ภาพจำลองโครโมโซมของยีน <i>VDR</i> ที่ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 12q13.11.....	20
รูปที่ 6	ภาพจำลองโครโมโซมของยีน <i>TNFSF11</i> ที่ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 13q14.11.....	21
รูปที่ 7	ความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการทำงานของยีน <i>VDR</i> และ ยีน <i>TNFSF11</i>	21
รูปที่ 8	ผลการคำนวณ Hardy-Weinberg equilibrium โดยใช้ Chi-square	38
รูปที่ 9	ตาราง contingency tables โดยใช้โปรแกรม Statcalc.....	39
รูปที่ 10	แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP <i>TaqI</i> (rs731236).....	41
รูปที่ 11	แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP <i>FokI</i> (rs2228570).....	42
รูปที่ 12	แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP <i>BsmI</i> (rs1544410).....	43
รูปที่ 13	แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641).....	44
รูปที่ 14	แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP -643C>T(rs9533156)..	45
รูปที่ 15	แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP -693G>C(rs9533155).....	46
รูปที่ 16	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่งSNP <i>TaqI</i> (rs731236).....	47
รูปที่ 17	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TC ที่ตำแหน่งSNP <i>TaqI</i> (rs731236).....	47
รูปที่ 18	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ CC ที่ตำแหน่งSNP <i>TaqI</i> (rs731236).....	48
รูปที่ 19	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ CC ที่ตำแหน่งSNP <i>FokI</i> (rs2228570).....	48
รูปที่ 20	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ CT ที่ตำแหน่งSNP <i>FokI</i> (rs2228570).....	49
รูปที่ 21	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่งSNP <i>FokI</i> (rs2228570).....	49
รูปที่ 22	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่งSNP <i>BsmI</i> (rs1544410).....	50

รูปที่ 23	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ GA ที่ตำแหน่ง SNP <i>BsmI</i> (rs1544410)	50
รูปที่ 24	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ AA ที่ตำแหน่ง SNP <i>BsmI</i> (rs1544410)	51
รูปที่ 25	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ TT ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641).....	51
รูปที่ 26	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ TC ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641).....	52
รูปที่ 27	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ CC ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641).....	52
รูปที่ 28	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ TT ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156).....	53
รูปที่ 29	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ TT ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156).....	53
รูปที่ 30	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ CC ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156).....	54
รูปที่ 31	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ CC ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155)	54
รูปที่ 32	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ CG ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155)	55
รูปที่ 33	ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนมไทป์ GG ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155)	55
รูปที่ 34	เอกสารอนุมัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลรามธิบดีมหาวิทยาลัยมหิดล.....	93
รูปที่ 35	เอกสารอนุมัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ	94
รูปที่ 36	QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN ®)	98
รูปที่ 37	QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN ®).....	99
รูปที่ 38	25bp DNA Step Ladder (Promega Corporation)	104
รูปที่ 39	GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).....	105
รูปที่ 40	ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงบน Excel.....	106

รูปที่ 41	ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงบน Notepad (2.ped).....	107
รูปที่ 42	ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงบน Excel.....	107
รูปที่ 43	ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงบน Notepad (map.map)	108
รูปที่ 44	คำสั่งเพื่อศึกษา Allelic association test บน Plink1.07	108
รูปที่ 45	ข้อมูล Allelic association test.....	109
รูปที่ 46	คำสั่งเพื่อศึกษา Model of inheritance analysis บน Plink1.07	110
รูปที่ 47	ข้อมูล Model of inheritance analysis.....	110
รูปที่ 48	คำสั่งเพื่อศึกษา Conditional analysis of SNP บน Plink1.07	111
รูปที่ 49	ข้อมูล Conditional analysis of SNP	111
รูปที่ 50	คำสั่งเพื่อศึกษา Haplotype analysis บน Plink1.07	112
รูปที่ 51	ข้อมูล Haplotype analysis.....	112
รูปที่ 52	ตาราง contingency tables โดยใช้โปรแกรม Statcalc.....	114
รูปที่ 53	ตัวอย่างค่า OR โดยใช้โปรแกรม Statcalc	114

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคกระดูกพรุนเป็นโรคที่มีความสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้นและพบบ่อยที่สุดในผู้สูงอายุ กระดูกหักจากโรคกระดูกพรุนเกิดจากผลรวมของความแข็งแรงกระดูกลดลงอีกทั้งยังมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างต่างๆของกระดูกซึ่งจะส่งผลทำให้กระดูกไม่สามารถที่จะรับน้ำหนักหรือแรงกดทับจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ได้รับบาดเจ็บจากการหักของกระดูกได้ ซึ่งจำนวนผู้สูงอายุทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วส่งผลกระทบให้มีผู้ป่วยกระดูกพรุนและกระดูกหักเพิ่มขึ้น จากการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ของการเกิดกระดูกหักจากโรคกระดูกพรุนตลอดอายุขัยเป็นปัญหาที่พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชายโดยพบประมาณร้อยละ 30-50 ในผู้หญิง และร้อยละ 15-30 ในผู้ชาย (Randell *et al.*, 1995) เนื่องมาจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนในหญิงวัยหมดประจำเดือน ภาวะหมดประจำเดือนนี้เองอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้ ดังนั้นการศึกษาถึงสาเหตุของการเกิดโรคกระดูกพรุนจึงมีความสำคัญเพื่อให้เข้าใจและหาแนวทางป้องกันผลกระทบจากปัญหาและคุณภาพชีวิตที่ดีของผู้หญิงไทยวัยหมดประจำเดือนต่อไป

พื้นฐานทางพยาธิสรีรวิทยาของโรคกระดูกเปราะบางหรือโรคกระดูกพรุนเกิดจากปัจจัยหลายอย่างทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อม โภชนาการ ฮอร์โมน และพันธุกรรมที่ส่งผลกระทบต่อโรคนี้ (สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, 2553) ซึ่งปัจจัยทางด้านพันธุกรรมมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อกระดูกจนทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนหรือกระดูกเปราะบางได้ในเวลาต่อมา ด้วยเหตุนี้เองทำให้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนที่ส่งผลกระทบต่อโรคกระดูกพรุนของยีนทั้งสองได้แก่ ยีน *Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) Receptor* หรือยีน *VDR* ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัญญาณ *TaqI (rs731236)* (Vilarino *et al.*, 2011) *FokI (rs2228570)* *BsmI (rs1544410)* และยีน *tumor necrosis factor superfamily member 11* หรือยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัญญาณ *-290C>T (rs9525641)* *-643C>T (rs9533156)* และ *-693G>C (rs9533155)* (Mencej-Bedrac *et al.*, 2009)

ยีน *VDR* ทำหน้าที่สร้างตัวรับวิตามินดี (vitamin D receptor) เป็นยีนที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 12q13.11 โดยที่การทำงานของยีน *VDR* จะมีความสัมพันธ์กับวิตามินดี (1,25-dihydroxyvitamin D₃) กล่าวคือเมื่อวิตามินดีที่ได้จากการสังเคราะห์ทางผิวหนังและการดูดซึมจากทางเดินอาหารเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดจับกับโปรตีน vitamin D binding protein (DBP) หลังจากและเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย เมื่อเข้าสู่นิวเคลียสจะจับกับตัวรับวิตามินดี (vitamin D receptor) และจับกับ retinoic X (retinoic X receptor, RXR) แบบ heterodimerization โดยอาศัย coactivators ในการจับกับสารประกอบเหล่านี้จะจับกับดีเอ็นเอตรงบริเวณ vitamin D response element (VDRE) ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีน และเกิดการออกฤทธิ์ขึ้น (ฉัตรเลิศ พงษ์ไชยกุล, 2552) การเกิดความหลากหลายของยีน *VDR* มีความสัมพันธ์กับเกิดโรคกระดูกพรุน มีการศึกษาภาวะพหุสัญญาณของยีนนี้ในหลายตำแหน่ง เช่น การศึกษาของ

นายแพทย์ บุญส่ง องค์กรพัฒน์กุล และคณะ พ.ศ 2537 ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนในคนไทยกับยีน *Vitamin D Receptor (VDR)* ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานชนิด *BsmI TaqI* และ *Apal* ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน พบว่าคนไทยมียีน *VDR* จีโนไทป์ชนิด *bb* (homozygous recessive) ร้อยละ 78.6 จีโนไทป์ *Bb* (heterozygous dominance) ร้อยละ 21.4 และไม่พบ จีโนไทป์ *BB* (homozygous dominance) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ที่มียีน *VDR* ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานกับ *BsmI* มีความสัมพันธ์กับการควบคุมสมดุลแคลเซียมในร่างกาย โดยผู้ที่มีจีโนไทป์ *AA* จะมีการขับแคลเซียมทางปัสสาวะมากกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ *GA* (บุญส่ง องค์กรพัฒน์กุล และคณะ, 2537) การศึกษาของ Morrison และคณะ ได้รายงานว่ายีน *VDR* ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานมีความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของกระดูก กล่าวคือ ผู้ที่มีจีโนไทป์ *bb* จะมีความหนาแน่นของกระดูกสูงกว่าผู้ที่มี จีโนไทป์ *Bb* และผู้ที่มีจีโนไทป์ *Bb* จะมีความหนาแน่นของกระดูกสูงกว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ *BB* ตามลำดับ (Morrison *et al.*, 1994)

ยีน *TNFSF11* เป็นยีนที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 13q14.11 ยีน *TNFSF11* ทำหน้าที่สร้างโปรตีน Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) ซึ่ง RANKL มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสลายกระดูกของเซลล์ osteoclasts อีกทั้งเซลล์ osteoclasts จะมีการทำงานกับโปรตีนตัวรับ 2 ชนิด คือ Receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) และ osteoprotegerin (OPG) เซลล์ osteoblasts มีโปรตีน RANK ligand (RANKL) อยู่ที่เยื่อหุ้มผิวตลอดเวลา และหลั่งออกสู่เซลล์ osteoclasts โปรตีน RANKL นี้เกิดการจับกับโปรตีนตัวรับที่เข้าคู่กัน (cognate receptor) คือ RANK ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ osteoclasts ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเจริญของเซลล์และเกิดการเปลี่ยนสภาพจากเซลล์ osteoclasts progenitor ไปเป็น เซลล์ osteoclasts ในที่สุด ทำให้มีการสลายเซลล์กระดูกขึ้น สำหรับโปรตีน OPG จะคอยขัดขวางการจับกันระหว่าง RANKL และ RANK ดังนั้นจึงทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการ bone turnover ในระดับเซลล์การสูญเสียกระดูกเป็นผลมาจากความไม่สม่ำเสมอกันระหว่างการทำงานของเซลล์ osteoclasts และ osteoblasts (สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, 2553) ถ้ากระบวนการสร้างและสลายกระดูกไม่ได้ไปอย่างสมดุลจะสามารถส่งผลทำให้เกิดความไม่สมดุลของการปรับแต่งกระดูกทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนหรือกระดูกเปราะบางได้

จากการศึกษาของ Mencej-Bedrac และคณะ ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัณฐานของยีนทั้งสามได้แก่ *TNFSF11* (-290C>T -643C>T และ -693G>C) *OPG* (K3N) และ *VDR* (*BsmI FokI* และ *Cdx2*) กับความหนาแน่นของกระดูกในกลุ่มของประชากรสโลวาเนีย จากการศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของกระดูกโคนขาในผู้ป่วยหญิงที่เป็นโรคกระดูกพรุนหลังหมดประจำเดือนที่ตำแหน่ง *BsmI Cdx2* และมีความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของกระดูกบริเวณเอวที่ตำแหน่ง K3N และ -290C>T แต่จะไม่พบความสัมพันธ์ในผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคกระดูกพรุนและในกรณีของผู้ป่วยหญิงที่เป็นโรคกระดูกพรุนก่อนหมดประจำเดือนพบความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของกระดูกโคนขาและกระดูกสะโพกที่ตำแหน่ง *Cdx2* และในชายสูงอายุพบความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของกระดูกโคนขาและกระดูกบริเวณเอวที่ตำแหน่ง *FokI* (Mencej-Bedrac *et al.*, 2009)

ด้วยเหตุนี้เองทำให้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนที่ส่งผลกระทบต่อโรคกระดูกพรุนของยีน ทั้งสองได้แก่ ยีน *VDR* ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน *TaqI* (rs731236) (Vilarino *et al.*, 2011) *FokI* (rs2228570) *BsmI* (rs1544410) และ ยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155) (Mencej-Bedrac *et al.*, 2009) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษารูปแบบภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และ *TNFSF11* โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) โดยเปรียบเทียบระหว่างประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรคกระดูกพรุนกับประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนที่ไม่ได้เป็นโรคกระดูกพรุนเพื่อเป็นแนวทางในการรักษาโรคต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการศึกษารูปแบบภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* ที่ตำแหน่ง *TaqI* *FokI* *BsmI* และ ยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง -290C>T -643C>T และ -693G>C ของ ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนชาวไทยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นโรคกระดูกพรุน เพื่อประโยชน์ในการหาแนวทางการป้องกันและรักษาโรคต่อไปในอนาคตได้

ขอบเขตการวิจัย

นำตัวอย่างเลือดที่ได้มาจากหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรคกระดูกพรุนและไม่ได้เป็นโรคกระดูกพรุนในกลุ่มประชากรชาวไทยจากคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี และ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติมาสดีเอ็นเอ จากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดแล้วมาตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และ *TNFSF11* โดยใช้ เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ยืนยันลำดับเบส และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และ *TNFSF11* กับความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนด้วยวิธีทางสถิติ

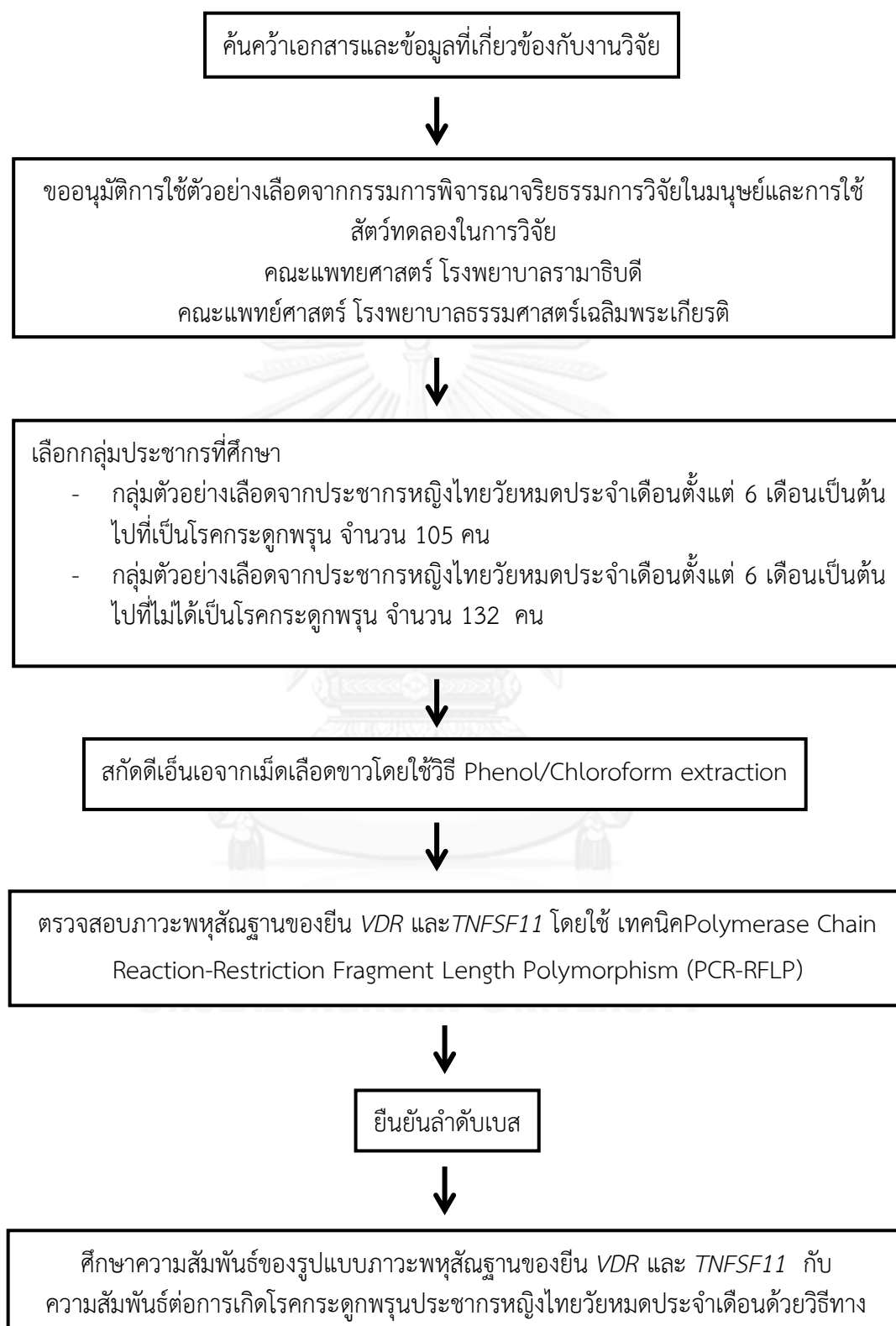
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงความสัมพันธ์ของรูปแบบภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* ที่ตำแหน่ง *TaqI* *FokI* and *BsmI* และ ยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง -290C>T -643C>T และ -693G>C กับความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกในหญิงไทยวัยหมดประจำเดือน โดยได้คาดการณ์ว่ารูปแบบความหลากหลายของยีน *VDR* และ *TNFSF11* จะมีผลต่อความสัมพันธ์การเกิดโรคกระดูกพรุน ซึ่งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปเป็นพื้นฐานในการทำนายและการรักษาโรคได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. ขออนุมัติการใช้ตัวอย่างเลือดจากกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์และการใช้สัตว์ทดลองในการวิจัย จากคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี และ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ
3. เลือกกลุ่มประชากรที่ศึกษา โดยคัดเลือกตัวอย่างเลือดจากประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนตั้งแต่ 6 เดือนเป็นต้นไปที่เป็นโรคระดุกพรุณ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลรามาธิบดี จำนวน 105 คน และกลุ่มตัวอย่างเลือดจากประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนตั้งแต่ 6 เดือนเป็นต้นไปที่ไม่ได้เป็นโรคระดุกพรุณ โดยคัดเลือกกลุ่มประชากรควบคุม ที่มีอายุ เพศใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย โดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลรามาธิบดี และ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ จำนวน 132 คน
4. สกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวของประชากรหญิงไทยที่เป็นโรคระดุกพรุณและกลุ่มควบคุม โดยใช้วิธี Phenol/Chloroform extraction (Lahiri and Nurnberger, 2010)
5. ตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และ *TNFSF11* โดยใช้ เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) (Yanatatsaneeji *et al.*, 2010)
6. ยืนยันลำดับเบสหลังจากทำการทดลองตัวอย่างเลือด
7. ศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และ *TNFSF11* กับความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดุกพรุณประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนด้วยวิธีทางสถิติ

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระดูกมีความสำคัญอย่างมากต่อร่างกาย ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างค้ำยันภายในอีกทั้งยังป้องกันการกระทบกระเทือนของอวัยวะภายใน และยังเป็นที่สะสมแร่ธาตุที่สำคัญต่างๆหลายชนิดเพื่อใช้ในการปรับสมดุลแร่ธาตุภายในร่างกาย โดยปกติแล้วกระดูกจะเป็นแหล่งที่จะมีการสะสมแคลเซียมในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดความยืดหยุ่นและความแข็งแรงของกระดูก โดยที่กระดูกจะต้องอาศัยกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติและเกิดขึ้นตลอดช่วงชีวิตของมนุษย์ โดยกระบวนการเหล่านี้จะประกอบไปด้วยการสลายเนื้อกระดูกที่ไม่ต้องการหรือที่เสื่อมสภาพออกและทดแทนด้วยการสร้างเนื้อกระดูกขึ้นมาใหม่ แต่ถ้าหากเกิดความไม่สมดุลระหว่างกระบวนการสลายกระดูกและการสร้างกระดูกก็จะทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนตามมาได้

กระดูกแบ่งเป็น 2 ประเภทตามลักษณะทางโครงสร้างของกระดูก ได้แก่ กระดูก cortex (cortical bone) ซึ่งจะเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 80 ของปริมาณเนื้อกระดูกทั้งหมด ซึ่งจะเป็นส่วนประกอบชั้นนอกของกระดูกต่างๆภายในร่างกาย และ กระดูก trabecular (trabecular หรือ cancellous bone) อีกร้อยละ 20 ของปริมาณเนื้อกระดูก ซึ่งจะเป็นส่วนประกอบชั้นในของกระดูกต่างๆและพบมาที่กระดูกสันหลัง กะโหลกศีรษะ ซีโครง และ กระดูกข้อมือส่วนปลาย (metaphysis) (Marks and Oadren, 2002; Baron, 2003; Downey and Siegel, 2006; Hadjidakis and Androulakis, 2006) โดยหน้าที่หลักของกระดูกมี 2 ประการ ได้แก่

1. หน้าที่เชิงกล (mechanic) กระดูกจะทำหน้าที่สำคัญในการรับน้ำหนักทั้งหมดของร่างกาย อีกทั้งยังเป็นโครงสร้างและเป็นที่ยึดเกาะของกล้ามเนื้อ และเอ็นต่างที่ใช้สำหรับการเคลื่อนไหว นอกจากนี้ยังเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงสำหรับการป้องกันการกระทบกระเทือนของอวัยวะสำคัญภายในร่างกาย อีกทั้งยังเป็นจุดต้นกำเนิดในการผลิตเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ต้นกำเนิดอีกหลายชนิดอีกด้วย
2. หน้าที่ในเชิงเมตาบอลิซึม (metabolic) จากที่กล่าวมาข้างต้น กระดูกเป็นแหล่งสะสมแร่ธาตุต่างๆที่สำคัญของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสเพื่อนำมาใช้ในกระบวนการควบคุมความสมดุลของแร่ธาตุภายในร่างกายซึ่งจะมีความสำคัญต่อระบบอื่นๆได้แก่ ระบบหัวใจ ระบบประสาท และหลอดเลือด ซึ่งนอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของ cytokines และ growth factors หลายชนิดที่จำเป็นต่อไขกระดูกและเซลล์ต้นกำเนิด

องค์ประกอบของกระดูก

กระดูกของคนปกติจะมีน้ำหนักโดยประมาณ 4 กิโลกรัม โดยมีปริมาตรประมาณ 1,750 มิลลิลิตร และมีปริมาณแร่ธาตุแคลเซียมทั้งหมดประมาณ 1,050 กรัม โดยกระดูกจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นเซลล์กระดูกชนิดต่างๆ และสารนอกเซลล์ (extracellular matrix) โดยส่วนที่เป็นเซลล์มีปริมาณร้อยละ 10 และ extracellular matrix มีปริมาณถึงร้อยละ 90 ของเนื้อกระดูกทั้งหมด ซึ่ง

extracellular matrix จะมีโปรตีนคอลลาเจน (collagen) เป็นส่วนประกอบสำคัญ และโปรตีนอื่นๆ เป็นองค์ประกอบส่วนน้อย (Marks and Oadren, 2002; Baron, 2003; Downey and Siegel, 2006; Hadjidakis and Androulakis, 2006)

เซลล์กระดูก

เซลล์กระดูกมี 4 ชนิด แต่จะสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆตามแหล่งกำเนิดของเซลล์ดังต่อไปนี้

1. เซลล์กลุ่มแรกพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (pluripotential mesenchymal stem cell) ซึ่งจะมีความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันหลากหลายชนิด เช่น เซลล์สร้างกล้ามเนื้อ (myoblast) เซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) เซลล์ไขมัน (adipocyte) และ เซลล์สร้างกระดูกอ่อน (chondrocyte) โดยที่เซลล์กระดูกในกลุ่มนี้มี 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ osteoblast เซลล์ osteocyte และเซลล์บุผิวกระดูก (bone lining cell) (Marks and Oadren, 2002; Katagiri and Takahashi, 2002; Aubin and Triffitt, 2002; Baron, 2003; Lian, Stein and Aubin, 2003)
2. เซลล์กลุ่มที่สองพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) ได้แก่ เซลล์สลายกระดูก (osteoclast) (Takahashi *et al.*, 2002; Vannanen and Laitata-Leinonen, 2009)

เซลล์ osteoblast ทำหน้าที่สร้างกระดูกโดยสร้าง extracellular matrix ในแบบที่เป็นโปรตีนคอลลาเจนและโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน โดยที่โปรตีนคอลลาเจนจะเป็นสารตั้งต้นในการสะสมแคลเซียมและฟอสฟอรัส และในส่วนของโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนจะมีหน้าที่สำคัญในการทำงานของเซลล์ osteoblast และการสะสมแร่ธาตุในเนื้อกระดูก ส่วนเซลล์ osteoblast ถูกล้อมรอบโดย extracellular matrix และมีการสะสมแร่ธาตุจะเรียกว่า osteocyte ซึ่งก็คือ เซลล์ osteoblast ที่พัฒนาจนถึงระยะสุดท้าย โดยที่เซลล์ osteocyte จะเปลี่ยนแปลงโดยการยื่นส่วนของไซโตพลาสซึมออกไปรอบเซลล์เพื่อให้เกิดการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์รวมถึงการติดต่อกับบริเวณผิวกระดูก โดยที่เซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการรับรู้แรงที่กระทบต่อกระดูก (mechano receptor) และการเกิดการเสื่อมสภาพของกระดูกซึ่งเชื่อว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดกระบวนการปรับแต่งกระดูก (Nijweide, Burger and Klien-Nulend, 2002) นอกจากนี้แล้วยังมีหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมความสมดุลของแร่ธาตุในร่างกายอีกด้วย (Cullinane, 2002) สำหรับเซลล์บุผิวกระดูก (bone lining cell) เป็นเซลล์ osteoblast ที่จะพัฒนาจนถึงระยะสุดท้ายเช่นเดียวกับเซลล์ osteocyte แต่ในเซลล์ชนิดนี้ จะมีการปรับเปลี่ยนรูปร่างเป็นเซลล์ลักษณะแบนและจะอยู่ในตำแหน่งผิวกระดูกเท่านั้น โดยในปัจจุบันเชื่อว่าเซลล์เหล่านี้สามารถพัฒนากลับไปเป็นเซลล์ osteoblast ใหม่ได้เมื่อเกิดกระบวนการปรับแต่งกระดูกหรือมีการกระตุ้นที่เหมาะสม และมีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการปรับแต่งกระดูก (Hauge *et al.*, 2001)

เซลล์ osteoclast พัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic stem cell) โดยจะทำหน้าที่ในการสลายกระดูก (bone resorption) เซลล์ osteoclast เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มีหลายนิวเคลียส เมื่อมีการสลายกระดูกเซลล์ osteoclast จะยึดติดกับผิวของกระดูกและมีการสร้างปลายด้านหนึ่งของเซลล์ที่มีส่วนของเยื่อหุ้มไปพันมาลักษณะคล้ายลูกคลื่นซึ่งจะเรียกว่า “ruffled border” โดยที่เซลล์จะสามารถสร้างและหลั่งกรดออกจากเซลล์เพื่อสลายแร่ธาตุออกจากกระดูก เช่น matrix metalloproteinase และ cathepsin เป็นต้น เพื่อสลายโปรตีนคอลลาเจนและโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนของเนื้อกระดูก (Takahashi *et al.*, 2002; Vannanen and Laitata-Leinonen, 2009)

การพัฒนาเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และกระบวนการสร้างกระดูก

กระบวนการพัฒนาเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation) เซลล์ชนิดนี้จะพัฒนา มาจากเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (mesenchymal stem cell) โดยเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้จะมี ความสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อาทิเช่น osteoblast , myoblast , adipocyte และเซลล์ chondrocyte เป็นต้น โดยที่การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ mesenchymal stem cell ไปเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ นั้นจะถูกกำหนดด้วยโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน (transcription factor) โดยจะมีความจำเพาะเจาะจงต่อการพัฒนาไปเป็นเซลล์แต่ละชนิด (Yamaguchi and Kahn, 1991; Marie, 2008) ส่วนการพัฒนาเซลล์ osteoblast จะมีโปรตีนที่กำหนดการแสดงออกอยู่หลายชนิด เช่น โปรตีน runt-related transcription factor 2 (Runx2) หรือ core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) ซึ่งจะเป็นโปรตีนที่กระตุ้นเซลล์ mesenchymal stem cell ให้มีการพัฒนาเซลล์ osteoblast ในระยะแรก (osteoblast lineage commitment) และมีการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ osteoblast ในระยะเวลาต่อมา (Ducy *et al.*, 1997, 1999)

นอกจากนี้ยังมีโปรตีน osterix (Osx) ซึ่งจะเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาไปเป็น เซลล์ osteoblast ระยะสุดท้าย (terminal differentiation) โดยการผลิตโปรตีน Runx2 หรือ Cbfa1 (Nakashima *et al.*, 2002) และในขณะเดียวกันก็จะมีการยับยั้งการพัฒนาของเซลล์ต้น กำเนิดที่จะพัฒนาไปยังเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดอื่นๆ อีกด้วย โดยการยับยั้งการผลิตของโปรตีนที่จะ กระตุ้นการพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น การยับยั้งการผลิตโปรตีน MyoD ซึ่งจะมีความสัมพันธ์ ต่อการพัฒนาเซลล์ myoblast (Gersbach *et al.*, 2004) เป็นต้น

กระบวนการพัฒนาเซลล์ osteoblast จากเซลล์ mesenchymal stem cell แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะกำหนดการพัฒนาของเซลล์ osteoblast (lineage commitment) ระยะการเพิ่ม จำนวน (proliferation) ระยะการสร้างและสะสม extracellular matrix (matrix maturation) และระยะการสะสมผลึกแคลเซียมฟอสเฟต (mineralization) (Aubin and Triffitt, 2002; Lian, Stein and Aubin, 2003) โดยในระยะที่หนึ่งเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะพัฒนาเป็นเซลล์ต้น กำเนิด osteoblast (osteoprogenitor) โดยมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและพัฒนาต่อไปเป็น เซลล์ osteoblast ได้ ในระยะที่สองเซลล์ osteoprogenitor จะพัฒนาเป็นเซลล์สร้างกระดูกระยะ

เริ่มต้น (preosteoblast) จะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่จะพัฒนาเป็นเซลล์ osteoblast และพัฒนาเข้าสู่การเป็นเซลล์ osteoblast เต็มตัว (mature osteoblast) โดยจะสามารถสร้างโปรตีนคอลลาเจนและโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนชนิดต่างๆได้อีกด้วย โดยโปรตีนเหล่านี้จะถูกขับออกจากเซลล์และสะสมใน extracellular matrix และในระยะสุดท้าย เป็นระยะที่มีการสะสมผลึกแคลเซียมฟอสเฟตระหว่างเส้นใยคอลลาเจน (Aubin and Triffitt, 2002; Lian, Stein and Aubin, 2003) โดยที่เซลล์จะเปลี่ยนรูปร่างเป็นเซลล์ที่มีลักษณะแบน ๆ บูดอยู่ที่ผิวกระดูก (bone lining cell) (Aubin and Triffitt, 2002; Lian, Stein and Aubin, 2003) โดยในปัจจุบันเชื่อว่าเซลล์ชนิดนี้มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ osteoblast เมื่อร่างกายต้องการ (Hauge *et al.*, 2001) และยังพบอีกว่าเซลล์ osteoblast 15 เปอร์เซ็นต์ จะถูกล้อมด้วยโปรตีนที่ตนเองสร้างขึ้น ซึ่งจะมีการสะสมแร่ธาตุจนกลายเป็นโครงสร้างแข็ง และจะเรียกเซลล์ชนิดนี้ว่า เซลล์ osteocyte โดยที่จะมีปริมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์กระดูกทั้งหมด โดยที่เซลล์ชนิดนี้จะมีรูปร่างที่ยื่นส่วนของไซโตพลาสซึมออกไปรอบตัวเพื่อการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์ osteocyte ด้วยกัน และยังสามารถติดต่อกับเซลล์ชนิดอื่นๆ ที่บริเวณผิวกระดูกอีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันได้เชื่อว่าเซลล์ osteocyte จะทำหน้าที่เป็นตัวรับรู้แรงกระทำต่อกระดูก (mechanoreceptor) และรับรู้การเกิดการเสื่อมสภาพของกระดูก หน้าที่เหล่านี้เองที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเกิดกระบวนการปรับแก้กระดูก (Nijweide, Burger and Klien-Nulend, 2002; Cullinane, 2002)

การพัฒนาเซลล์ osteoblast จะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนและสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือที่เรียกอีกนัยหนึ่งว่า growth factor ซึ่งสารเหล่านี้จะจับกับ receptor และจะมีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signal transduction) เพื่อทำการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ osteoblast โดยในปัจจุบันฮอร์โมนที่ส่งผลต่อการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกได้แก่ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ ฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโต (growth hormone) และ insulin-like growth factor-1 (IGF-1) , bone morphogenetic protein (BMP) และโปรตีนกลุ่มกลไก Wnt signaling เป็นต้น (Canalis, 2003)

กระบวนการสร้างกระดูก (bone formation) การสร้างกระดูกจำเป็นต้องอาศัยเซลล์จาก 3 แหล่งด้วยกัน ได้แก่ เซลล์จาก neuralcrest (สร้างกระดูกกะโหลกศีรษะบางส่วน) เซลล์จาก paraxial mesoderm (สร้างกระดูกกะโหลกศีรษะและกระดูกสันหลัง) และเซลล์จาก later plate mesoderm (มีการพัฒนาเป็นกระดูกยางค์) โดยที่เซลล์ทั้งสามส่วนนี้จะมีการเคลื่อนตัวเข้าสู่กระบวนการสร้างกระดูกและมีการจัดเรียงตัวตามรูปร่างแบบแผน (mesenchymal condensation) โดยเซลล์เหล่านี้จะสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ chondroblast และเซลล์ osteoblast ที่ทำหน้าที่ในการสร้างกระดูกต่อไป (Karaplis, 2002)

การสร้างกระดูกเกิดขึ้นได้สองกระบวนการได้แก่ กระบวนการ intramembranous ossification และกระบวนการ endochondral ossification ในการสร้างกระดูกโดยกระบวนการ intramembranous ossification เซลล์ที่จัดเรียงตัวตามรูปร่างแบบแผนของกระดูกจะมีการพัฒนาไปเป็น osteoblast จึงทำให้เกิดการสร้างกระดูกได้โดยตรง กระบวนการสร้างกระดูกทั้งสองกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในช่วงที่มีการเจริญพัฒนาของกระดูกซึ่งจะเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิด

กระดูกใหม่และมีการเจริญเติบโตของกระดูกโดยทั้งสองกระบวนการเรียกรวมกันว่า “กระบวนการสร้างและจัดรูปแบบของกระดูก (bone modeling)” แต่ภายหลังจากการเกิดการสร้างและการจัดรูปแบบของกระดูกแล้ว กระดูกยังสามารถสร้างเนื้อกระดูกขึ้นมาใหม่ตลอดเวลาเพื่อทำการทดแทนเนื้อกระดูกที่เสื่อมสภาพหรือปรับแต่งกระดูกให้เข้าแก่การใช้งาน โดยเกิดการสลายเนื้อกระดูกที่ไม่ต้องการหรือเสื่อมสภาพออกไปภายหลังจากนั้นจะมีการแทนที่ด้วยเนื้อกระดูกใหม่ ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า “กระบวนการปรับแต่งกระดูก” (bone remodeling)

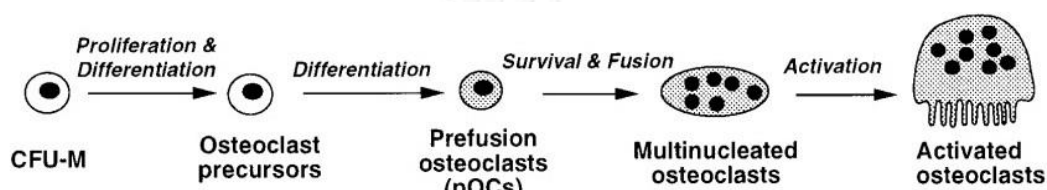
การสร้างเนื้อกระดูกจะอาศัยการทำงานของเซลล์ osteoblast เป็นหลักแต่ในขณะเดียวกัน เซลล์ osteoclast ก็มีความสำคัญในกระบวนการสร้างกระดูกด้วยเช่นกัน โดยที่กระบวนการสร้างและการจัดรูปแบบของกระดูก (bone modeling) จะเกิดขึ้นโดยการทำงานของเซลล์ osteoblast เป็นหลัก ซึ่งการทำงานของเซลล์ osteoblast นี้เองจะส่งผลให้เกิดการทำงานของเซลล์ osteoclast ไปด้วยเช่นกัน โดยที่เซลล์ osteoclast จะทำหน้าที่ในการปรับแต่งกระดูกให้อยู่ในรูปแบบที่ต้องการในกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling) เซลล์ osteoblast จะสร้างกระดูกใหม่เพื่อทดแทนส่วนที่ถูกสลายไป ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวจึงจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเซลล์ osteoclast และ เซลล์ osteoblast โดยที่เซลล์ osteoclast ทำหน้าที่ในการสลายเนื้อกระดูกและหลังจากนั้นเซลล์ osteoblast จึงจะทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อกระดูกขึ้นมาใหม่

การพัฒนาเซลล์ osteoclast และกระบวนการสลายกระดูก

กระบวนการพัฒนาเซลล์สลายกระดูก (osteoclast differentiation) (Takahashi, 1999; Takahashi *et al.*, 2002; Us Department of Health and Human Services, 2004; Lari, 2007; Vannanen and Laitata-Leinonen, 2009) เซลล์ osteoclast จะพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (myeloid progenitor cell) เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่หลากหลายชนิด เช่น เซลล์ osteoclast เซลล์ macrophage เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่มีหลายนิวเคลียส เช่น neutrophil, basophil และ eosinophil อีกทั้งยังสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ oligodendrocyte และ dendritic ได้อีกด้วย (Lari *et al.*, 2007) นอกจากนี้แล้วโปรตีนที่มีการสร้างเซลล์ osteoblast เซลล์มะเร็ง และเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มาจากกระบวนการอักเสบก็ยังสามารถกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ osteoclast ได้เช่นกัน

การพัฒนาเซลล์ osteoclast จากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดสามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ (ดังรูปที่ 1) โดยเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่สร้างกลุ่มเม็ดเลือดขาว (colony-forming unit-macrophage, CFU-M) จะเพิ่มจำนวนและมีการพัฒนาเซลล์ osteoclast progenitor หรือ osteoclast precursor ต่อมาเซลล์ osteoclast progenitor จะมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์สลายกระดูกแต่ยังไม่สมบูรณ์ซึ่งจะเรียกว่า preosteoclast เซลล์ในระยะนี้มีลักษณะที่มีนิวเคลียสเซลล์เดียวซึ่งอาจจะเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า mononuclear osteoclast หรือ prefusion osteoclast หลังจากนั้นเซลล์ preosteoclast ที่ยังไม่สมบูรณ์จำนวนหลายเซลล์จะรวมตัวกันจนกลายเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cell) ซึ่งโดนส่วนใหญ่แล้วจะมีประมาณ 4-

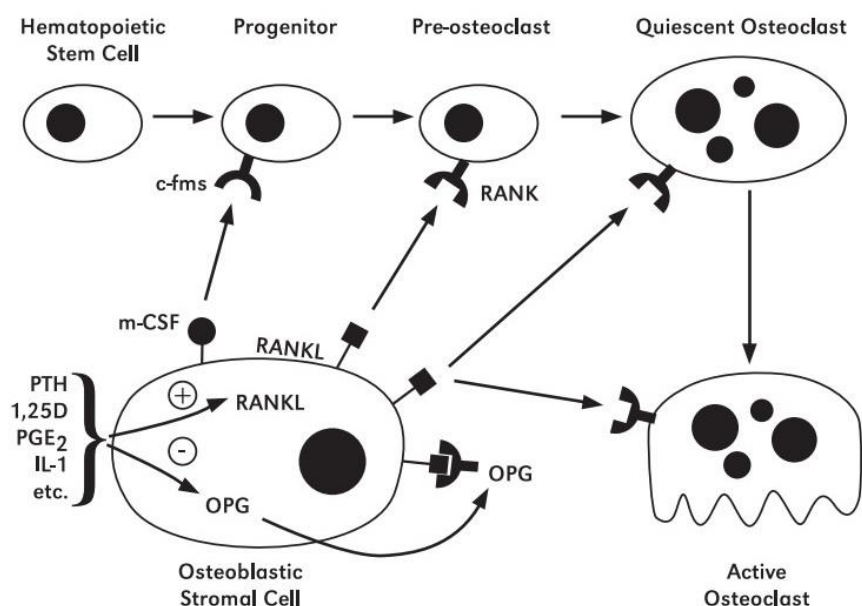
20 นิวเคลียส ซึ่งในระยะนี้ถึงแม้ว่าจะเป็นเซลล์ osteoclast ที่สมบูรณ์แล้วแต่ยังไม่สามารถทำหน้าที่ในการสลายกระดูกได้จะเรียกเซลล์ในระยะนี้ว่า multinucleated osteoclast หรือ quiescent osteoclast จะมีการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวของเซลล์ด้านที่ยึดติดกับกระดูกโดยเซลล์จะสร้างผิวปลายด้านหนึ่งให้มีลักษณะของเยื่อบุผิวที่พับไปมาเป็นลูกคลื่น (ruffled border) ซึ่งบริเวณดังกล่าวนี้จะมีบทบาทสำคัญอย่างมากในการสลายกระดูกและจะเรียกเซลล์นี้ว่า active หรือ mature osteoclast (Takahashi *et al.*, 1999; Lari *et al.*, 2007)



รูปที่ 1 กระบวนการพัฒนาของเซลล์ osteoclast

(Takahashi *et al.*, 1999)

การพัฒนาเซลล์ osteoclast จากเซลล์ต้นกำเนิดนั้นทุกขั้นตอนจะจำเป็นต้องอาศัยการกระตุ้นจาก macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) และ receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) ที่ผลิตจากเซลล์ในสายเซลล์ osteoblast (ดังรูปที่ 2) โปรตีน M-CSF นี้จะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและพัฒนาไปเป็นเซลล์ osteoclast progenitor หรือ osteoclast precursor ได้ รวมทั้งสามารถกระตุ้นการพัฒนาให้เป็นเซลล์ preosteoclast ส่วนโปรตีน RANKL เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม tumor necrosis factor (TNF) superfamily ที่สร้างและอยู่บนผิวเซลล์ osteoblast โดยโปรตีนชนิดนี้จะจับกับตัวรับ receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) ที่อยู่บริเวณผิวของเซลล์ osteoclast เพื่อทำการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ osteoclast หลังจากที่ RANKL จับกับ RANK บนผิวเซลล์ในเซลล์ osteoclast แล้วจะทำให้เกิดการกระตุ้นการส่งสัญญาณผ่าน TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) ทำให้เกิดการกระตุ้น mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ nuclear factor-kappaB (NF-kB) ซึ่งการกระตุ้นนี้จะทำให้เกิดการพัฒนาของเซลล์ osteoclast ขึ้นในเวลาต่อมา และนอกจากนี้แล้วการกระตุ้น NF-kB ยังสามารถทำให้เซลล์ osteoclast มีช่วงชีวิตที่ยาวนานขึ้นอีกด้วย (Takahashi *et al.*, 1999; Katagiri and Takahashi, 2002; Takahashi *et al.*, 2002; Department of Health and Human Services, 2004; Lari *et al.*, 2007; Novack and Teitelbaum, 2008; Vannanen and Laitala-Leinonen, 2009)



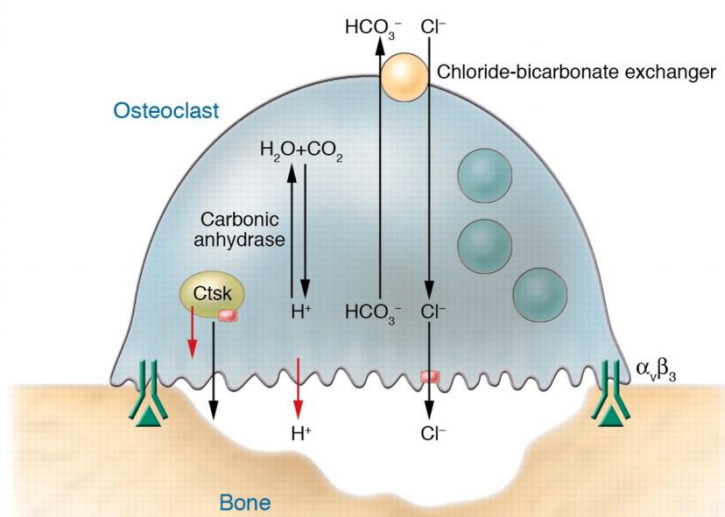
รูปที่ 2 กระบวนการพัฒนาของเซลล์สลายกระดูกจากเซลล์ต้นกำเนิด

(Department of Health and Human Services, 2004)

กล่าวโดยสรุปคือโปรตีน RANKL สามารถกระตุ้นในทุกๆระยะของการพัฒนาเซลล์ osteoclast progenitor หรือ osteoclast precursor ให้เป็นเซลล์ activated หรือ mature osteoclast และยังสามรถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ osteoclast ให้ทำหน้าที่ในการสลายกระดูกอีกด้วย และในกระบวนการพัฒนาเซลล์ osteoclast นอกจากจะมีระบบการกระตุ้นการพัฒนาและการทำงานแล้วยังมีการยับยั้งการพัฒนาเซลล์เพื่อที่จะควบคุมความสมดุลอีกด้วย โดยเซลล์ osteoblast จะสร้างโปรตีน osteoprotegerin (OPG) ซึ่งจะทำหน้าที่แย่งจับของเซลล์ RANKL แทน RANK ทำให้ osteoclast ไม่สามารถพัฒนาไปเป็น เซลล์ activated osteoclast เพื่อใช้ในการสลายกระดูกต่อไปได้

กระบวนการสลายกระดูก (bone resorption) (Takahashi *et al.*, 1999; Katagiri and Takahashi, 2002; Takahashi *et al.*, 2002; Department of Health and Human Services, 2004; Lari *et al.*, 2007; Novack and Teitelbaum, 2008; Vannanen and Laitata-Leinonen, 2009) กระบวนการนี้เกิดขึ้นโดนการทำงานของเซลล์ osteoclast เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสมจากฮอร์โมนและ cytokines ชนิดต่างๆ เมื่อมีการสลายกระดูก เซลล์ osteoclast นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงบริเวณผิวด้านที่ติดอยู่กับกระดูกจะมีลักษณะรอยพับไปพับมา (ruffled border) โดยในบริเวณนี้จะมีโครงสร้างภายในขนาดเล็กที่ทำหน้าที่สลายเนื้อกระดูก ซึ่งเซลล์ osteoclast ที่ได้รับการกระตุ้นจะยึดเกาะกับผิวของเนื้อกระดูกโดยใช้โปรตีน integrin ซึ่งจะเป็นตัวรับ (receptor) บริเวณผิวเซลล์เพื่อใช้ในการยึดเกาะกับโปรตีนที่มีกรดอะมิโน RGD เช่น osteopontin และ bone sialoprotein ใน extracellular matrix โปรตีน integrin โดยบริเวณผิวเซลล์ osteoclast ยึดติดกับผิวกระดูกนี้เรียกว่า sealing zone ซึ่งจะก่อให้เกิดการจำกัดพื้นที่ที่จะมีการสลายเนื้อกระดูก

ในการสลายเนื้อกระดูกนั้นจะมีการผลิตกรด (H^+) และหลังเข้าสู่บริเวณที่ต้องการสลายเนื้อกระดูกเพื่อละลายแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสออกจากเนื้อกระดูกโดยอาศัยเอนไซม์ carbonic anhydrase ภายในเซลล์ ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่ในการผลิตกรดจากเซลล์ โดยเอนไซม์จะสร้าง H^+ และ HCO_3^- และกรดจะถูกขับออกจากเซลล์เข้าสู่บริเวณที่มีการสลายกระดูกโดยผ่าน proton pump (H^+ -ATPase) ซึ่งบริเวณ ruffled border ความเป็นกรดภายในบริเวณตำแหน่งที่เกิดการสลายกระดูกจะถูกควบคุมสมดุลโดยการหลัง Cl^- ออกจากบริเวณ ruffled border เช่นเดียวกัน ซึ่งการหลัง Cl^- จะอาศัย CIC-7 (chloride channel 7) นี้อีกด้วย หลังจากการละลายแร่ธาตุออกจากเนื้อกระดูกแล้วเซลล์ osteoclast จะทำการย่อยโปรตีนคอลลาเจนซึ่งจะเป็นส่วนประกอบหลักของ extracellular matrix โดยจะใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ อาทิเช่น cathepsin K และในส่วนของโปรตีนที่ถูกย่อยสลายแล้วจะถูกเก็บเข้าสู่เซลล์ osteoclast และจะถูกขับออกจากเซลล์ผ่านผิวเซลล์อีกด้านหนึ่งที่ไม่ได้สัมผัสกับผิวกระดูก (ดังรูปที่ 3) (Takahashi *et al.*, 1999; Katagiri and Takahashi, 2002; Takahashi *et al.*, 2002; Department of Health and Human Services, 2004; Lari *et al.*, 2007; Novack and Teitelbaum, 2008; Vannanen and Laitata-Leinonen, 2009)



รูปที่ 3 องค์ประกอบของเซลล์สลายกระดูก

(Patrick *et al.*, 2006)

กระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling)

กระบวนการปรับแต่งกระดูกเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตลอดทั้งช่วงชีวิตของมนุษย์และมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการทำงานของกระดูกทั้งในเชิงกลศาสตร์และในเชิงเมแทบอลิซึม โดยที่กระบวนการดังกล่าวนี้จะเกิดหลังจากเกิดการสร้างและจัดรูปแบบของกระดูกแล้ว แต่จะไม่ทำให้เกิดการเจริญเติบโตของกระดูกเพิ่มขึ้น แต่จะเป็นการสร้างเนื้อกระดูกใหม่เพื่อทดแทนเนื้อกระดูกที่เสื่อมสภาพหรือปรับแต่งกระดูกให้เหมาะสมแก่การใช้งาน โดยมีการสลายเนื้อกระดูกเก่าออกแล้วจึงทดแทนด้วยเนื้อกระดูกขึ้นมาใหม่ ซึ่งกระบวนการนี้มีบทบาทหลัก 3 ประการได้แก่

1. การปรับแต่งกระดูกตามลักษณะแรงที่กระทำต่อกระดูก (mechanical stress) โดยกระบวนการนี้มีหน้าที่ทำให้กระดูกเกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้สอดคล้องต่อการใช้งานของกระดูกในแต่ละตำแหน่ง
2. การซ่อมแซมเนื้อกระดูกที่เสื่อมสภาพลง โดยปกติแล้วเนื้อกระดูกจะมีการเสื่อมสภาพภายหลังจากการใช้งาน ซึ่งถ้ามีการสะสมของร่องรอยความเสียหายในปริมาณที่มากจะส่งผลให้ความแข็งแรงของกระดูกลดลง ซึ่งกระบวนการนี้จะปรับแต่งกระดูกตรงบริเวณที่มีความเสียหายที่เกิดขึ้นและจะแทนที่ด้วยเนื้อกระดูกใหม่ ดังนั้นในกระบวนการปรับแต่งกระดูกจึงมีบทบาทสำคัญในการรักษาความแข็งแรงของกระดูก
3. การควบคุมสมดุลแร่ธาตุในร่างกายโดยเฉพาะแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสในกระดูก เนื่องจากกระดูกเป็นแหล่งสะสมแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ใหญ่ที่สุดของร่างกาย เพราะฉะนั้นการสลายกระดูกจึงมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการเปลี่ยนแปลงระดับแร่ธาตุในกระแสเลือด แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการปรับแต่งกระดูกอาจจะมีบทบาทในการรักษาสมดุลแร่ธาตุลดลง ในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างเฉียบพลัน (very acute phase) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นชนิดเรื้อรัง (chronic phase)

วัฏจักรของกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling cycle)

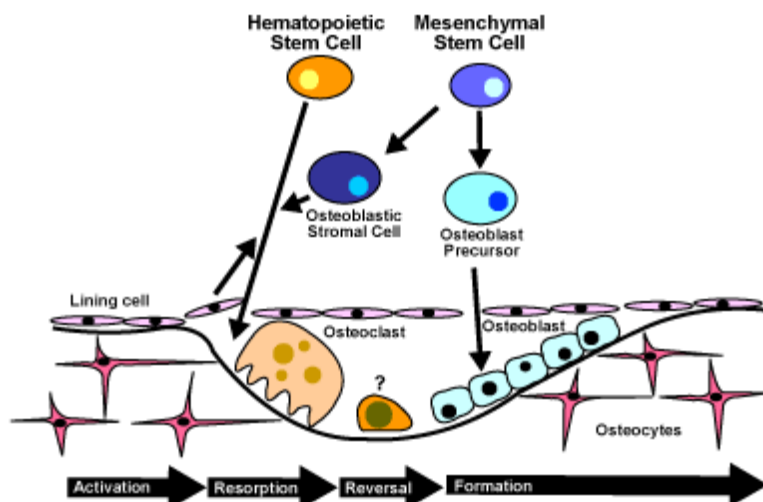
กระบวนการปรับแต่งกระดูกนี้เกิดจากการทำงานร่วมกันของเซลล์กระดูกหลายชนิดด้วยกัน โดยเซลล์ osteoclast จะคอยทำหน้าที่ในการรับรู้แรงที่กระทำต่อกระดูกและตรวจสอบร่องรอยความเสียหายขนาดเล็กที่ต้องการซ่อมแซมซึ่งจะรับรู้ได้โดยเซลล์ osteocyte ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดกระบวนการปรับแต่งกระดูก เซลล์บุผิวกระดูก (bone lining cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เป็นต้นกำเนิดของเซลล์ osteoblast ส่วนเซลล์ osteoclast ทำหน้าที่ในการสลายเนื้อกระดูกที่ไม่ต้องการทิ้ง ในขณะที่เซลล์ osteoblast จะทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อกระดูกขึ้นมาใหม่ทดแทนส่วนที่เซลล์ osteoclast สลายไป เซลล์ osteoclast และ osteoblast จะทำงานร่วมกันเพื่อสลายเนื้อกระดูกใหม่ขึ้นมาทดแทนโดยเรียกรวมว่า basic multicellular unit (BMU) (Ott, 2002; Mundy *et al.*, 2003; Department of Health and Human Services, 2004; Hadjidakis and Androulakis, 2006; Sims and Gooi, 2008; Martin and Seeman, 2008; Boyce and Xing, 2008)

กระบวนการปรับแต่งกระดูกสามารถแบ่งได้ออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะการเกิดและกระตุ้นการทำงาน BMU (origination and activation) , ระยะการสลายกระดูก (bone resorption) , ระยะ reversal และระยะการสร้างกระดูก (bone formation) (Ott, 2002; Mundy *et al.*, 2003; Department of Health and Human Services, 2004; Sims and Gooi, 2008) ดังต่อไปนี้ (ดังรูปที่ 4)

1. ระยะการเกิดและกระตุ้นการทำงาน BMU (origination and activation) ซึ่งในระยะนี้ เซลล์บุผิวกระดูกจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและแยกออกจากกัน (bone lining cell retraction) จะทำให้เกิดการเปิดของผิวเนื้อกระดูก (bone surface exposure) และ

จะมีการหลั่งสาร RANKL ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำเซลล์ osteoclast precursor จาก กระแสเลือดหรือจากบริเวณตำแหน่งใกล้เคียง เข้าสู่ตำแหน่งที่มีการเปิดผิวเนื้อกระดูก ซึ่งในปัจจุบันมีการสันนิษฐานว่าตัวกระตุ้นต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนแรกคือ osteocyte นั้นเอง

2. ระยะเวลาสลายกระดูก (bone resorption) เซลล์ osteoclast progenitor หรือ osteoclast precursor ที่อยู่บริเวณผิวกระดูกจะมีการพัฒนาเป็นเซลล์ osteoclast และจะทำหน้าที่ในการสลายกระดูกโดยที่เซลล์ที่เกิดขึ้นจะมีช่วงอายุเฉลี่ยโดยประมาณ เพียง 12 วัน จากนั้นจะตายเองโดยธรรมชาติ (apoptosis) หลังจากทำหน้าที่สลายกระดูก แต่การสลายกระดูกนี้ยังคงดำเนินต่อไปเป็นเวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ โดยจะมีการสร้างเซลล์ osteoclast ขึ้นมาใหม่ทดแทนเรื่อยๆตลอดระยะเวลาการสลายกระดูก การสร้างเซลล์ osteoclast นี้จะอาศัยการกระตุ้นจาก Growth hormone factor และ cytokines ต่างๆ ผ่านเซลล์ osteoblast และ ระบบ RANK-RANKL-OPG (Ott, 2002; Mundy *et al.*, 2003; Department of Health and Human Services, 2004; Hadjidakis and Androulakis, 2006; Sims and Gooi, 2008; Martin and Seeman, 2008; Boyce and Xing, 2008)
3. ระยะเวลา reversal จะมีระยะเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ ซึ่งในระยะนี้พบว่าบริเวณผิวกระดูกที่มีการสลายเนื้อกระดูกจะมีนิวเคลียสเซลล์เดี่ยว (mononuclear cell) โดยเซลล์ชนิดนี้ทำหน้าที่ในการเตรียมพื้นที่ผิวที่มีการสร้างกระดูกใหม่และอาจจะส่งสัญญาณการกระตุ้นการพัฒนาเซลล์ osteoblast (Ott, 2002; Mundy *et al.*, 2003; Department of Health and Human Services, 2004; Hadjidakis and Androulakis, 2006; Sims and Gooi, 2008; Martin and Seeman, 2008)
4. ระยะเวลาสร้างกระดูก (bone formation) เป็นระยะที่ใช้เวลานานที่สุดคือประมาณ 4-6 เดือน ซึ่งในระยะนี้จะมีการกระตุ้นการพัฒนาการเซลล์ต้นกำเนิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันไปเป็นเซลล์ osteoblast โดยเซลล์ osteoblast จะทำการสร้างและสะสมโปรตีนต่างๆ ล้อมรอบเซลล์ (extracellular matrix) จนสุดท้ายจะมีการสะสมแร่ธาตุแคลเซียมและ ฟอสฟอรัส (mineralization) โดยที่การสร้างและการสะสม extracellular matrix และการสะสมแร่ธาตุจะมีอัตราส่วนที่เท่ากัน แต่การสะสมแร่ธาตุจะเกิดภายหลังการสร้างและสะสม extracellular matrix ประมาณ 15 วัน (Hauge, 2001; Ott, 2002; Mundy *et al.*, 2003; Hadjidakis and Androulakis, 2006; Department of Health and Human Services, 2004; Sims and Gooi, 2008; Martin and Seeman, 2008; Boyce and Xing, 2008)



รูปที่ 4 วัฏจักรของกระบวนการปรับแต่งกระดูก

(<http://lmt.projectsinknowledge.com/Activity/index.cfm?showfile=b&jn=1892&sj=1892.01&sc=1892.01.3>)

การควบคุมกระบวนการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling regulation)

กระบวนการปรับแต่งกระดูกที่เกิดขึ้นอย่างสมดุลนี้ มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการคงสภาพความแข็งแรงของกระดูก หากเกิดความไม่สมดุลระหว่างการสลายและการสร้างเนื้อกระดูกจะทำให้เกิดโรคกระดูกได้ เช่น โรคกระดูกพรุน เป็นต้น ดังนั้นการควบคุมกระบวนการปรับแต่งกระดูกจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

การควบคุมกระบวนการปรับแต่งกระดูกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบใหญ่ๆได้แก่ ระบบการควบคุมเฉพาะที่ (local control) ที่ควบคุมโดย growth factors และ cytokines ต่างๆ (Ott, 2002; Mundy *et al.*, 2003; Hadjidakis and Androulakis, 2006; Sims and Gooi, 2008; Martin and Seeman, 2008; Boyce and Xing, 2008) และระบบควบคุมจากระยะไกล (systemic control) ซึ่งจะควบคุมด้วยฮอร์โมนต่างๆของระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทอัตโนมัติ 4,43,44,48-50 โดยที่ growth factors และ สาร cytokines ที่ควบคุมการปรับแต่งของกระดูกมีหลายชนิด เช่น transforming growth factor- β (TGF- β), bone morphogenetic proteins (BMP), basic fibroblast growth factor (bFGF), prostaglandin (PGE1, PGE2, PGG2, PGH2, PG12) และ interleukin (IL-1, 6, 8, 10, 11) เป็นต้น (Hadjidakis and Androulakis, 2006; Fernandez *et al.*, 2006; Martin and Seeman, 2008) สารเหล่านี้จะควบคุมกระบวนการปรับแต่งกระดูกโดยผ่านระบบ RANK-RANKL-OPG ซึ่งจะเป็นกลไกหลักในการควบคุมการพัฒนาและการทำงานของเซลล์ osteoclast เช่น TGF- β สามารถกระตุ้นการทำงานของ OPG (Thirunavukkarasu *et al.*, 2001), FGF-2 สามารถทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของ OPG และ

กระตุ้น RANKL (Yano *et al.*, 2001) ในขณะที่ PGE2 จะทำหน้าที่ในการกระตุ้น OPG แต่ยับยั้งการทำงานของ RANKL (Liu *et al.*, 2005) เป็นต้น

ในส่วนของระบบการควบคุมจากระยะไกล โดยมีฮอร์โมนหลายชนิดที่ส่งผลต่อการปรับแต่งกระดูก เช่น ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ ฮอร์โมนควบคุมการเจริญ ฮอร์โมนไทรอยด์ วิตามินดี ฮอร์โมนเพศซึ่งรวมถึงฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) และ ฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) เป็นต้น ฮอร์โมนเหล่านี้มีบทบาทต่อการพัฒนาการทำงานของเซลล์ osteoclast และเซลล์ osteoblast เช่น ฮอร์โมนเพศชายและฮอร์โมนควบคุมการเจริญ (growth hormone และ IGF-1) จะสามารถกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ osteoblast ได้ (Valsamis *et al.*, 2006) ส่วนฮอร์โมนเพศหญิง ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอยด์ และฮอร์โมนพาราไทรอยด์ มีผลต่อเซลล์ osteoblast และ เซลล์ osteoclast โดยฮอร์โมนเพศหญิงจะมีผลต่อการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ osteoblast (Manolagas, 2000) และการยับยั้งการพัฒนาของเซลล์ osteoclast จะสามารถกระตุ้น OPG (Saika *et al.*, 2001) ส่งผลให้มีเนื้อกระดูกที่เพิ่มขึ้น ฮอร์โมนกลูโคคอร์ติคอนด์ มีความสำคัญในการพัฒนาเซลล์ osteoblast ในบางระยะ แต่ยังมีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของเซลล์ osteoblast ในขณะที่เดียวกันก็ยับยั้งการพัฒนาของเซลล์ osteoclast โดยจะกระตุ้น RANKL และยับยั้ง OPG (Weinstein *et al.*, 1998; Hofbauer *et al.*, 1999)

โรคกระดูกพรุนในหญิงวัยหมดประจำเดือน

ภาวะกระดูกหักจากโรคกระดูกพรุนเป็นปัญหาที่พบได้บ่อยในเพศหญิงมากกว่าเพศชายโดยมีความเชื่อว่าการขาดเอสโตรเจนน่าจะมีผลต่อการสร้างกระดูก (bone formation) และส่งผลให้กระดูกเปราะบางได้ จากการสำรวจเมื่อปี พ.ศ. 2534 พบว่า 1/3 ของผู้หญิงอายุระหว่าง 60-70 ปี จะมีการวินิจฉัยว่าเป็นโรคกระดูกพรุน แต่สัดส่วนดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเป็น 2/3 ภายหลังจากอายุได้ 80 ปี (Am J Med, 1991) และจากข้อมูลของได้รับการตรวจความหนาแน่นของกระดูกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างเดือน สิงหาคม พ.ศ.2536 ถึง เดือน กันยายน พ.ศ. 2539 (นิमित เทชไกรชนะ และ คณะ, 2536) จำนวน 6,953 รายที่มีอายุตั้งแต่ 40 ปี ขึ้นไป พบว่ามีความหนาแน่นของกระดูก (bone mineral density, BMD) ที่เข้าเกณฑ์โรคกระดูกพรุนในส่วนของกระดูกส่วนสะโพก (femoral neck and intertrochanteric) และกระดูกสันหลังส่วนเอว (lumber spine L1-4) ตรงตามนิยามขององค์การอนามัยโลก (WHO : osteoporosis = $BMD \leq -2.5$ standard deviation) โดยที่ค่ามาตรฐานในหญิงไทย (osteoporosis : lumber spin L1-L4 $BMD \leq 0.682$ g/cm², femoral neck $BMD \leq 0.569$ g/cm², intertrochanteric $BMD \leq 0.769$ g/cm²) จากสถิติที่กล่าวไว้ ผู้หญิงที่อยู่ในช่วงอายุประมาณ 50-59 ปีจะพบร้อยละ 5-8 หญิงในช่วงอายุ 60-69 ปีพบได้ร้อยละ 20-25 หญิงในช่วงอายุ 70-79 ปี พบได้ร้อยละ 35-50 และหญิงที่อายุตั้งแต่ 80 ปีขึ้นไปพบได้ร้อยละ 40-80 โดยปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนมี 7 ปัจจัยด้วยกันคือ

1. ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม
2. ปัจจัยทางด้านฮอร์โมน ได้แก่ หญิงที่หมดประจำเดือนก่อนกำหนด (ก่อนอายุ 40 ปี)

3. ปัจจัยทางด้านโภชนาการ ได้แก่ การได้รับแร่ธาตุแคลเซียมและวิตามินดีที่ปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย การดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ และการดื่มเครื่องดื่มที่มีสาคาเฟอีนมาก เป็นต้น
4. ปัจจัยทางด้านพฤติกรรมสุขภาพ ได้แก่ การสูบบุหรี่ ไม่ใช้ร่างกาย (physical inactivity)
5. โรคทางอายุรกรรม ได้แก่ โรคระบบต่อมไร้ท่อ โรคกระดูกและข้อ เป็นต้น
6. ปัจจัยจากการใช้ยา ได้แก่ การใช้ยากลับโคคอร์ตโคยด์เป็นระยะเวลาานาน เป็นต้น
7. ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ น้ำหนักตัวน้อย สูงอายุ เป็นต้น

โดยปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อลักษณะที่ปรากฏของกระดูก (Smith *et al.*, 1973; Pocock *et al.*, 1987) ทำให้มีการศึกษาถึงบทบาทของพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับกระดูกอย่างจริงจัง จนถึงปัจจุบันมีการศึกษาในเรื่องกระดูกอย่างมากมาโดยพบว่ามีผลต่อความหนาแน่นของกระดูก (BMD) และลักษณะทางโครงสร้างของกระดูก (bone geometry) ซึ่งจะส่งผลต่อความแข็งแรงของกระดูก (bone strength)

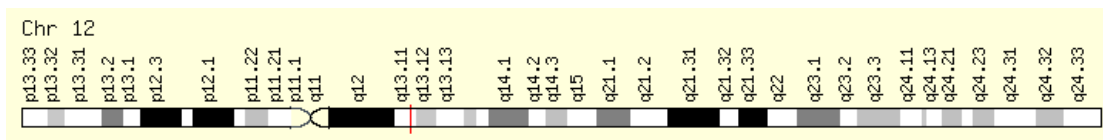
พันธุกรรมนอกจากจะมีผลต่อความหนาแน่นของกระดูกแล้ว ยังมีผลต่อลักษณะอื่นๆของกระดูก ได้แก่ คุณสมบัติของกระดูกจากการตรวจคลื่นเสียงความถี่สูง (quantitative ultrasound) (Arden *et al.*, 1996) ลักษณะทางโครงสร้างของกระดูกสะโพก (femoral neck geometry) (Arden *et al.*, 1996) รวมไปถึงเมแทบอลิซึมของกระดูกจากการตรวจค่าทางชีวเคมีของการหมุนเวียนกระดูก (biochemical marker of bone turnover) (Hunter *et al.*, 1996) นอกจากนี้แล้ว พันธุกรรมยังส่งผลต่อปัจจัยอื่นๆที่อาจจะเพิ่มความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนและการเกิดกระดูกหักได้ เช่น ความสูง (Silventoinen, 1996) ดัชนีมวลกาย (Kaprio *et al.*, 1996) อายุที่เริ่มมีประจำเดือนและหมดประจำเดือน (Kaprio *et al.*, 1995; Snieder *et al.*, 1998) ความสัมพันธ์ต่อการหัก (Reed and Dick, 1997) และความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ (Arden and Spector, 1997) เป็นต้น สำหรับผลของพันธุกรรมต่อความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกหัก จะพบว่าพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการเกิดกระดูกหักได้เช่นกัน (Kannus *et al.*, 1999; Macgregor *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2002; Kanis *et al.*, 2004; Andrew *et al.*, 2005; Michaelsson *et al.*, 2005) และเนื่องจากพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ดังนั้นการศึกษาถึงยีนที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนจึงมีความสำคัญในการรักษาโรคกระดูกพรุนในอนาคตโดยใช้เป็นตัวประเมินหรือทำนายความสัมพันธ์ของการเกิดโรค และใช้ในการพิจารณาเลือกวิธีในการรักษา ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งของการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genetic maker) ที่อาจเป็นไปได้ในอนาคตข้างหน้า (ฉัตรเลิศ พงษ์ไชยกุล, 2552)

ยีนที่สนใจในการศึกษาในครั้งนี้

ยีน Vitamin D receptor (*VDR*) เป็นยีนที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 12q13.11 (ดังรูปที่ 5) ซึ่งยีน *VDR* มีการทำงานที่สัมพันธ์กับวิตามินดี กล่าวคือเมื่อวิตามินดีที่สังเคราะห์จากผิวหนังและการดูดซึมจากทางเดินอาหารเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือดจับกับโปรตีน vitamin D binding protein (DBP) หลังจากนั้นจะเข้าสู่เซลล์เป้าหมายต่อไป โดยทั่วไปแล้ววิตามินดีชนิดออกฤทธิ์ $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ จะทำงานโดยจับกับตัวรับวิตามินดี (vitamin D receptor) ซึ่งจะจับคู่กับตัวรับ retinoic X (retinoic X receptor, RXR) เพื่อจับกับส่วนที่เรียกว่า vitamin D response element (VDRE) บนยีนเป้าหมายเพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน การเกิดมิวเทชัน (mutation) ของยีน *VDR* จะทำให้เกิดโรคทางเมแทบอลิซึมของกระดูกได้

ยีน *VDR* เป็น candidate gene ตัวแรกที่มีการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของ SNPs กับการเกิดโรคกระดูกพรุน โดยการศึกษาในครั้งนี้จะมุ่งเน้นที่ polymorphism 3 ตำแหน่งได้แก่ *TaqI* (rs731236), *BsmI* (rs1544410) และ *FokI* (rs2228570) ซึ่งมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของ SNP แต่ละตำแหน่งและความหนาแน่นของกระดูก เช่น การศึกษาของ Thak-Kinstian และ คณะ พบว่า ที่ตำแหน่ง SNP *BsmI* มีความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของกระดูกสันหลังแต่ไม่มีความสัมพันธ์กับความหนาแน่นของ กระดูก สะโพก (Thakkinstian *et al.*, 2004) , Gross และคณะ ทำการศึกษาพบว่า *FokI* มีความสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นของกระดูกและการเกิดโรคอีกด้วย (Gross *et al.*, 1996), จากการศึกษาของ Singh และคณะ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ polymorphism ของ *VDR* gene ที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนในหญิงชาวอินเดียเหนือที่หมดประจำเดือน พบว่า ใน SNP *FokI* ที่ minor allele “T” ในรูปแบบการถ่ายทอดเป็นแบบ dominant ซึ่งจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนอย่างมีนัยสำคัญ (Singh *et al.*, 2013)

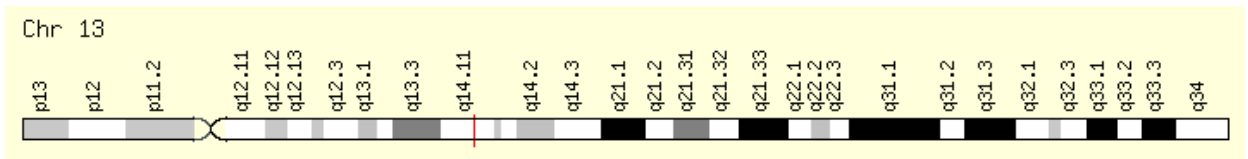
จากการศึกษาพบว่าที่ตำแหน่ง SNP *TaqI* (rs731236) เกิดภาวะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง exon 9 โดยเปลี่ยนจากแอลลิล T ไปเป็น แอลลิล C แต่ยังคงเป็นกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (isoleucine) , *BsmI* (rs1544410) เกิดภาวะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง Intron 9 โดยเปลี่ยนจากแอลลิล G ไปเป็น แอลลิล A ซึ่งทั้งสอง SNPs นี้มี linkage disequilibrium (LD) ที่บริเวณ poly(A) microsatellite ตรงตำแหน่งบริเวณ 3'UTR ซึ่งจะมีผลต่อความเสถียรของ mRNA (Linda *et al.*, 1999) ส่วน SNP *FokI* (rs2228570) เกิดภาวะพหุสัณฐานที่ตำแหน่ง exon 2 โดยเปลี่ยนจากแอลลิล C ไปเป็น แอลลิล T และเปลี่ยนกรดอะมิโนจากทรีโอนีน (threonine) ไปเป็น เมไทโอนีน (methionine) จากการศึกษาพบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแอลลิลแล้วส่งผลให้การกระตุ้นต่อตำแหน่ง vitamin D response element (VDRE) ลดลง จากการศึกษาพบว่าแอลลิล T มีความสัมพันธ์ต่อค่าความหนาแน่นมวลกระดูกที่ลดลง ในขณะที่เดียวกันก็ยังไม่เป็นที่ยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีกลไกอย่างไรต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน (Arai *et al.*, 1997)



รูปที่ 5 ภาพจำลองโครโมโซมของยีน *VDR* ที่ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 12q13.11

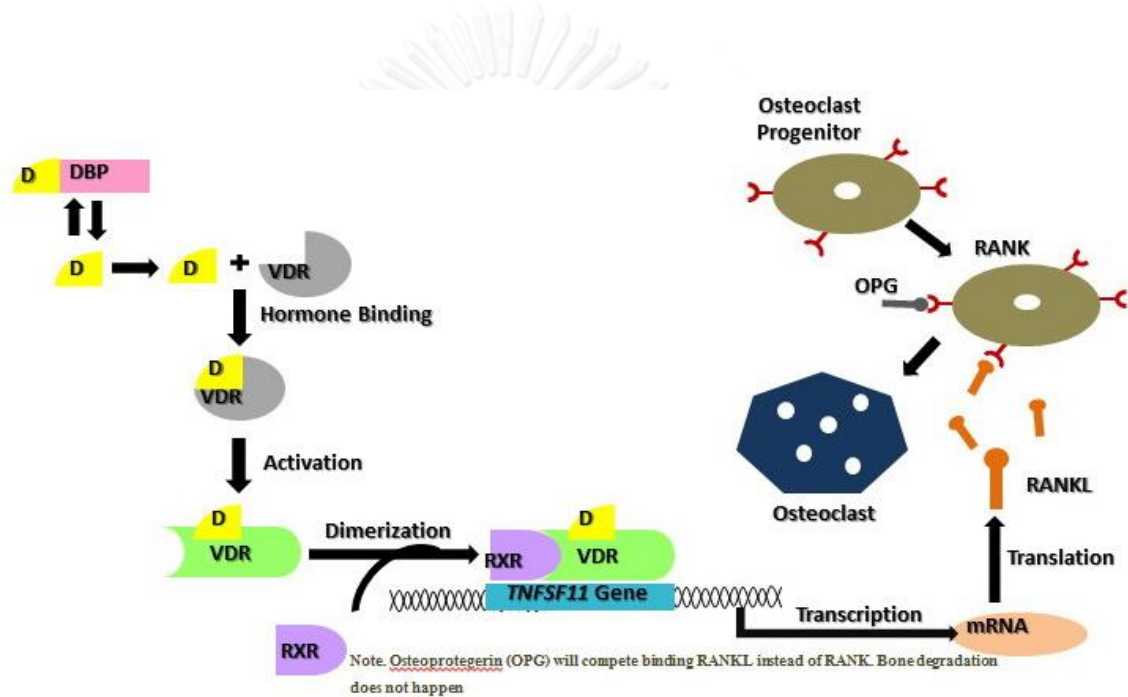
(<http://www.genecards.org>)

ยีน Tumor necrosis factor superfamily member 11 (*TNFSF11*) เป็นยีนที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 13q14.11 (ดังรูปที่ 6) ยีน *TNFSF11* ทำหน้าที่สร้างโปรตีน Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) RANKL มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสลายกระดูกของเซลล์ osteoclasts อีกทั้งเซลล์ osteoclasts จะมีการทำงานกับโปรตีนตัวรับ 2 ชนิด คือ Receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) และ osteoprotegerin (OPG) เซลล์ osteoblasts มีโปรตีน RANK ligand (RANKL) อยู่ที่ยื่อหุ้มผิวตลอดเวลา และหลั่งออกสู่เซลล์ osteoclasts โปรตีน RANKL นี้เกิดการจับกับโปรตีนตัวรับที่เข้าคู่กัน (cognate receptor) คือ RANK ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ osteoclasts ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการเจริญของเซลล์และเกิดการเปลี่ยนสภาพจากเซลล์ osteoclasts progenitor ไปเป็น เซลล์ osteoclasts ในที่สุด ทำให้มีการสลายเซลล์กระดูกขึ้น สำหรับโปรตีน OPG จะคอยขัดขวางการจับกันระหว่าง RANKL และ RANK ดังนั้นจึงทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการ bone turnover ในระดับเซลล์การสูญเสียกระดูกเป็นผลมาจากความไม่สม่ำเสมอกันระหว่างการทำงานของเซลล์ osteoclasts และ osteoblasts (สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก, 2553) (ดังรูปที่ 7) และในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาภาวะพหุสัณฐานที่ -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155) ทั้งสาม SNPs ดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงแอลลีลที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของ transcription factors นำไปสู่การแสดงออกของโปรตีน ซึ่งตำแหน่ง SNPs เหล่านี้เป็นตำแหน่งที่เพิ่งค้นพบทำให้การศึกษายังไม่เป็นที่แน่ชัดว่ากลไกของการเปลี่ยนแปลงของ SNPs มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนอย่างไร แต่จากการศึกษาของ Mencej-Bedrac และคณะ พบว่า SNPs *BsmI* และ *Cdx2* ในยีน *VDR* มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อค่าความหนาแน่นของกระดูกคอสะโพก (BMD-fn) ในหญิงวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรคกระดูกพรุน อีกทั้งยังพบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง SNPs K3N (OPG) และ -290C>T (ในยีน *TNFSF11*) กับค่าความหนาแน่นของกระดูกส่วนสันหลัง (BMD-ls) ในหญิงชาวสวาเกียวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรคกระดูกพรุนเช่นเดียวกันอีกด้วย (Mencej-Bedrac *et al.*, 2009) และ ศึกษาของ Mencej และคณะ พบว่าในกลุ่มตัวอย่างหญิงชาวสโลวาเนียวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรคกระดูกพรุน พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ SNPs -290C>T, -643C>T และ -693G>C กับค่าความหนาแน่นของกระดูกส่วนสันหลัง (BMD-ls) และ พบความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าความหนาแน่นของกระดูกคอสะโพก (BMD-fn) และ SNP -693G>C (Mencej *et al.*, 2008)



รูปที่ 6 ภาพจำลองโครโมโซมของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 13q14.11

(<http://www.genecards.org>)



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการทำงานของยีน *VDR* และ ยีน *TNFSF11*

ภาวะพหุสัณฐานของยีน (polymorphisms)

ภาวะพหุสัณฐานของยีน คือ ความแตกต่างของรูปแบบทางพันธุกรรมมากกว่า 1 แบบขึ้นไป ซึ่งความแตกต่างนี้เองจะเกิดขึ้นต้องมีความถี่ไม่น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด มักจะเกิดความหลากหลายของการเปลี่ยนแปลงในสายของดีเอ็นเอหรือความแตกต่างของเบสระหว่างสองโครโมโซม ณ ตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งชนิดของความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในจีโนมมนุษย์สามารถแบ่งออกได้ 3 อย่างดังนี้ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) , Variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism และ Single nucleotide polymorphisms (SNP) ในส่วนของ SNPs เป็นความแปรผันทางพันธุกรรมที่มีความคงที่สูงที่สุดและยังสามารถพบได้บ่อยที่สุด โดยพบว่า SNP ในทุก ๆ 1,000 เบส แต่จากข้อมูลของฐานข้อมูล SNPs ล่าสุด (SNP database ; dbSNPs) จะพบ SNP ได้ทุก ๆ 300-500 เบส โดยที่จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวโดยกระจายอยู่ทั่วจีโนม ทั้งส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็น

โปรตีน (coding region) และส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน (non-coding region) ซึ่งจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีน ปริมาณและการทำงานของโปรตีน หรืออาจไม่ส่งผลกระทบใดๆเลยก็เป็นได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ SNP บนสายของ DNA

แฮพโลไทป์ (SNP haplotype หรือ Haplotype block)

SNP haplotype คือ ชุดของแอลลีลหลาย ๆ ตำแหน่งที่อยู่ใกล้กันบนโครโมโซมเดียวกัน โดยที่ลักษณะของ SNP haplotype (ดังรูปที่ 2.11) ในจีโนมของมนุษย์นั้นจะมีการกระจายอยู่ทั่วไปเป็นกลุ่มซึ่งเรียกว่า haplotype block ถึงแม้ว่าในทางทฤษฎีจะสามารถมี SNP haplotype ณ บริเวณหนึ่งได้หลายแบบแต่ในความเป็นจริงแล้วกลับพบว่ามีเพียงไม่กี่แบบเท่านั้นในประชากร (common haplotype) และเนื่องจากแอลลีลของ SNP ที่อยู่ใกล้กันมีแนวโน้มที่จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันเป็นชุดๆโดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

แอลลีลของ SNPs หลายตำแหน่งจะแสดงออกในลักษณะที่มีการถ่ายทอดไปพร้อม ๆ กันโดยที่เราจะเรียก SNPs เหล่านี้ว่ามี linkage disequilibrium (LD) ต่อกันและกัน ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการศึกษาความสัมพันธ์ (association) ระหว่าง SNP กับลักษณะทางคลินิกต่างๆมากมาย การศึกษาในลักษณะนี้จำเป็นต้องทำการตรวจ SNPs หลายๆตำแหน่งที่อยู่ใกล้เคียงกัน แต่จากการศึกษาต่อมาจะแสดงให้เห็นว่าข้อมูลจาก SNP Haplotype สามารถจดจำจำนวน SNP ที่จำเป็นต้องตรวจได้ เนื่องจากปรากฏการณ์ linkage disequilibrium ที่เกิดกับ SNP ทุกตำแหน่งบน Haplotype ซึ่งถ้าทราบ SNP ในบางตำแหน่งบน Haplotype ก็จะสามารถทำนาย SNP ที่ควรเป็นในทุกๆตำแหน่งได้

การใช้ประโยชน์จาก SNP

1. การใช้ SNPs เพื่อวินิจฉัยโรคทางพันธุกรรม (disease-gene maker)
2. การใช้ SNPs เพื่อทำนายความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค (risk factor)
3. การใช้ SNPs ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมกับการตอบสนองต่อยาในแต่ละบุคคล
4. การใช้ SNPs ในงานวิจัยเชิงลึกระดับโมเลกุลของโปรตีนและยีนเพื่อพัฒนายาและการรักษาด้วยยีน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2548)

เทคนิคที่จะช่วยในการวิเคราะห์ ภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และ ยีน *TNFSF11*

ในการวิเคราะห์ภาวะพหุสัณฐาน ของยีน *VDR* และ ยีน *TNFSF11* โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกันในประชากรซึ่งจะถูกเรียกว่าชิ้นส่วน restriction fragment length polymorphisms หรือ RFLP โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้เองจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) ที่จุดตัดที่เป็นจุดจำเพาะของดีเอ็นเอ เมื่อมีภาวะพหุสัณฐานเอ็นไซม์ที่มีจำเพาะจะตัดดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวซึ่งจะมีทั้งตัดได้ ตัดไม่ได้ และทั้งตัดได้-ตัดไม่ได้บ้าง ซึ่งผลที่มีทั้ง 3 ลักษณะด้วยกันคือ homologous dominant heterozygous และ homologous recessive เทคนิคดังกล่าวสามารถใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมหรือโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากกลายพันธุ์ได้ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในงานวิจัยในครั้งนี้

บทที่ 3 วิธีการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาภาวะพหุสัณฐานของ ยีน VDR และ TNFSF11 ที่ส่งผลต่อโรคกระดูกพรุน โดยศึกษา ยีน VDR ที่ตำแหน่ง TaqI (rs731236) FokI (rs2228570) และ BsmI (rs1544410) และ ยีน TNFSF11 ที่ตำแหน่ง -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155) โดยการนำเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งอาศัยรูปแบบการตัดบริเวณจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดมาใช้ในการศึกษาเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับระหว่างประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนที่เป็นโรคกระดูกพรุนกับประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนที่ไม่ได้เป็นโรคกระดูกพรุน โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่าง

1.1 ตัวอย่างเลือดของประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนตั้งแต่ 6 เดือนเป็นต้นไปที่เป็นโรคกระดูกพรุน 105 ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยของอายุที่นำมาทดสอบประมาณ 75 ± 8.94 และอายุที่เริ่มหมดประจำเดือนประมาณ 50 ± 4.40 ค่าความหนาแน่นของมวลกระดูกสันหลัง (BMD Lumbar Spine) 0.71 ± 0.11 (g/cm^2) ค่า T-score (Lumbar Spine T-score) -2.59 ± 1.0 ค่าความหนาแน่นของมวลกระดูกสะโพก (BMD Total Hip) 0.61 ± 0.09 (g/cm^2) และ ค่า T-score (Total Hip T-score) -2.08 ± 0.81 ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาริบัติ และ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

1.2 ตัวอย่างเลือดของประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนตั้งแต่ 6 เดือนเป็นต้นไปที่ไม่ได้เป็นโรคกระดูกพรุน 132 ตัวอย่าง โดยมีค่าเฉลี่ยของอายุที่นำมาทดสอบประมาณ 63 ± 8.37 โดยคัดเลือกกลุ่มประชากรควบคุม ที่มีอายุ เพศ และเชื้อชาติใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาริบัติ โดยงานวิจัยในครั้งนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมเป็นที่เรียบร้อยแล้ว (เลขที่จริยธรรม ID 04-54-44 ย และ MTU-EC-OT-4-087/56 ตามลำดับ)

การคำนวณหาขนาดตัวอย่างในกรณีที่ไมทราบจำนวนประชากรโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$n = \left(\frac{Z^2}{4e^2} \right) (\text{ธีรวุฒิ เอกะกุล, 2543})$$

โดยกำหนดให้

n คือ ขนาดตัวอย่างที่จะได้จากการคำนวณโดยใช้สูตร

Z คือ ค่าที่ได้จากการเปิดตารางสถิติ Z โดยมีระดับความเชื่อมั่น 95 % เป็นค่า $Z = 1.96$

e คือ ค่าความคลาดเคลื่อน ที่ 10 % เป็นค่า $e = 0.10$

$$n = \left(\frac{1.96^2}{4(0.10)^2} \right) \approx 96.04$$

2. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเลือด
- lysis buffer 1
 - lysis buffer 2
 - 10 % SDS (20 mg/ml)
 - Protein Kinase K
- 2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดเลือด
- หลอดเซ้นตริฟิวก์ ขนาด 15 มิลลิลิตร
 - เครื่องปั่นเหวี่ยง (เครื่อง Centrifuge)
 - เครื่องผสมสารละลาย (เครื่อง Vortex)
 - อ่างควบคุมอุณหภูมิ (เครื่อง Water Baths)
- 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA
- Phenol : Chloroform : Isopropylalcohol ที่มีอัตราส่วน 25:24:1
 - 100 % เอทานอล (แช่เย็น)
 - 70 % เอทานอล (แช่เย็น)
 - 10 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$
 - น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ
- 2.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด DNA
- ถังมือยาง
 - ถาดหลุมวางหลอด Eppendorf
 - ไมโครปิเปตต์ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - ทิปไมโครปิเปตต์ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - หลอด eppendorf ขนาด 100 ไมโครลิตร 250 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร
 - เครื่องผสมสารละลาย (เครื่อง Vortex)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยง (เครื่อง Centrifuge)
 - เครื่อง NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer
 - ตู้ดูดอากาศ
- 2.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาภาวะพหุสัญญาณของยีน *VDR* และ *TNFSF11* โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP
- ถังมือยาง
 - ถาดหลุมวางหลอด Eppendorf

- ไมโครปิเปตต์ขนาด 2.5, 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - ทิปไมโครปิเปตต์ขนาด 10 , 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - หลอด Eppendorf ขนาด 100 ไมโครลิตร
 - เครื่องผสมสารละลาย (เครื่อง Vortex)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยง (เครื่อง Centrifuge)
 - เครื่องปลอดเชื้อสำหรับทำ PCR
 - ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน *TaqI* (rs731236) ใช้เอนไซม์ *TaqI*
 - ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน *FokI* (rs2228570) ใช้เอนไซม์ *FokI*
 - ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน *BsmI* (rs1544410) ใช้เอนไซม์ *BsmI*
 - ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน -290C>T (rs9525641) ใช้เอนไซม์ *MseI*
 - ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน -643C>T (rs9533156) ใช้เอนไซม์ *TspRI*
 - ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน -693G>C (rs9533155) ใช้เอนไซม์ *BsaI*
 - อ่างควบคุมอุณหภูมิ (เครื่อง Water Baths)
- 2.6 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis
- 1X TBE
 - ชุดเครื่องมือสำหรับทำ Agarose gel electrophoresis
 - ขวดรูปชมพู่
 - ผง Agarose
 - เครื่องชั่งน้ำหนัก
 - ถาดพลาสติก
 - Ethidium Bromide (EtBr) หรือ SeeNa Nucleic Acid Stain
 - 6X Blue/orange loading dry หรือ 6X Bromothymol blue
 - เครื่อง Gel Documentation
- 2.7 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR-RFLP
- 10x Taq polymerase buffer
 - dNTP
 - Primer Forward และ Primer Reverse
 - Unit Taq DNA polymerase
 - Q-Solution
 - dH₂O
 - buffer NEB
 - Restriction enzyme *TaqI*, *FokI*, *BsmI*, *MseI*, *TspRI* และ *BsaI*

3. วิธีการทดลอง

3.1 คำนวณค่าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

3.1.1 ศึกษาลำดับเบสบนยีน *VDR* ที่ตำแหน่ง *TaqI* (rs731236) *FokI* (rs2228570) และ *BsmI* (rs1544410) และ ยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155) โดยการค้นหาโดยใช้เว็บไซต์ คือ www.NCBI.nih.gov และ www.ensemble.org ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1.2 ศึกษาการออกแบบ primer ที่จำเพาะเจาะจงต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง *TaqI* (rs731236) (Vilarino *et al.*, 2011) *FokI* (rs2228570) และ *BsmI* (rs1544410) ของยีน *VDR* และ ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155) ของยีน *TNFSF11* (Bedrac *et al.*, 2009)

การออกแบบ Primer ก่อนอื่นต้องทราบก่อนว่าตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานบริเวณที่ต้องการอยู่ตรงส่วนใดของบริเวณยีน จากนั้นจึงออกแบบ Primer โดยออกแบบทั้ง Primer Forward และ Primer Reverse และ คำนวณ ค่า % GC, ค่า TM ที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Oligo Calc ผ่านเว็บไซต์ (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html) โดย Primer ที่ออกแบบได้ในแต่ละตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานมี ดังตารางที่ 1

SNPs	Primer Sequence	Product Size (bp)
<i>TaqI</i> (rs731236)	F : TGGTGGGATTGAGCAGTGAG R : GTACTGCTTGGAGTGCTCCT	249 bp
<i>BsmI</i> (rs1544410)	F : AACCTGAAGGGAGACGTAGCA R : TTGTACCCTGCCCGCAAGAAA	283 bp
<i>FokI</i> (rs2228570)	F : ACCAAGGATGCCAGCTGG R : GCTTCTTCTCCCTCCCTTTC	266 bp
-693G>C (rs9533155)	F : GCCACAGTTCTGAATAGAGG R : GGATAAGGATTGCACCTCAG	498 bp
-643C>T (rs9533156)	F : GCCACAGTTCTGAATAGAGG R : GGATAAGGATTGCACCTCAG	498 bp
-290C>T (rs9525641)	F : ATCCTAAGGAGGAAACCGAGAC R : GGAGGTCCAAGAGATGGGTTTA	146 bp

ตารางที่ 1 Primer ที่ออกแบบได้ในแต่ละตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน

3.2 เขียนขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์

เขียนขออนุมัติจากคณะกรรมการบริหารการดำเนินงานพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี และ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ (เลขที่จริยธรรม ID 04-54-44 ย และ MTU-EC-OT-4-087/56 ตามลำดับ)

3.3 การศึกษาภาวะพิษฐานโดยวิธี PCR-RFLP

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดโดยวิธี phenol/chloroform extraction

- 3.3.1.1 นำตัวอย่างเลือดมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3300 rpm เวลา 10 นาที
- 3.3.1.2 ดูด Buffy coat หรือ ใช้ทั้งตัวอย่างเลือดทั้งหมดมาปั่น (ในกรณีที่ตัวอย่างน้อย)
- 3.3.1.3 เติม lysis buffer 1 ต่อ buffy coat ในอัตราส่วน 10 : 1 ผสมให้เข้ากัน
- 3.3.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยง 1000 g เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง
- 3.3.1.5 เติม lysis buffer 1 ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน
- 3.3.1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 g เป็นเวลา 8 นาที เป็นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง
- 3.3.1.7 ใส่ lysis buffer 1 และนำไปปั่นเหวี่ยงไปเรื่อยๆจนเม็ดเลือดแดงหายไป
- 3.3.1.8 เติม lysis buffer 2 950 μ l + 10 % SDS 50 μ l (20 mg/ml) จากนั้นเติม Protein Kinase K 20 μ l ผสมให้เข้ากัน
- 3.3.1.9 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 3.3.1.10 เติม Phenol : Chloroform : Isopropylalcohol ที่มีอัตราส่วน 25:24:1 ในอัตราส่วน 1:1 หรือ 1 เท่า ผสมให้เข้ากันในหลอด 1.5 ml
- 3.3.1.11 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูสารส่วนบนใสลงในหลอดใหม่
- 3.3.1.12 เติม 100 % เอทานอล (แช่เย็น) 1 เท่า และ 10 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (NH_4OAc) 0.5 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ
- 3.3.1.13 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง

3.3.1.14 เติม 70 % เอทานอล (แช่เย็น) 500 μ l

3.3.1.15 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

3.3.1.16 เทเอทานอลหลังจากนำไปปั่นเหวี่ยงทิ้ง airdry (อย่าให้แห้งเกินไป)

3.3.1.17 ละลายดีเอ็นเอใน dH_2O 20-50 μ l บ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3.1.18 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 การศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และ *TNFSF11* (SNPs ของยีน *VDR* คือ *TaqI* (rs731236) *FokI* (rs2228570) และ *BsmI* (rs1544410) and SNPs ของยีน *TNFSF11* คือ -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155) โดยวิธี Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

3.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการโดยออกแบบ primer คร่อมตำแหน่งของยีน *VDR* และ *TNFSF11* ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน *TaqI* (rs731236) , *FokI* (rs2228570) และ *BsmI* (rs1544410) ของยีน *VDR* และ ที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐาน -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155) ของยีน *TNFSF11* ตามลำดับ

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์จะประกอบไปด้วยสารละลาย (QIAGEN[®]) ทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย

1. 10x Taq Polymerase buffer
2. dNTP
3. Primer (Forward and Reverse)
4. Unit Taq DNA polymerase
5. Q-Solution
6. dH_2O
7. DNA

โดยที่แต่ละ SNPs จะมีความเข้มข้นของสารประกอบที่แตกต่างกัน ดังนี้

สารประกอบ	ความเข้มข้นของแต่ละสปี					
	rs731236	rs2228570	rs1544410	rs9525641	rs9533156	rs9533155
10x Taq Polymerase buffer	1.25 mM	1.125 mM	2.5 mM	2.25 mM	2.5 mM	2.5 mM
dNTP	0.2 mM	0.2 mM	0.8 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
Primer (Forward and Reverse)	Each 0.2 μ M	Each 0.2 μ M	Each 0.2 μ M	Each 0.2 μ M	Each 0.5 μ M	Each 0.5 μ M
Taq DNA polymerase	1U	1U	2U	0.75U	0.75U	0.75U
5X Q-Solution	1X	1X	1X	1X	1X	1X
dH ₂ O						
DNA	50 ng/ μ l	50 ng/ μ l	50 ng/ μ l	50 ng/ μ l	50 ng/ μ l	50 ng/ μ l

ตารางที่ 2 ตารางความเข้มข้นของสารประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละ SNPs และ PCR Cycle condition ตั้งค่าตามลำดับดังต่อไปนี้

PCR Cycle Condition	SNPs In <i>VDR</i> and <i>TNFSF11</i>					
	rs731236	rs2228570	rs1544410	rs9525641	rs9533156	rs9533155
Initial denaturation	95 °C 5 min	95 °C 5 min	95 °C 15 min	95 °C 10 min	95 °C 5 min	95 °C 10 min
Denaturation	95 °C 30 sec	95 °C 30 sec	95 °C 1 min	95 °C 45 sec	95 °C 30 sec	95 °C 20 sec
Annealing	59.9 °C 30 sec	45 °C 30 sec	60.8 °C 1 min	61.4 °C 45 sec	59.9 °C 30 sec	58 °C 20 sec
Extension	72 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 1 min	72 °C 45 sec	72 °C 30 sec	72 °C 20 sec
Final extension	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min	72 °C 7 min

ตารางที่ 3 สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละ SNPs

3.4.2 การใช้ restriction enzyme ในการตรวจหา SNPs ซึ่งอาศัยรูปแบบจำเพาะระหว่างบริเวณจุดตัดของเอนไซม์และลำดับเบสของยีน *VDR* ที่ SNPs *TaqI* (rs731236) *FokI* (rs2228570) *BsmI* (rs1544410) และ ยีน *TNFSF11* ที่ SNPs -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155)

ในปฏิกิริยาของการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะประกอบไปด้วย

1. Buffer 4 of NEB OR Smart Cut
2. Restriction enzyme (NEW ENGLAND Biolabs[®] Inc.)
3. dH₂O
4. PCR product

โดยที่แต่ละ SNP จะมีปริมาณสารประกอบที่แตกต่างกัน ดังนี้

Condition	SNPs In <i>VDR</i> and <i>TNFSF11</i>					
	rs731236	rs2228570	rs1544410	rs9525641	rs9533156	rs9533155
	Restriction enzyme					
	<i>TaqI</i>	<i>FokI</i>	<i>BsmI</i>	<i>MseI</i>	<i>TspRI</i>	<i>BsaJI</i>
Buffer 4	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Enz.	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl
dH ₂ O	0.8 µl	0.8 µl	0.8 µl	0.8 µl	0.8 µl	0.8 µl
PCR Product	8 µl	8 µl	8 µl	8 µl	5 µl	8 µl
Temperature For Incubate	65 °C 16 hrs.	37 °C 16 hrs.	65 °C 16 hrs.	37 °C 16 hrs.	65 °C 16 hrs.	60 °C 16 hrs.

ตารางที่ 4 สารประกอบของเอนไซม์ตัดจำเพาะและอุณหภูมิในการบ่ม

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* ที่ SNPs *TaqI* (rs731236) *FokI* (rs2228570) *BsmI* (rs1544410) และ ยีน *TNFSF11* ที่ SNPs -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155)

1. ตำแหน่ง *TaqI* (rs731236) ใช้ restriction enzyme คือ *TaqI* ซึ่งจะจดจำนิวคลีโอไทด์ TCGA เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ minor allele (allele C) เอนไซม์ *TaqI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ ในขณะที่ major allele (allele T) เอนไซม์ *TaqI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้

2. ตำแหน่ง *FokI* (rs2228570) ใช้ restriction enzyme คือ *FokI* ซึ่งจะจดจำนิวคลีโอไทด์ GGATG(N)₉ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ minor allele (allele T) เอนไซม์ *FokI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ ในขณะที่ major allele (allele C) เอนไซม์ *FokI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้
3. ตำแหน่ง *BsmI* (rs1544410) ใช้ restriction enzyme คือ *BsmI* ซึ่งจะจดจำนิวคลีโอไทด์ NG[^] CATTG เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ major allele (allele G) เอนไซม์ *BsmI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ ในขณะที่ minor allele (allele A) เอนไซม์ *BsmI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้
4. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ -290C>T (rs9525641) ใช้ restriction enzyme คือ *MseI* ซึ่งจะจดจำนิวคลีโอไทด์ T[^] TAA เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ major allele (allele T) เอนไซม์ *MseI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ ในขณะที่ minor allele (allele C) เอนไซม์ *MseI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้
5. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ -643C>T (rs9533156) ใช้ restriction enzyme คือ *TspRI* ซึ่งจะจดจำนิวคลีโอไทด์ CASTG(N)₂[^] เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ major allele (allele T) เอนไซม์ *TspRI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ ในขณะที่ minor allele (allele C) เอนไซม์ *TspRI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้
6. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ -693G>C (rs9533155) ใช้ restriction enzyme คือ *BsaJI* ซึ่งจะจดจำนิวคลีโอไทด์ C[^] CNNGG เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ major allele (allele C) เอนไซม์ *BsaJI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ ในขณะที่ minor allele (allele G) เอนไซม์ *BsaJI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้

แสดงตำแหน่งบริเวณภาวะพหุสัณฐานของ *TaqI* (rs731236)

TGGTGGGATTGAGCAGTGAGGGGCCAGCTGAGAGCTCCTGTGCCTTCTTCTATCCC
 CGTGCCACAGATCGTCCTGGGGTGCAGGACGCCGCGCTGATT/CGAGGCCATCCAGGA
 CCGCCTGTCCAACACACTGCAGACGTACATCCGCTGCCGCCACCCGCCCGGGCAGCC

ACCTGCTCTATGCCAAGATGATCCAGAAGCTAGCCGACCTGCGCAGCCTCAATGAGGAG
CACTCCAAGCAGTAC

แสดงตำแหน่งบริเวณภาวะพหุสัณฐานของ *FokI* (rs2228570)

ACCAAGGATGCCAGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCTCTGACCGTGGCCTGCTTGCTG
 TTCTTACAGGGAC/TGGAGGCAATGGCGGCCAGCACTTCCCTGCCTGACCCTGGAGACTT
 TGACCGAACGTGCCCCGGATCTGTGGGGTGTGTGGAGACCGAGCCACTGGCTTTCACT
 TCAATGCTATGACCTGTGAAGGCTGCAAAGGCTTCTTCAGGTGAGCCCTCCTCCCAGGCT
CTCCCCAGTGAAAGGGAGGGAGAAGAAGC

แสดงตำแหน่งบริเวณภาวะพหุสัณฐานของ *BsmI* (rs1544410)

AACCTGAAGGGAGACGTAGCAAAGGAGACACAGATAAGGAAATACCTACTTTGCTGGT
 TTGCAGAGCCCCTGTGGTGTGTGGACGCTGAGGTGCCCTCACTGCCCTTAGCTCTGCC
 TTGCAGAGTGTGCAGGCGATTTCGTAGGGGGGATTCTGAGGAACTAGATAAGCAGGGTTC
 CTGGGGCCACAGACAGGCCTGCG/ACATTCCAATACTCAGGCTCTGCTCTTGCCTGAAC
TGGGCTCAACATTCCTGTTATTTGAGGTTTCTTGCGGGCAGGGTACAA

แสดงตำแหน่งบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -290C>T (rs9525641)

ATCCTAAGGAGGAAACCGAGACTCCAGGATGTGAAGTCCCTTCTCTACCAAAGTGAATG
 GATGCAGGAGGAATGTCTGAGGTGCAATCCTTATCCTTTAGCAAAGGTGTCCTCTGCGTC
 TTCT/CTTAACCCATCTCTTGGACCTCC

แสดงตำแหน่งบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -643C>T (rs9533156)

GCCACAGTTCTGAATAGAGGTTTTTAAAAAGCCCTAGCAAGGTTTCTTTAGCAATGAAAC
 TAACATTTAACTGTATCATCAGCTTCGTGTTACATCTCTTTCCCTGACTGTTGGGTGAGCC
 CTCCTCGGATGCTTGCTTCTGGCTACACGCCCTTTACCCTTTTCTCTGCACT/CGTTTC

ATCTTTATAAAGTCAGAGTTGGTGTCTATAGGCTCTCTACTGCCACATTCAAGACCTGCC
 TCGCTCAATGTCACCTTCAAGATGCAGAAATAGGGATTTGGGAAGGGGATTGTGAAATTT
 TCGAAGTCTTCCAAAATACTTTGAGAACTATATTTGGAAGCACTTTGGGGGGAGAGGTT
 GGACAGGAAGGGTCTTCAGAGATCATCAAATTTAACTTTCTAAATCCTAAGGAGGAAACC
 GAGACTCCAGGATGTGAAGTCCCTTCTCTACCAAAGTGAATGGATGCAGGAGGAATGT
CTGAGGTGCAATCCTTATCC

แสดงตำแหน่งบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -693G>C (rs9533155)

GCCACAGTTCTGAATAGAGGTTTTTAAAAAGCCCTAGCAAGGTTTCTTTAGCAATGAAAC
 TAACATTTAACTGTATCATCAGCTTCGTGTTACATCTCTTTCTGACTGTTGGGTGAGCC
 CTC/GCTCGGATGCTTGCTTCTGGCTACACGCCCTTTACCCTTTTCTCTGCACTGTTTTTC
 ATCTTTATAAAGTCAGAGTTGGTGTCTATAGGCTCTCTACTGCCACATTCAAGACCTGCC
 TCGCTCAATGTCACCTTCAAGATGCAGAAATAGGGATTTGGGAAGGGGATTGTGAAATTT
 TCGAAGTCTTCCAAAATACTTTGAGAACTATATTTGGAAGCACTTTGGGGGGAGAGGTT
 GGACAGGAAGGGTCTTCAGAGATCATCAAATTTAACTTTCTAAATCCTAAGGAGGAAACC
 GAGACTCCAGGATGTGAAGTCCCTTCTCTACCAAAGTGAATGGATGCAGGAGGAATGT
CTGAGGTGCAATCCTTATCC

3.5 ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาวิเคราะห์บน 8% Polyacrylamide gel ย้อมด้วย SYBr green หรือ 3% Agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide โดยแปลผลโดยใช้เครื่อง Storm™ fluorescence and phosphorimager (GE Heath Care) หรือ เครื่อง Gel Documentation (SynGene) ในการวิเคราะห์ผลตามลำดับ

3% Agarose gel มีสารประกอบดังนี้

1. Agarose 1.5 g.
2. 1X TBE 50 ml.

นำส่วนผสมดังกล่าวผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องไมโครเวฟเพื่อละลายเจลให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม Ethidium bromide ปริมาตร 1.5 µl.

8% Polyacrylamide gel มีสารประกอบดังนี้

- | | |
|------------------------|---------|
| 1. Polyacrylamide 19:1 | 2 ml. |
| 2. 10X TBE | 1 ml. |
| 3. H ₂ O | 7 ml. |
| 4. APS | 100 ml. |
| 5. Temed | 10 µl. |

นำส่วนผสมดังกล่าวผสมให้เข้ากัน

สำหรับการอ่านผลเจลโดยใช้เครื่อง Gel Documentation (SynGene) และ เครื่อง Storm™ fluorescence and phosphorimager (GE Heath Care) เพื่อศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* และ *TNFSF11*

3.5.1 PCR Product ของยีน *VDR* ที่ตำแหน่ง SNP *TaqI* (rs731236) โดยใช้เอนไซม์ *TaqI* โดยใช้เครื่อง Storm™ fluorescence and phosphorimager (GE Heath Care) ในการวิเคราะห์ผล

- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 249 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (TT)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 148 bp และ 101 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (CC)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 249 bp 148 bp และ 101 bp จะรายงานผลเป็น heterozygous (TC)

3.5.2 PCR Product ของยีน *VDR* ที่ตำแหน่ง SNP *FokI* (rs2228570) โดยใช้เอนไซม์ *FokI* โดยใช้เครื่อง Storm™ fluorescence and phosphorimager (GE Heath Care) ในการวิเคราะห์ผล

- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 266 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (CC)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 184 bp และ 63 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (TT)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 266 bp 184 bp และ 63 bp จะรายงานผลเป็น heterozygous (CT)

3.5.3 PCR Product ของยีน *VDR* ที่ตำแหน่ง SNP *BsmI* (rs1544410) โดยใช้เอนไซม์ *BsmI* โดยใช้เครื่อง Storm™ fluorescence and phosphorimager (GE Heath Care) ในการวิเคราะห์ผล

- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 283 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (AA)

- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 200 bp และ 83 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (GG)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอขนาด 283 bp 200 bp และ 83 bp จะรายงานผลเป็น heterozygous (GA)

3.5.4 PCR Product ของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่งบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -290C>T (rs9525641) โดยใช้เอนไซม์ *MseI* โดยใช้เครื่อง Storm™ fluorescence and phosphorimager (GE Health Care) ในการวิเคราะห์ผล

- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 146 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (CC)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 124 bp และ 22 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (TT)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 146 bp 124 bp และ 22 bp จะรายงานผลเป็น heterozygous (TC)

3.5.5 PCR Product ของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่งบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -643C>T (rs9533156) โดยใช้เอนไซม์ *TspRI* โดยใช้เครื่อง Gel Documentation (SynGene) ในการวิเคราะห์ผล

- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 498 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (CC)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 322 bp และ 176 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (TT)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 498 bp 322 bp และ 176 bp จะรายงานผลเป็น heterozygous (TC)

3.5.6 PCR Product ของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่งบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ -693G>C (rs9533155) โดยใช้เอนไซม์ *BsaI* โดยใช้เครื่อง Gel Documentation (SynGene) ในการวิเคราะห์ผล

- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 498 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (GG)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 375 bp และ 123 bp จะรายงานผลเป็น homozygous (CC)
- ในกรณีที่แถบดีเอ็นเอมีขนาด 498 bp 375 bp และ 123 bp จะรายงานผลเป็น heterozygous (CG)

3.6 สุ่มเลือกตัวอย่างเพื่อยืนยันลำดับเบส (Direct sequencing) โดย SNP ละ 12 ตัวอย่าง โดยการนำ PCR Product ที่ได้มา purify โดยใช้ PCR purification Kits จากบริษัท (QIAGEN, Germany) จากนั้นจึงส่งไปยัง AITbiotech จำกัด ประเทศ สิงคโปร์

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ศึกษาหาความสัมพันธ์และรูปแบบภาวะพหุสัณฐานของยีน VDR ที่ SNPs *TaqI* (rs731236) *FokI* (rs2228570) *BsmI* (rs1544410) และ ยีน *TNFSF11* ที่ SNPs -290C>T (rs9525641) -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155) ที่มีผลต่อความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนด้วยวิธีทางสถิติ

4.1 การวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) โดยกำหนดให้ P value > 0.05 จะถือว่าอยู่ในสมดุลของ Hardy Weinberg equilibrium มี 2 วิธีดังนี้

4.1.1 การวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) โดยใช้โปรแกรมจาก Web site : <http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>

4.1.2 การวิเคราะห์ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) โดยใช้ Chi-square

โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

Genotype	Frequency	
GG	100	m1
AG	24	m2
AA	3	m3

G allele frequency	0.8819	p	$\frac{2m_1+m_2}{2*(m_1+m_2+m_3)}$
A allele frequency	0.1181	q	$\frac{m_2+2m_3}{2*(m_1+m_2+m_3)}$
1.00		p+q	

โดย m แสดงถึงจีโนไทป์

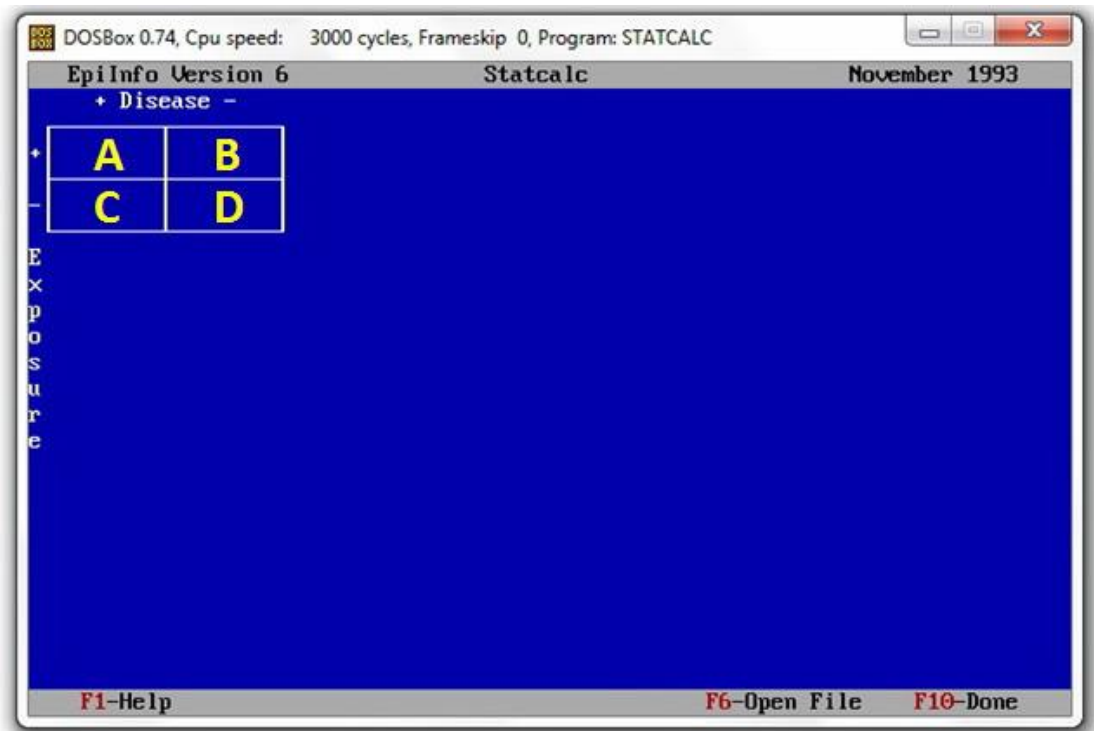
Prob(GG)	0.778	p^2
Prob(AG)	0.208	$2pq$
Prob(AA)	0.014	q^2
Total	1.0000	$p^2 + 2pq + q^2$

Genotype	Observed (O)	Expected (E)	Different (O-E)	Chi-square $(O-E)^2/E$
GG	100	98.806	1.194	0.014
AG	24	26.416	-2.416	0.221
AA	3	1.778	1.222	0.840
total	127	127	0.000	1.075

รูปที่ 8 ผลการคำนวณ Hardy-Weinberg equilibrium โดยใช้ Chi-square

จากภาพที่ 8 ได้ค่า Chi-square เท่ากับ 1.075 เมื่อเอาไปเปรียบเทียบกับตาราง Chi-square โดยกำหนดให้ degree of freedom (d.f.) มีค่าเท่ากับ 1 และ P value > 0.05 ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับตารางแล้วปรากฏว่าอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium

4.2 Single SNP-Disease association analysis โดยใช้ contingency tables เพื่อวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ของจีโนไทป์กับการเกิดโรค และ ความสัมพันธ์ระหว่างแอลลีลกับการเกิดโรค โดยใช้โปรแกรม Statcalc (Epi Info™) โดยเลือก table(2 x 2 , 2 x n)



รูปที่ 9 ตาราง contingency tables โดยใช้โปรแกรม Statcalc

- A คือ ความถี่ของแอลลีลที่เป็นปัจจัยเสี่ยง ที่ทำให้เกิดโรค
 B คือ ความถี่ของแอลลีลที่เป็นปัจจัยเสี่ยง ที่ไม่ทำให้เกิดโรค
 C คือ ความถี่ของแอลลีลที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยง ที่ทำให้เกิดโรค
 D คือ ความถี่ของแอลลีลที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยง ที่ไม่ทำให้เกิดโรค

ซึ่งการคำนวณหาค่า odd ratios เป็นการหาค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรตัวที่แต่ละตัวเป็นตัวแปรจัดกลุ่มที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อเปรียบเทียบระหว่าง SNP ที่สนใจมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคหรือไม่ และ มากน้อยเพียงใด โดยสามารถแปลค่า odd ratios ได้ดังนี้

- = 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษานั้นไม่สัมพันธ์กับ SNP ที่สนใจ
- > 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษานั้นสัมพันธ์กับการ SNP ที่สนใจเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่เป็นโรค
- < 1 การมีปัจจัยเสี่ยงนั้น ทำให้ไม่เกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา

และทุกครั้งที่ศึกษาค่า odd ratios ในแง่ปฏิบัติก็มักจะสุมมาเพียงครั้งเดียว จึงต้องมีการรายงานความน่าเชื่อถือเป็นช่วงๆ โดยกำหนดให้ค่า 95% confident intervals (95% CI) ต้องไม่คร่อมค่า 1 และ ค่า P value < 0.05 จึงถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3 Haplotype analysis โดยวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม plink version 1.07 (Purcell *et al.*, 2007) (ตามภาคผนวก)

- เพื่อหาความสัมพันธ์ของ
1. Allelic association test
 2. Model of inheritance analysis
 3. Condition analysis of SNP
 4. Haplotype analysis



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 4 ผลการศึกษา

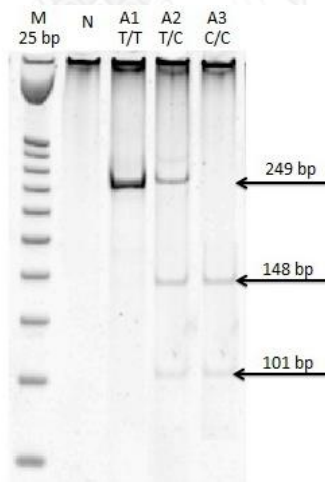
1. ผลการศึกษากลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา

1.1 คัดเลือกตัวอย่างเลือดของประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนตั้งแต่ 6 เดือนเป็นต้นไปที่เป็นโรคกระดูกพรุนและ จำนวน 105 ตัวอย่าง โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของอายุที่นำมาทดสอบ 75 ± 8.94 และอายุที่เริ่มหมดประจำเดือน 50 ± 4.40

1.2 คัดเลือกตัวอย่างเลือดของประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนตั้งแต่ 6 เดือนเป็นต้นไปที่ไม่ได้เป็นโรคกระดูกพรุน 132 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกกลุ่มประชากรควบคุม ที่มีอายุ เพศ และเชื้อชาติใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของอายุที่นำมาทดสอบ 63 ± 8.37

2. ผลจากการศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีนจากการตรวจหา SNPs โดยวิธี PCR-RFLP

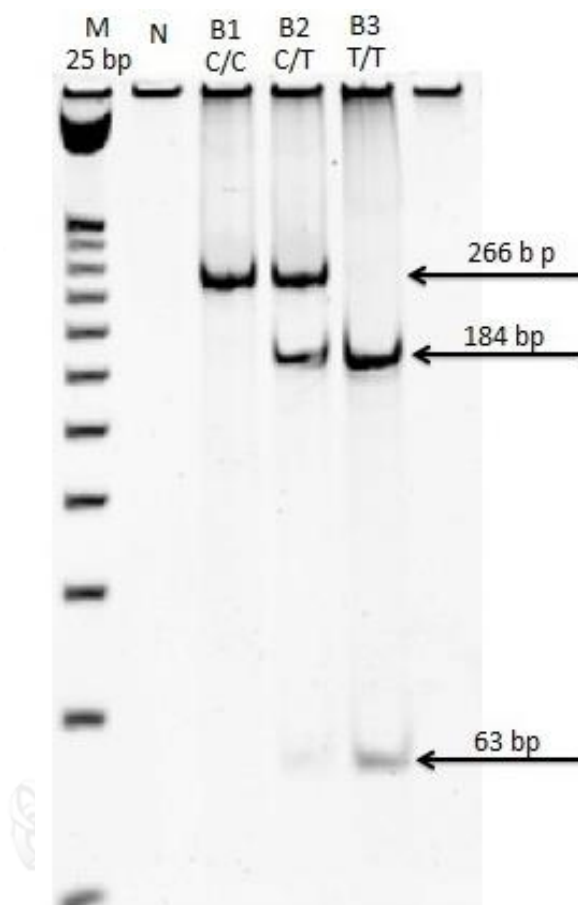
2.1 ตำแหน่ง SNP *TaqI* (rs731236) โดยใช้ restriction enzyme *TaqI* เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ minor allele (allele C) มีเอนไซม์ *TaqI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ และในขณะที่ major allele (allele T) เอนไซม์ *TaqI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้ (ดังรูปที่ 10)



รูปที่ 10 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP *TaqI* (rs731236)

เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *TaqI* โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker 25 bp และ N คือ negative control (dH₂O) จากภาพปรากฏแถบดีเอ็นเอ A1 (T/T) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น T/T มีขนาด 249 bp แถบดีเอ็นเอ A2 (T/C) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น T/C มีขนาด 249 bp , 148 bp และ 101 bp และแถบดีเอ็นเอ A3 (C/C) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น C/C มีขนาด 148 bp และ 101 bp

2.2 ตำแหน่ง SNP *FokI* (rs2228570) โดยใช้ restriction enzyme *FokI* เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ minor allele (allele T) มีเอนไซม์ *FokI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ และในขณะที่ major allele (allele C) เอนไซม์ *FokI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้ (ดังรูปที่ 11)

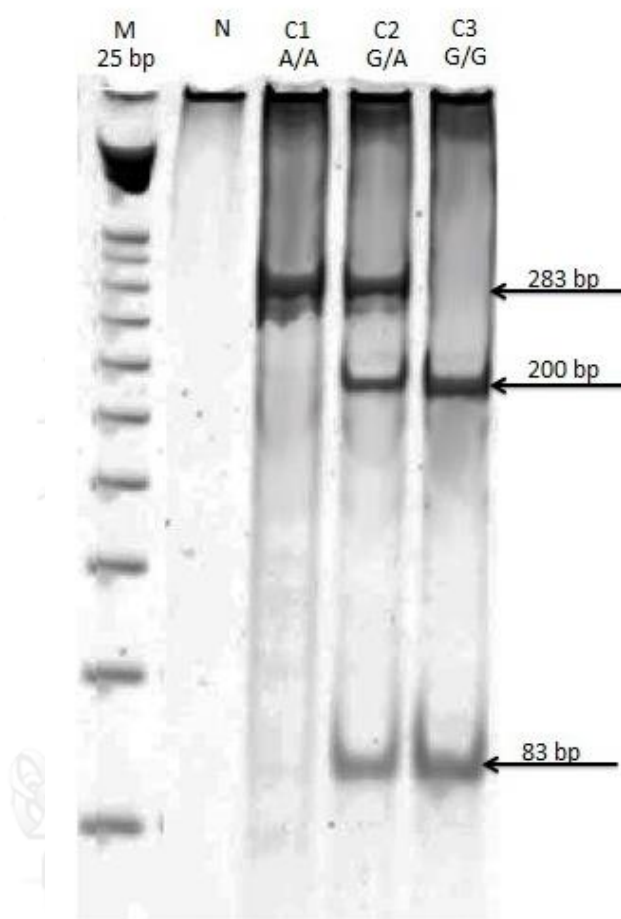


จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP *FokI* (rs2228570)

เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *FokI* โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker 25 bp และ N คือ negative control (dH₂O) จากภาพปรากฏแถบดีเอ็นเอ B1 (C/C) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น C/C มีขนาด 266 bp แถบดีเอ็นเอ B2 (C/T) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น C/T มีขนาด 266 bp , 184 bp และ 63 bp และแถบดีเอ็นเอ B3 (T/T) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น T/T มีขนาด 184 bp และ 63 bp

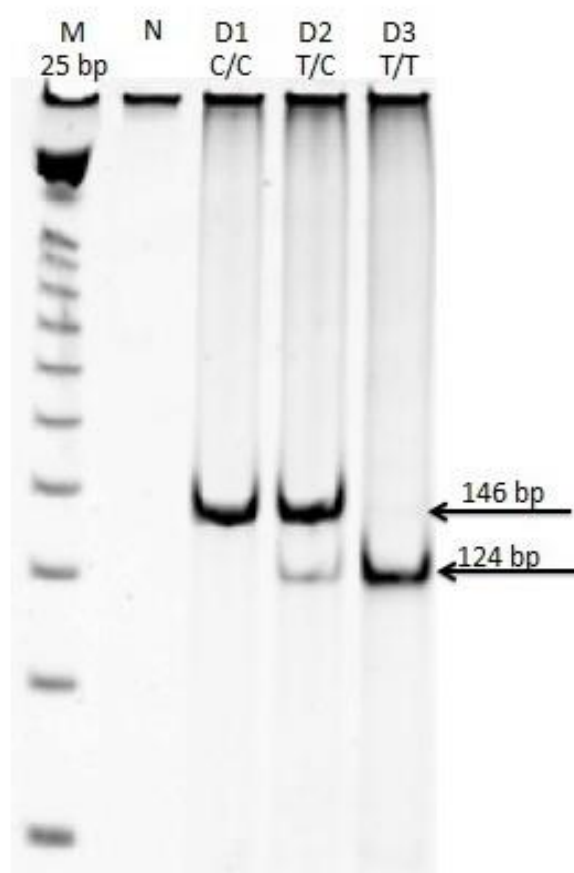
2.3 ตำแหน่ง SNP *BsmI* (rs1544410) โดยใช้ restriction enzyme *BsmI* เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ major allele (allele G) มีเอนไซม์ *BsmI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ และในขณะที่ minor allele (allele A) เอนไซม์ *BsmI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้ (ดังรูปที่ 12)



รูปที่ 12 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP *BsmI* (rs1544410)

เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *BsmI* โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker 25 bp และ N คือ negative control (dH_2O) จากภาพปรากฏแถบดีเอ็นเอ C1 (A/A) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น A/A มีขนาด 283 bp แถบดีเอ็นเอ C2 (A/G) คือ ตัวอย่างที่มีลักษณะจีโนไทป์เป็น A/G จะมีขนาด 283 bp , 200 bp และ 83 bp และแถบดีเอ็นเอ C3 (G/G) คือ ตัวอย่างที่มีลักษณะจีโนไทป์เป็น G/G จะมีขนาด 200 bp และ 83 bp

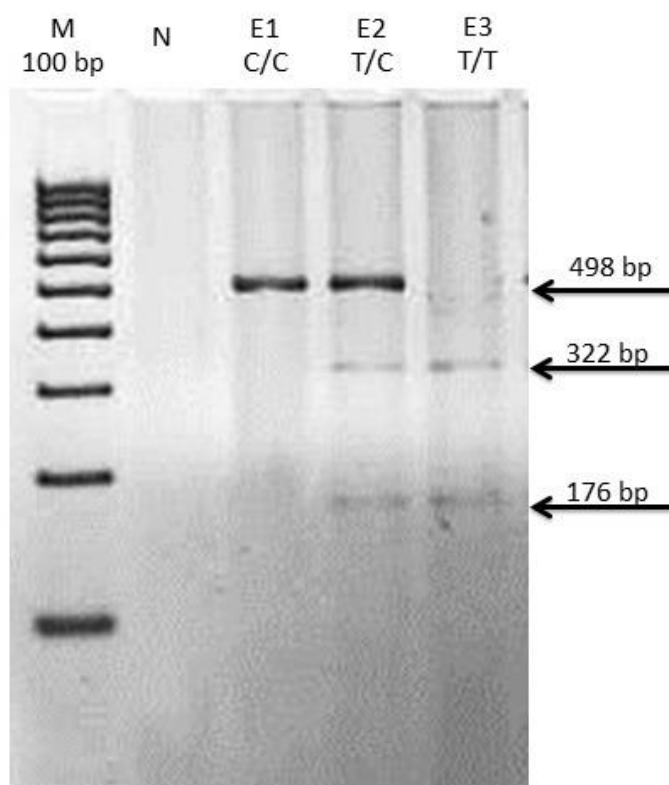
2.4 ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641) โดยใช้ restriction enzyme *MseI* เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ major allele (allele T) เอนไซม์ *MseI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ และในขณะที่ minor allele (allele C) เอนไซม์ *MseI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้ (ดังรูปที่ 13)



รูปที่ 13 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641)

เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *MseI* โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker 25 bp และ N คือ negative control (dH₂O) จากภาพปรากฏแถบดีเอ็นเอ D1 (C/C) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น C/C มีขนาด 146 bp แถบดีเอ็นเอ D2 (T/C) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น T/C มีขนาด 146 bp , 124 bp และแถบดีเอ็นเอ D3 (T/T) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น T/T มีขนาด 124 bp

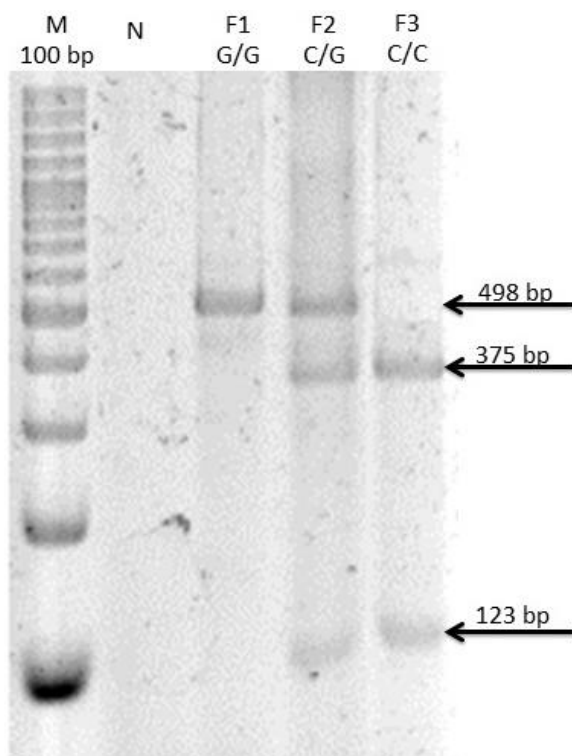
2.5 ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156) โดยใช้ restriction enzyme *TspRI* เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ major allele (allele T) เอนไซม์ *TspRI* ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ และในขณะที่ minor allele (allele C) เอนไซม์ *TspRI* ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้ (ดังรูปที่ 14)



รูปที่ 14 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP -643C>T(rs9533156)

เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *TspRI* โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker 25 bp และ N คือ negative control (dH₂O) จากภาพปรากฏแถบดีเอ็นเอ E1 (C/C) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น C/C มีขนาด 498 bp แถบดีเอ็นเอ E2 (T/C) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น T/C มีขนาด 498 bp , 322 bp และ 176 bp และแถบดีเอ็นเอ E3 (T/T) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น T/T มีขนาด 322 bp และ 176 bp

2.6 ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155) โดยใช้ restriction enzyme *Bsa*II เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของ SNP โดยที่ major allele (allele C) เอนไซม์ *Bsa*II ตรงกับจุดจดจำจึงสามารถตัดได้ และในขณะที่ minor allele (allele G) เอนไซม์ *Bsa*II ไม่ตรงกับจุดจดจำจึงทำให้ไม่สามารถตัดได้ (ดังรูปที่ 15)

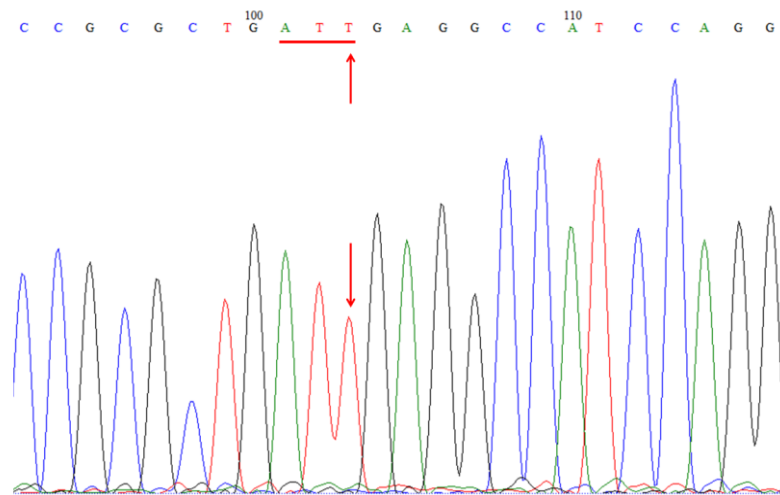


รูปที่ 15 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง SNP -693G>C(rs9533155) เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *Bsa*II โดยกำหนดให้ M คือ DNA marker 25 bp และ N คือ negative control (dH₂O) จากภาพปรากฏแถบดีเอ็นเอ F1 (G/G) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น G/G มีขนาด 498 bp แถบดีเอ็นเอ F2 (C/G) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น C/G มีขนาด 498 bp , 375 bp และ 123 bp และแถบดีเอ็นเอ F3 (C/C) มีลักษณะจีโนไทป์เป็น C/C มีขนาด 375 bp และ 123 bp

3. ผลการยืนยันลำดับเบสโดยการ sequencing

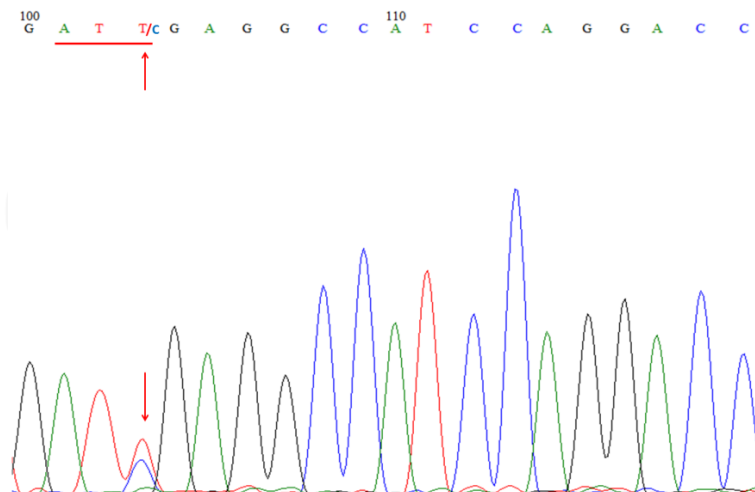
โดยการนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์จากนั้นจึงดำเนินการ direct sequencing เพื่อทำการยืนยันลำดับเบสโดย ในส่วนของ Forward primer ใช้สำหรับตำแหน่ง SNPs *BsmI* (rs1544410) และ -290C>T (rs9525641) ส่วน reverse primer ใช้สำหรับตำแหน่ง SNPs *TaqI* (rs731236), *FokI* (rs2228570) , -643C>T (rs9533156) และ -693G>C (rs9533155)

3.1 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* ที่ SNP *TaqI* (rs731236)(จีโนไทป์ TT) (ดังรูป ที่ 16)



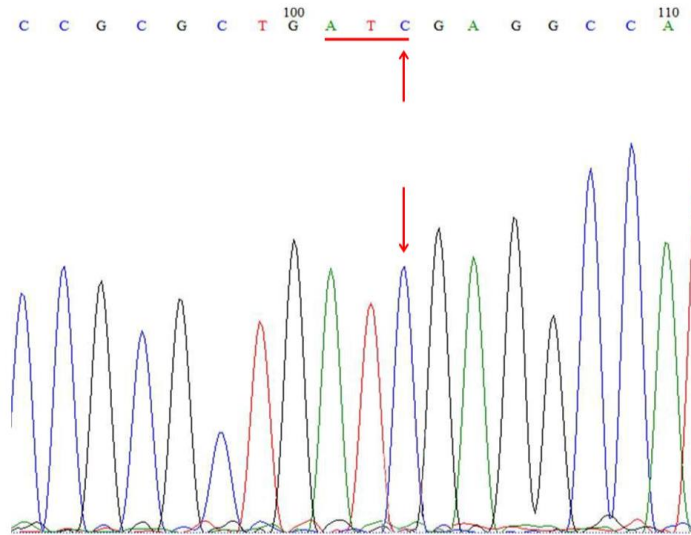
รูปที่ 16 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง SNP *TaqI* (rs731236)

3.2 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* ที่ SNP *TaqI* (rs731236)(จีโนไทป์ TC) (ดังรูปที่ 17)



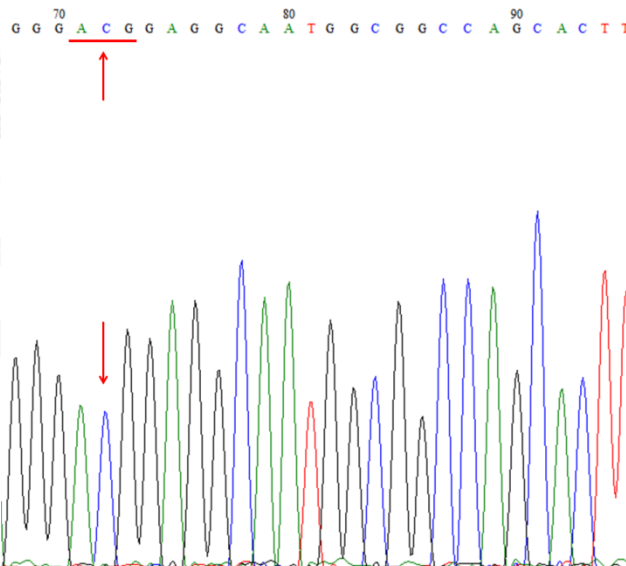
รูปที่ 17 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TC ที่ตำแหน่ง SNP *TaqI* (rs731236)

3.3 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน VDR ที่ SNP *TaqI* (rs731236)(จีนไทป์ CC) (ดังรูปที่ 18)



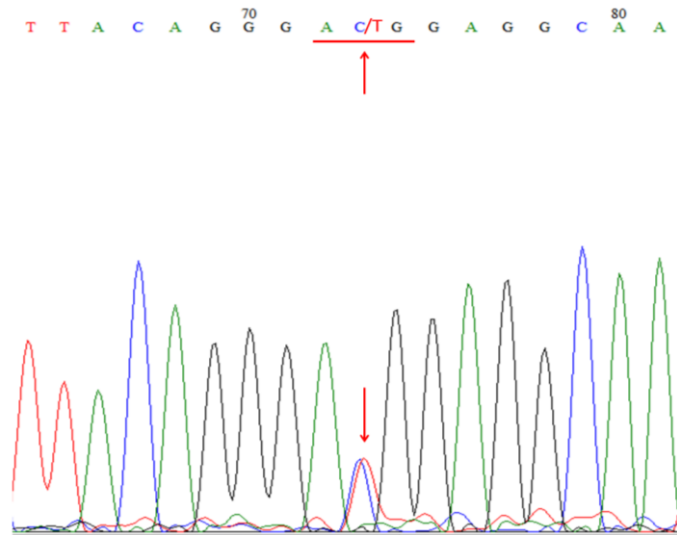
รูปที่ 18 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีนไทป์ CC ที่ตำแหน่ง SNP *TaqI* (rs731236)

3.4 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน VDR ที่ SNP *FokI* (rs2228570)(จีนไทป์ CC) (ดังรูปที่ 19)



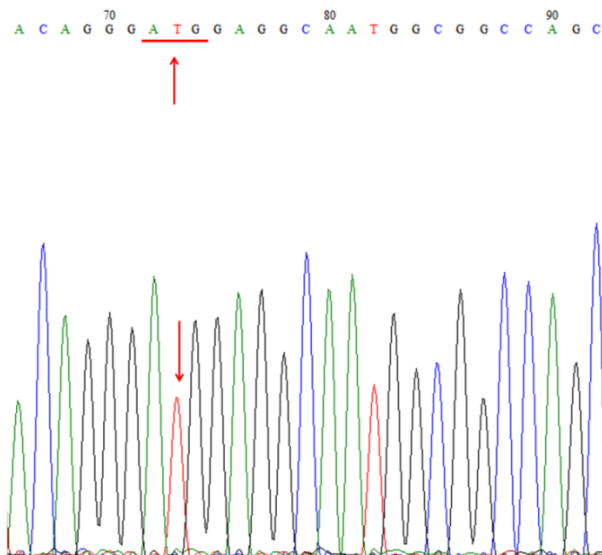
รูปที่ 19 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีนไทป์ CC ที่ตำแหน่ง SNP *FokI* (rs2228570)

3.5 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* ที่ SNP *FokI* (rs2228570)(จีโนไทป์ CT) (ดังรูปที่ 20)



รูปที่ 20 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ CT ที่ตำแหน่ง SNP *FokI* (rs2228570)


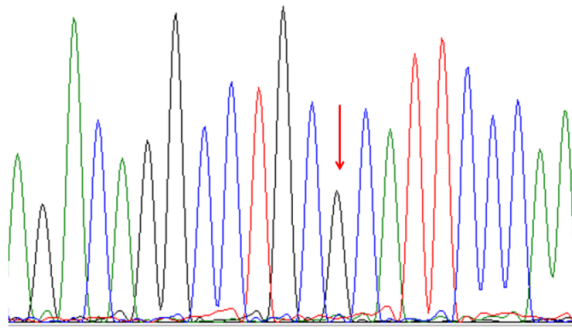
3.6 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* ที่ SNP *FokI* (rs2228570)(จีโนไทป์ TT) (ดังรูปที่ 21)



รูปที่ 21 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง SNP *FokI* (rs2228570)

3.7 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน VDR ที่ SNP *BsmI* (rs1544410)(จีโนไทป์ GG) (ดังรูปที่ 22)

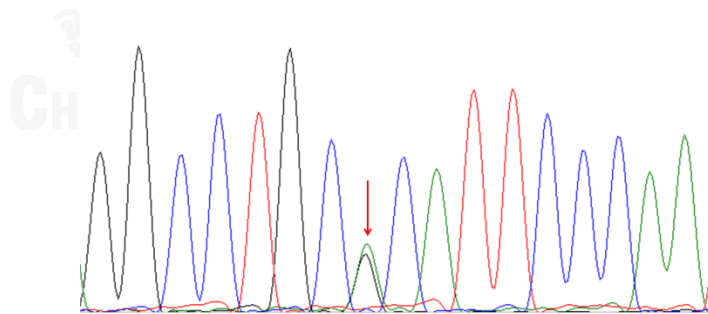
A G A C A G G C C T G C ¹⁷⁰ G C A T T C C C A A

รูปที่ 22 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง SNP *BsmI* (rs1544410)

3.8 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน VDR ที่ SNP *BsmI* (rs1544410)(จีโนไทป์ GA) (ดังรูปที่ 23)

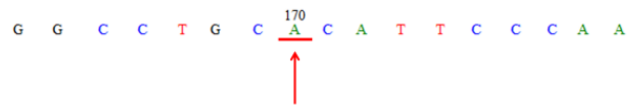
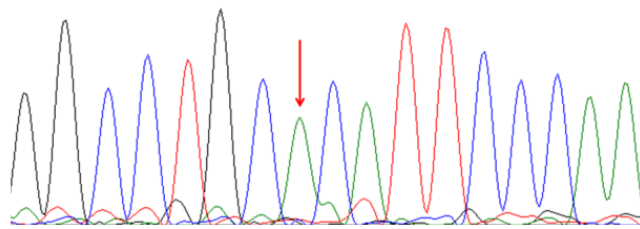
G G C C T G ¹⁷⁰ C/G C A T T C C C ¹⁸⁰ A A

รูปที่ 23 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ GA ที่ตำแหน่ง SNP *BsmI* (rs1544410)

3.9 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *VDR* ที่ SNP *BsmI* (rs1544410)(จีโนไทป์ AA) (ดังรูปที่ 24)

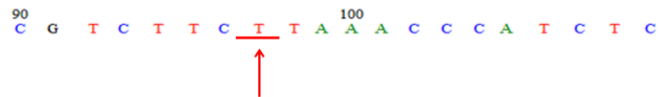
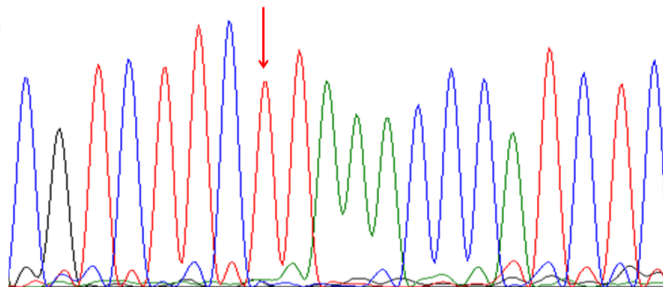
G G C C T G C ¹⁷⁰ A C A T T C C C A A

รูปที่ 24 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ AA ที่ตำแหน่ง SNP *BsmI* (rs1544410)

3.10 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *TNFSF11* ที่ SNP -290C>T (rs9525641) (จีโนไทป์ TT) (ดังรูปที่ 25)

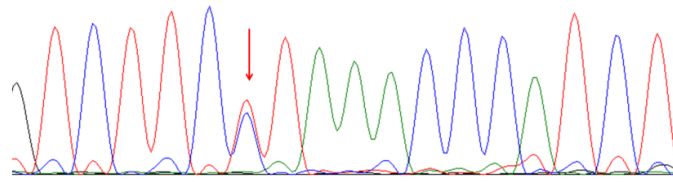
⁹⁰ C G T C T T C T T T A A ¹⁰⁰ A C C C A T C T C

รูปที่ 25 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641)

3.11 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *TNFSF11* ที่ SNP -290C>T (rs9525641) (จีโนไทป์ TC) (ดังรูปที่ 26)

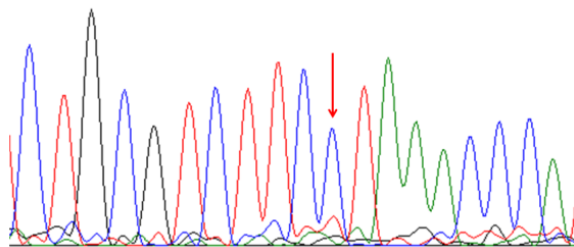
G T C T T C ¹⁰⁰T C T A A A C C C A T ¹¹⁰C T



รูปที่ 26 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TC ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641)

3.12 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *TNFSF11* ที่ SNP -290C>T (rs9525641) (จีโนไทป์ CC) (ดังรูปที่ 27)

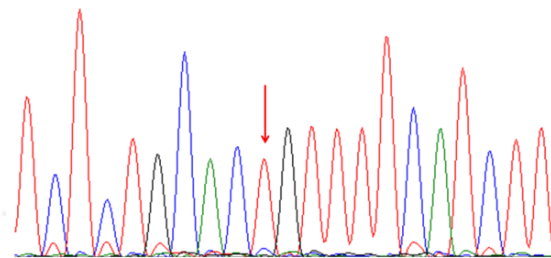
C T G C G ⁹⁰T C T T C C T A A A C C C A ¹⁰⁰



รูปที่ 27 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ CC ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641)

3.13 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *TNFSF11* ที่ SNP -643C>T (rs9533156) (จีโนไทป์ TT) (ดังรูปที่ 28)

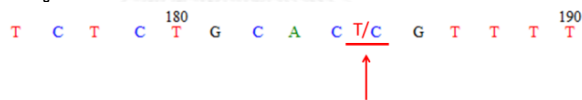
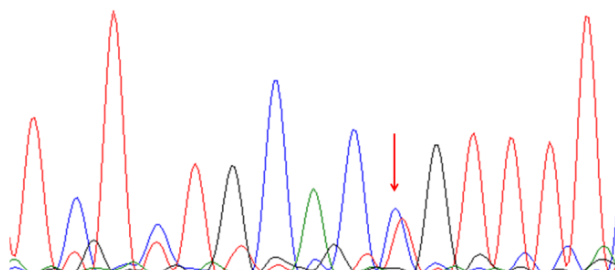
T C T C T ¹⁷⁰ G C A C T G T T T T ¹⁸⁰ C A T C T T

รูปที่ 28 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TT ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156)

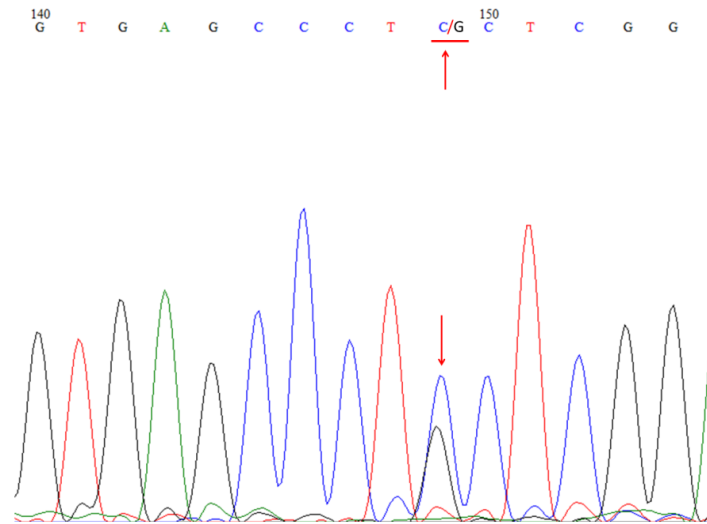
3.14 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *TNFSF11* ที่ SNP -643C>T (rs9533156) (จีโนไทป์ TC) (ดังรูปที่ 29)

T C T C ¹⁸⁰ T G C A C T/C G T T T ¹⁹⁰ T

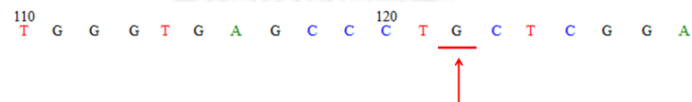
รูปที่ 29 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ TC ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156)

3.17 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *TNFSF11* ที่ SNP -693G>C (rs9533155) (จีโนไทป์ CG) (ดังรูปที่ 32)



รูปที่ 32 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ CG ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155)

3.18 ตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานของยีน *TNFSF11* ที่ SNP -693G>C (rs9533155) (จีโนไทป์ GG) (ดังรูปที่ 33)



รูปที่ 33 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยวิธี Sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ GG ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155)

4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยค่าทางสถิติ

4.1 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)

โดยการวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม Hardy-Weinberg equilibrium calculator ในกลุ่มประชากรปกติ โดยกำหนดให้ค่า P value > 0.05 จึงจะถือว่าอยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg (ดังตารางที่ 5) โดยจากตารางปรากฏค่า P value > 0.05 จึงถือว่าในทุก SNPs ของยีน *VDR* และ *TNFSF11* อยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg

ตารางที่ 5 แสดงค่า Hardy-Weinberg equilibrium ใน SNPs ตำแหน่งต่างๆ

Genes	SNPs	Physical Position	χ^2	P value
<i>VDR</i>	rs731236	48238757	0.43	0.5120
<i>VDR</i>	rs1544410	48239835	2.38	0.1229
<i>VDR</i>	rs2228570	48272895	2.61	0.1062
<i>TNFSF11</i>	rs9533155	43147621	0	1.00
<i>TNFSF11</i>	rs9533156	43147671	0.01	0.9202
<i>TNFSF11</i>	rs9525641	43148024	0.73	0.3929

4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบความหลากหลายของยีน *VDR* ที่ตำแหน่ง SNPs *TaqI* (rs731236) *BsmI* (rs1544410) *FokI* (rs2228570) และ ยีน *TNFSF11* ที่ SNPs -693G>C (rs9533155) -643C>T (rs9533156) และ -290C>T (rs9525641) กับความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน และรูปแบบของการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม โดยใช้ contingency tables : Statcalc

4.2.1 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับความถี่แอลลีลของแต่ละ SNPs ในยีน VDR

ยีน VDR มีตำแหน่ง SNPs ดังต่อไปนี้

- *TaqI* (rs731236) ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าแอลลีล C น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนโดยพบว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรปกติและกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 3 แบบ คือ ประชากรที่มีจีโนไทป์ TT TC และ CC ซึ่งในกลุ่มประชากรปกติมีความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.9356 และความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.0644 ในขณะที่กลุ่มประชากรผู้ป่วยพบว่าความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.9524 และความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.0476 และจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล C มีค่าเท่ากับ 0.73 (0.30-1.72) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.4340 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล T ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล T ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล T มีค่าเท่ากับ 1.38 (0.58-3.31) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.4340 (ดังตารางที่ 6)

- *BsmI* (rs1544410) ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าแอลลีล A น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนโดยพบว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรปกติและกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 3 แบบ คือ ประชากรที่มีจีโนไทป์ GG GA และ AA ซึ่งในกลุ่มประชากรปกติมีความถี่แอลลีล G เท่ากับ 0.875 และความถี่แอลลีล A เท่ากับ 0.125 ในขณะที่กลุ่มประชากรผู้ป่วยพบว่าความถี่แอลลีล G เท่ากับ 0.9 และความถี่แอลลีล A เท่ากับ 0.1 และจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล A มีค่าเท่ากับ 0.78 (0.42-1.44) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.3953 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล G ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล G ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล G มีค่าเท่ากับ 1.29 (0.69-2.39) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.3953 (ดังตารางที่ 6)

- *FokI* (rs2228570) ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าแอลลีล T น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนโดยพบว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรปกติและกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 3 แบบ คือ ประชากรที่มีจีโนไทป์ CC CT และ TT ซึ่งในกลุ่มประชากรปกติมีความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.5872 และความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.4128 ในขณะที่กลุ่มประชากรผู้ป่วยพบว่าความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.5143 และความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.4857 และจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล T มีค่าเท่ากับ 1.34 (0.92-1.97) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.1134 และถ้าตั้งสมมติฐานว่าแอลลีล C น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล C มีค่าเท่ากับ 0.74 (0.51-1.09) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.1134 (ดังตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับภาวะพหุ
 สันฐานของยีน VDR ที่ตำแหน่ง SNPs *TaqI* (rs731236) *BsmI* (rs1544410) และ *FokI*
 (rs2228570)

Genes	SNP	No of Samples	Allele		Groups	Genotype (N%)				Allele Frequency		Odd Ratio minor allele (95% CI)	Odd Ratio major allele (95% CI)	P value (Odd Ratio) (minor allele)			
			Major	Minor		TT	TC	CC	T	C							
VDR	rs731236	Control 132 samples	T	C	Control	TT	TC	CC	T	C	ref.	ref.	ref.				
						116 (87.88%)	15 (11.36%)	1 (0.76%)	0.9356	0.0644							
					Osteoporosis	97 (92.38%)	6 (5.71%)	2 (1.91%)	0.9524	0.0476	0.73 (0.30-1.72)	1.38 (0.58-3.31)	0.434				
						gg	ga	aa	g	a	ref.	ref.	ref.				
					rs1544410	Osteoporosis 105 samples	G	A	Control	gg	ga	aa	g	a	0.78 (0.42-1.44)	1.29 (0.69-2.39)	0.3953
										103 (78.03%)	25 (18.94%)	4 (3.03%)	0.875	0.125			
	Osteoporosis	85 (80.95%)	19 (18.10%)	1 (0.95%)					0.9	0.1	ref.	ref.	ref.				
		cc	ct	tt					c	t	ref.	ref.	ref.				
	rs2228570	Control	41 (31.06%)	73 (55.30%)					18 (13.64%)	0.5872	0.4128	1.34 (0.92-1.97)	0.74 (0.51-1.09)	0.1134			
			Osteoporosis	31 (29.52%)					46 (43.81%)	28 (26.67%)	0.5143	0.4857					

4.2.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ของยีน *VDR*

- *TaqI* (rs731236)

จีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 2.54 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ heterozygous(TC) และ homozygous (TT) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 2.54 (0.18 – 71.87) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.4146 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด heterozygous(TC) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.47 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) และ homozygous (TT) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.47 (0.16 – 1.36) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.1293 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด homozygous (TT) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 1.67 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) และ heterozygous(TC) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.67 (0.67 – 4.48) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.2548 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 7)

- *BsmI* (rs1544410)

จีโนไทป์ชนิด homozygous (AA) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.31 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ heterozygous(GA) และ homozygous (GG) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.31 (0.01 – 2.98) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.2642 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด heterozygous(GA) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.95 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (AA) และ homozygous (GG) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.95 (0.46 – 1.92) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.8684 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด homozygous (GG) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 1.20 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (AA) และ heterozygous(GA) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.20 (0.60 – 2.38) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.5819 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 7)

- *FokI* (rs2228570)

จีโนไทป์ชนิด homozygous (TT) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 2.30 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ heterozygous (CT) และ homozygous (CC) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 2.30 (1.14 – 4.69) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.0119 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้มีความสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด heterozygous (CT) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.63 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (TT) และ homozygous (CC) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.63 (0.36 – 1.09) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.0794 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value < 0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.93 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (TT) และ heterozygous (CT) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.93 (0.51 – 1.69) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.7987 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value < 0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ของยีน VDR

SNPs of VDR	Genotype	Odd ratio (95%CI)	<i>P</i> value
rs731236	CC	2.54 (0.18-71.87)	0.4146
	TC	0.47 (0.16-1.36)	0.1293
	TT	1.67 (0.67-4.48)	0.2548
rs15444410	AA	0.31 (0.01-2.98)	0.2642
	GA	0.95 (0.46-1.92)	0.8684
	GG	1.20 (0.60-2.38)	0.5819
rs2228570	TT	2.30 (1.14-4.69) *	0.0119 *
	CT	0.63 (0.36-1.09)	0.0794
	CC	0.93 (0.51-1.69)	0.7987

* *P* value ≤ 0.05

4.2.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆ ของ SNPs ของยีน VDR ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน (Mode of inheritance)

1. TaqI (rs731236)

- ถ้าแอลลีล C เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล C มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 2.54 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (TC) และ homozygous (TT) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 2.54 (0.18 – 71.87) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า P value เท่ากับ 0.4146

แต่ถ้ากำหนดให้แอลลีล C มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) และ heterozygous (TC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.60 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.60 (0.22 – 1.56) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า P value เท่ากับ 0.2548 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน VDR ที่ตำแหน่ง SNP TaqI (rs731236) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆ ของ SNPs ของยีน VDR ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP TaqI (rs731236) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs731236	OR (95 % CI)	P value
C = dominant , T = wild type CC และ TC TT	0.60 (0.22-1.56)	0.2548
C = recessive , T = wild type CC TC และ TT	2.54 (0.18-71.87)	0.4146

- **ถ้าแอลลีล T เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน**

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล T มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 1.67 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (TC) และ homozygous (CC) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.67(0.64 – 4.48) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.2548

แต่ถ้ากำหนดให้แอลลีล T มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) และ heterozygous (TC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.39 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.39 (0.01 – 5.62) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.4146 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *VDR* ที่ตำแหน่ง SNP *TaqI* (rs731236) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่านัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน *VDR* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP *TaqI* (rs731236) เมื่อแอลลีล T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs731236	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
T = dominant , C = wild type TT และ TC CC	0.39 (0.01-5.62)	0.4146
T = recessive , C = wild type TT TC และ CC	1.67 (0.64-4.48)	0.2548

2. BsmI (rs1544410)

- ถ้าแอลลีล A เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล A ถ้ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (AA) และ heterozygous (GA) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.84 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (GG) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.84 (0.42 – 1.66) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.5819

แต่ถ้ากำหนดให้แอลลีล A มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (AA) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.31 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (GA) และ homozygous (GG) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.31 (0.01 – 2.98) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.2642 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน VDR ที่ตำแหน่ง SNP BsmI (rs1544410) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน VDR ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP BsmI (rs1544410) เมื่อแอลลีล A มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs1544410	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
A = dominant , G = wild type AA และ GA GG	0.84 (0.42-1.66)	0.5819
A = recessive , G = wild type AA GA และ GG	0.31 (0.01-2.98)	0.2642

- **ถ้าแอลลีล G เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน**

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล G ถ้ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (GG) และ heterozygous (GA) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 3.25 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (AA) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 3.25 (0.34 – 77.54) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.2642

แต่ถ้ากำหนดให้แอลลีล G มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (GG) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 1.20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (GA) และ homozygous (AA) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.20 (0.60 – 2.38) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.5819 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน VDR ที่ตำแหน่ง SNP BsmI (rs1544410) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน VDR ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP BsmI (rs1544410) เมื่อแอลลีล G มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs1544410	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
G = dominant , A = wild type GG และ GA AA	3.25 (0.34-77.54)	0.2642
G = recessive , A = wild type GG GA และ AA	1.20 (0.60-2.38)	0.5819

3. FokI (rs2228570)

- เมื่อตั้งสมมติฐานไว้ว่าแอลลีล T

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล T มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 2.30 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (CT) และ homozygous (CC) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 2.30 (1.14 – 4.69) โดยเป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.0119

แต่ถ้ากำหนดให้แอลลีล T มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) และ heterozygous (CT) ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.00 (0.59 – 1.95) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.7987 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน VDR ที่ตำแหน่ง SNP FokI (rs2228570) นั้นสามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน VDR ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP FokI (rs2228570) เมื่อแอลลีล T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs2228570	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
T = dominant , C = wild type TT และ CT CC	1.00 (0.59-1.95)	0.7987
T = recessive , C = wild type TT CT และ CC	2.30 * (1.14-4.69)	0.0119 *

* *P* value \leq 0.05

- **ถ้าแอลลีล C เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน**

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล C ถ้ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) และ heterozygous (CT) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.43 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.43 (0.21 – 0.88) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.0119

แต่ถ้ากำหนดให้แอลลีล C มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.93 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (CT) และ homozygous (TT) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.93 (0.51 – 1.69) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.7987 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *VDR* ที่ตำแหน่ง SNP *FokI* (rs2228570) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน *VDR* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP *FokI* (rs2228570) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs2228570	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
C = dominant , T = wild type CC และ CT TT	0.43 (0.21-0.88)	0.0119
C = recessive , T = wild type CC CT และ TT	0.93 (0.51-1.69)	0.7987

4.2.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคระดูกพรุนกับความถี่แอลลีลของแต่ละ SNPs ในยีน *TNFSF11*

ยีน *TNFSF11* มีตำแหน่ง SNPs ดังต่อไปนี้

- -693G>C (rs9533155) ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าแอลลีล G น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดูกพรุนโดยพบว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรปกติและกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 3 แบบ คือ ประชากรที่มีจีโนไทป์ CC, CG และ GG ซึ่งในกลุ่มประชากรปกติมีความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.6288 และความถี่แอลลีล G เท่ากับ 0.3712 ในขณะที่กลุ่มประชากรผู้ป่วยพบว่าความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.6286 และความถี่แอลลีล G เท่ากับ 0.3714 และจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล G มีค่าเท่ากับ 1.00 (0.68-1.48) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.9961 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล G และ C ในผู้ป่วยใกล้เคียงกับคนปกติมาก จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล C ที่มีผลต่อการเกิดโรคระดูกพรุนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล C มีค่าเท่ากับ 1.00 (0.67-1.48) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.9961 (ดังตารางที่ 14)

- -643C>T (rs9533156) ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าแอลลีล C น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดูกพรุนโดยพบว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรปกติและกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 3 แบบ คือ ประชากรที่มีจีโนไทป์ TT, TC และ CC ซึ่งในกลุ่มประชากรปกติมีความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.5985 และความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.4015 ในขณะที่กลุ่มประชากรผู้ป่วยพบว่าความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.6 และความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.4 และจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) แอลลีล C มีค่าเท่ากับ 0.99 (0.67-1.46) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.9734 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล T ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล T ที่มีผลต่อการเกิดโรคระดูกพรุนซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล T มีค่าเท่ากับ 1.01 (0.68-1.48) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.9734 (ดังตารางที่ 14)

- -290C>T (rs9525641) ได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่าแอลลีล C น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดูกพรุนโดยพบว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรปกติและกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 3 แบบ คือ ประชากรที่มีจีโนไทป์ TT, TC และ CC ซึ่งในกลุ่มประชากรปกติมีความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.6174 และความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.3826 ในขณะที่กลุ่มประชากรผู้ป่วยพบว่าความถี่แอลลีล T เท่ากับ 0.5952 และความถี่แอลลีล C เท่ากับ 0.4048 และจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล C มีค่าเท่ากับ 1.01 (0.74-1.62) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.6235 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล C และ T ในผู้ป่วยใกล้เคียงกับคนปกติมาก จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล T ที่มีผลต่อการเกิดโรคระดูกพรุนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล T มีค่าเท่ากับ 0.91 (0.62-1.34) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.6235 (ดังตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับ
ภาวะพหุสัญญาณของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง SNPs -693G>C (rs9533155) -643C>T
(rs9533156) และ -290C>T (rs9525641)

Genes	SNP	No of Samples	Allele		Groups	Genotype (N%)						Allele Frequency		Odd Ratio minor allele (95% CI)	Odd Ratio major allele (95% CI)	P value (Odd Ratio) (minor allele)
			Major	Minor		CC	CG	GG	C	G						
<i>TNFSF11</i>	rs9533155	Control 132 samples	C	G	Control	CC	CG	GG	C	G	1.00 (0.68-1.48)	1.00 (0.67-1.48)	ref.	ref.		
						52 (39.39%)	62 (46.97%)	18 (13.64%)	0.6288	0.3712						
						Osteoporosis	38 (36.19%)	56 (53.33%)	11 (10.48%)	0.6286					0.3714	
			T	C	Control	TT	TC	CC	T	C	ref.	ref.	ref.			
						47 (35.61%)	64 (48.48%)	21 (15.91%)	0.5985	0.4015						
						Osteoporosis	24 (32.38%)	58 (55.24%)	13 (12.38%)	0.6				0.4		
	rs9525641	Osteoporosis 105 samples	T	C	Control	TT	TC	CC	T	C	ref.	ref.	ref.	ref.		
						48 (36.36%)	67 (50.76%)	17 (12.89%)	0.6174	0.3826						
						Osteoporosis	33 (31.43%)	59 (56.19%)	13 (12.38%)	0.5952					0.4048	
			T	C	Control	TT	TC	CC	T	C	1.10 (0.74-1.62)	0.91 (0.62-1.34)	0.6235			
						33 (31.43%)	59 (56.19%)	13 (12.38%)	0.5952	0.4048						
						Osteoporosis	33 (31.43%)	59 (56.19%)	13 (12.38%)	0.5952				0.4048		

4.2.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคระดูกพรุณกับรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ของยีน *TNFSF11*

- -693G>C (rs9533155)

จีโนไทป์ชนิด homozygous (GG) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดูกพรุณเพียง 0.74 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ heterozygous (CG) และ homozygous (CC) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.74 (0.31 – 1.75) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.4618 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด heterozygous (CG) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดูกพรุณถึง 1.29 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (GG) และ homozygous (CC) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.29 (0.75 – 2.23) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.3314 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดูกพรุณเพียง 0.87 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (GG) และ heterozygous (CG) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.87 (0.50 – 1.53) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.6145 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 15)

- -643C>T (rs9533156)

จีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดูกพรุณเพียง 0.75 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ heterozygous (TC) และ homozygous (TT) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.75 (0.33 – 1.67) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.4425 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด heterozygous (TC) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดูกพรุณถึง 1.31 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) และ homozygous (TT) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.31 (0.76 – 2.27) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.3025 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด homozygous (TT) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดูกพรุณเพียง 0.85 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) และ heterozygous (TC) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.85 (0.49 – 1.54) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.6038 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value <0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 15)

- -290C>T (rs9525641)

จีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.96 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ heterozygous (TC) และ homozygous (TT) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.96 (0.41 – 2.20) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.9090 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value<0.05) ซึ่งค่าที่ได้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด heterozygous (TC) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 1.24 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) และ homozygous (TT) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.24 (0.72 – 2.15) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.4061 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value<0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จีโนไทป์ชนิด homozygous (TT) มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.80 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ชนิด homozygous (CC) และ heterozygous (CT) โดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.80 (0.45 – 1.43) มีค่า *P* value เท่ากับ 0.4272 (โดยกำหนดให้ค่า *P* value<0.05) ซึ่งค่าที่ได้ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ของยีน *TNFSF11*

SNPs of <i>TNFSF11</i>	Genotype	Odd ratio (95 % CI)	<i>P</i> value
rs9533155	GG	0.74 (0.31-1.75)	0.4618
	CG	1.29 (0.75-2.23)	0.3314
	CC	0.87 (0.50-1.53)	0.6145
rs9533156	CC	0.75 (0.33-1.67)	0.4425
	TC	1.31 (0.76-2.27)	0.3025
	TT	0.85 (0.49-1.54)	0.6038
rs9533156	CC	0.96 (0.41-2.20)	0.9090
	TC	1.24 (0.72-2.15)	0.4061
	TT	0.8 (0.45-1.43)	0.4272

4.2.6 การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆ ของ SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน (Mode of inheritance)

1. -693G>C (rs9533155)

- ถ้าแอลลีล G เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล G มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (GG) และ heterozygous (CG) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 1.15 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.15 (0.65 – 2.02) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.6145

แต่ถ้ากำหนดให้แอลลีล G มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (GG) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.74 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) และ Heterozygous (CG) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.74 (0.31 – 1.75) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.4618 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่านัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆ ของ SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155) เมื่อแอลลีล G มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs9533155	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
G = dominant , C = wild type GG และ CG CC	1.15 (0.65-2.02)	0.6145
G = recessive , C = wild type GG CC และ CG	0.74 (0.31-1.75)	0.4618

- **ถ้าแอลลีล C เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน**

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล C มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) และ heterozygous (CG) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 1.35 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (GG) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.35 (0.57 – 3.23) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.4618

แต่ถ้ากำหนดให้แอลลีล C มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.87 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (GG) และ Heterozygous (CG) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.87 (0.50 – 1.53) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.6145 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่านัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -693G>C (rs9533155) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs9533155	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
C = dominant , G = wild type CC และ CG GG	1.35 (0.57-3.23)	0.4618
C = recessive , G = wild type CC GG และ CG	0.87 (0.50-1.53)	0.6145

2. 643C>T (rs9533156)

- ถ้าแอลลีล C เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดุกพรุน

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล C มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) และ heterozygous (TC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดุกพรุนถึง 1.15 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.15 (0.65 – 2.06) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.6038

แต่เมื่อกำหนดให้แอลลีล C มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดุกพรุนเพียง 0.75 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (TC) และ homozygous (TT) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.75 (0.33 – 1.67) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.4425 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่านัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคระดุกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs9533156	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
C = dominant , T = wild type CC และ TC TT	1.15 (0.65-2.06)	0.6038
C = recessive , T = wild type CC TC และ TT	0.75 (0.33-1.67)	0.4425

- **ถ้าแอลลีล T เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน**

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล T มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) และ heterozygous (TC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 1.34 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.34 (0.60 – 3.01) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.4425

แต่เมื่อกำหนดให้แอลลีล T มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.87 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (TC) และ homozygous (CC) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.87 (0.49 – 1.54) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.6038 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -643C>T (rs9533156) เมื่อแอลลีล T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs9533156	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
T = dominant , C = wild type TT และ TC CC	1.34 (0.60-3.01)	0.4425
T = recessive , C = wild type TT TC และ CC	0.87 (0.49-1.54)	0.6038

3. -290C>T (rs9525641)

- ถ้าแอลลีล C เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดุกพรุน

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล C มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) และ heterozygous (TC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดุกพรุนถึง 1.25 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.25 (0.70 – 2.23) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.4272

แต่เมื่อกำหนดให้แอลลีล C มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดุกพรุนเพียง 0.96 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (TC) และ homozygous (TT) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.96 (0.41 – 2.20) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.9090 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่านัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคระดุกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641) เมื่อแอลลีล C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs9525641	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
C = dominant , T = wild type CC และ TC TT	1.25 (0.70-2.23)	0.4272
C = recessive , T = wild type CC TC และ TT	0.96 (0.41-2.20)	0.9090

- **ถ้าแอลลีล T เป็นแอลลีลที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน**

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าถ้าแอลลีล T มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) และ heterozygous (TC) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 1.05 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (CC) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 1.05 (0.45 – 2.42) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.9090

แต่เมื่อกำหนดให้แอลลีล T มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) จะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนเพียง 0.80 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (TC) และ homozygous (CC) โดยใช้ค่า OR (95% CI) เท่ากับ 0.80 (0.45 – 1.43) แต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่า *P* value เท่ากับ 0.4272 ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641) นั้นก็ไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ (ดังตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ SNPs ของยีน *TNFSF11* ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน ที่ตำแหน่ง SNP -290C>T (rs9525641) เมื่อแอลลีล T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค

SNP rs9525641	OR (95 % CI)	<i>P</i> value
T = dominant , C = wild type TT และ TC CC	1.05 (0.45-2.42)	0.9090
T = recessive , C = wild type TT TC และ CC	0.80 (0.45-1.43)	0.4272

4.2.7 การศึกษารูปแบบของแฮพลอไทป์ในแต่ละ SNPs ของยีน VDR และ TNFSF11

ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุน

ในยีน VDR แสดงถึงรูปแบบของแฮพลอไทป์ของ SNPs ทั้งสามตำแหน่ง TaqI (rs731236) BsmI (rs1544410) และ FokI (rs2228570) พบรูปแบบแฮพลอไทป์สามัญ (Common haplotypes ซึ่งมีค่า MHF: Minimum Haplotypes Frequency ≥ 0.20) โดยมีรูปแบบคือ CAA เป็น minor haplotype นั้นมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน โดยเป็นแบบ protective haplotype ซึ่งพบในโรค 0.478 % แต่พบในประชากรปกติ 3.714 % ดังนั้นถ้าบุคคลใดมีรูปแบบแฮพลอไทป์แบบ CAA ก็จะไม่ความสัมพันธ์ในการเกิดโรคกระดูกพรุนโดยมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *P* value เท่ากับ 0.0204 (ดังตารางที่ 22)

ตารางที่ 22 ตารางแสดงการวิเคราะห์รูปแบบของแฮพลอไทป์ของ SNPs TaqI (rs731236) BsmI (rs1544410) และ FokI (rs2228570) ตามลำดับ (VDR gene)

Haplotype of VDR gene	Haplotype Frequency		<i>P</i> value
	Osteoporosis	Control	
CAT	0.0193	0.0263	0.6182
TAT	0.0206	0.0173	0.7933
TGT	0.4430	0.3690	0.1052
CAA	0.0048	0.0371	0.0204 *
TAA	0.0578	0.0444	0.5103
TGA	0.4545	0.5059	0.2704

* *P* value ≤ 0.05

ในยีน *TNFSF11* แสดงถึงรูปแบบของแฮพลอไทป์ของ SNPs ทั้งสามตำแหน่ง -693G>C (rs9533155) -643C>T (rs9533156) และ-290C>T (rs9525641) แต่ไม่พบรูปแบบแฮพลอไทป์ ที่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน (ดังตารางที่ 23)

ตารางที่ 23 ตารางแสดงการวิเคราะห์รูปแบบของแฮพลอไทป์ของ SNPs -693G>C (rs9533155) -643C>T (rs9533156) และ-290C>T (rs9525641) ตามลำดับ (*TNFSF11* gene)

Haplotype of <i>TNFSF11</i> gene	Haplotype frequency		P value
	Osteoporosis	Control	
GCC	0.3632	0.3494	0.7548
CCC	0.0244	0.0231	0.9295
CTC	0.0144	0.0114	0.7729
GCT	0.0052	0.0195	0.1753
CCT	0.0091	0.0111	0.8377
CTT	0.5837	0.5856	0.967

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการทดลอง

โรคกระดูกพรุนเป็นโรคที่มีความสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งมักพบในสตรีวัยหมดประจำเดือน การเกิดโรคนี้นักเกิดจากปัจจัยต่างๆร่วมกันรวมถึงปัจจัยทางทางด้านพันธุกรรม ซึ่งปัจจัยทางด้านพันธุกรรมนี้เองที่มีบทบาทอย่างยิ่งในการกำหนดภาวะกระดูกบางซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยเป็นโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต โดยยีนที่มีความเกี่ยวข้องในการควบคุมความสมดุลของการสร้างและการสลายกระดูกเช่น ยีน *VDR* และ *TNFSF11* จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *VDR* ที่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาโรคกระดูกพรุนในตำแหน่งภาวะพหุสัญญาณที่ *TaqI* (rs731236) *BsmI* (rs1544410) และ *FokI* (rs2228570) และ ยีน *TNFSF11* ในตำแหน่งภาวะพหุสัญญาณที่ -693G>C (rs9533155) -643C>T (rs9533156) และ -290C>T (rs9525641) จากการศึกษาของ Mancej และคณะ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของ SNPs -693G>C (rs9533155) -643C>T (rs9533156) และ -290C>T (rs9525641) ของ ยีน *TNFSF11* ในผู้ป่วยหญิงชาวสโลวาเนียที่หมดประจำเดือนและเป็นโรคกระดูกพรุนจำนวน 404 คน พบความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mencej *et al.*, 2008) และจากการศึกษาของ Zintzaras และคณะ ทำการรวบรวมข้อมูลทางงานวิจัยของ SNPs *BsmI* *TaqI* *Apal* และ *FokI* ในกลุ่มผู้ป่วยเอเชียที่เป็นโรคกระดูกพรุนโดยพบว่า SNPs *TaqI* *Apal* และ *FokI* มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนแต่ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Zintzaras *et al.*, 2006) ซึ่งการศึกษาดังกล่าวมีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในหลายๆประเทศ แต่ในขณะที่ประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาในยีน *VDR* และ *TNFSF11* มากนัก จากการศึกษาในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 5 ส่วนด้วยกันคือ

1. Hardy-Weinberg equilibrium โดยพบว่า SNPs ทั้ง 6 ตำแหน่งเป็นไปตามกฎ Hardy-Weinberg equilibrium (P value > 0.05) ในกรณีที่ไม่เป็นไปตามสมดุล HW อาจจะมาจากการเกิดมิวเทชัน การสุ่มกลุ่มตัวอย่างที่ไม่ได้มาจากเชื้อชาติเดียวกัน เป็นต้น
2. จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับความถี่แอลลีลของแต่ละ SNPs ในยีน *VDR* และ *TNFSF11* สามารถวิเคราะห์ได้ดังนี้
 - *TaqI* (rs731236) เมื่อตั้งสมมติฐานว่าแอลลีล C น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคซึ่งจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล C มีค่าเท่ากับ 0.73 (0.30-1.72) และค่า P value มีค่าเท่ากับ 0.4340 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล T ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล T ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล T มีค่าเท่ากับ 1.38 (0.58-3.31) และค่า P value มีค่าเท่ากับ 0.4340 ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่าแอลลีล C หรือ T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค เนื่องจากค่า P value ยังไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ แต่จะสามารถคาดการณ์ได้ว่าแอลลีล T น่าจะมีผลต่อการเกิดโรคได้มากกว่าเพราะค่าความถี่ของแอลลีล T ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ

- *BsmI* (rs1544410) เมื่อตั้งสมมติฐานว่าแอลลีล A น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคซึ่งจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล A มีค่าเท่ากับ 0.78 (0.42-1.44) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.3953 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล G ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล G ที่มีผลต่อการเกิดโรคระดุกพรุนซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล G มีค่าเท่ากับ 1.29 (0.69-2.39) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.3953 ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่าแอลลีล A หรือ G มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค เนื่องจากค่า *P* value ยังไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ แต่จะสามารถคาดการณ์ได้ว่าแอลลีล G น่าจะมีผลต่อการเกิดโรคได้มากกว่าเพราะค่าความถี่ของแอลลีล G ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ

- *FokI* (rs2228570) เมื่อตั้งสมมติฐานว่าแอลลีล T น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคซึ่งจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล T มีค่าเท่ากับ 1.34 (0.92-1.97) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.1134 ซึ่งจากการตั้งสมมติฐานที่ว่าแอลลีล T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคระดุกพรุนนั้น จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าแอลลีล T มีความสัมพันธ์ แต่จะแสดงแนวโน้มของความสัมพันธ์โดยสังเกตจากค่า OR (95%CI) เนื่องจากค่า *P* value ยังไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ

- *-693G>C* (rs9533155) เมื่อตั้งสมมติฐานว่าแอลลีล G น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคซึ่งจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล G มีค่าเท่ากับ 1.00(0.68-1.48) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.9961 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล G และ C ในผู้ป่วยใกล้เคียงกับคนปกติมาก จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล C ที่มีผลต่อการเกิดโรคระดุกพรุนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล C มีค่าเท่ากับ 1.00 (0.67-1.48) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.9961 ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่าแอลลีล G หรือ C มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค และค่า *P* value ยังไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย

- *-643C>T* (rs9533156) เมื่อตั้งสมมติฐานว่าแอลลีล C น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคซึ่งจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล C มีค่าเท่ากับ 0.99 (0.67-1.46) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.9734 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล T ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล T ที่มีผลต่อการเกิดโรคระดุกพรุนซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล T มีค่าเท่ากับ 1.01 (0.68-1.48) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.9734 ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่าแอลลีล C หรือ T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค เนื่องจากค่า *P* value ยังไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ แต่จะสามารถคาดการณ์ได้ว่าแอลลีล T น่าจะมีผลต่อการเกิดโรคได้มากกว่าเพราะค่าความถี่ของแอลลีล T ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ

- *-290C>T* (rs9525641) เมื่อตั้งสมมติฐานว่าแอลลีล C น่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคซึ่งจากการคำนวณพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล C มีค่าเท่ากับ 1.01 (0.74-1.62) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.6235 แต่จากผลการทดลองพบว่าความถี่ของแอลลีล C และ T ในผู้ป่วยใกล้เคียงกับคนปกติมาก จึงทำให้มีการคำนวณความสัมพันธ์ของแอลลีล T ที่มีผลต่อการเกิดโรคระดุกพรุนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะพบว่าค่า OR (95%CI) ของแอลลีล T มีค่าเท่ากับ 0.91(0.62-1.34) และค่า *P* value มีค่าเท่ากับ 0.6235 ซึ่งยังไม่สามารถสรุปได้ว่าแอลลีล C หรือ T มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค เนื่องจากค่า *P* value ยังไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ แต่จะสามารถคาดการณ์ได้ว่าแอล

ลีส C น่าจะมีผลต่อการเกิดโรคได้มากกว่าเพราะค่าความถี่ของแอลลีส C ในผู้ป่วยมีค่ามากกว่าคนปกติ

3. จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความสัมพันธ์ของการเกิดโรคกระดูกพรุนกับรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์และรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *VDR* และ *TNFSF11* ที่ตำแหน่ง SNPs อื่นๆพบว่าไม่มีเพียงตำแหน่งเดียว คือ *FokI* (rs2228570) ซึ่งเป็นตำแหน่ง SNP ที่อยู่บนยีน *VDR* โดยลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมพบว่าแอลลีส T จะมีลักษณะการถ่ายทอดเป็นลักษณะด้อย โดยมีรูปแบบจีโนไทป์เป็น homozygous (TT) ซึ่งจะปรากฏความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนถึง 2.30 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนไทป์ homozygous (CC) heterozygous (CT) โดยมีค่า 95%CI เท่ากับ 1.14-4.69 และค่า *P* value เท่ากับ 0.0119 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ และขณะที่ SNPs อื่นๆแสดงเพียงแนวโน้มที่จะมีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และการเกิดโรค เช่น *TaqI* (rs731236) -693G>C (rs9533155) -643C>T (rs9533156) และ -290C>T (rs9525641) ในส่วนของ SNP *BsmI* (rs1544410) ยังไม่พบแนวโน้มของความสัมพันธ์ดังกล่าว แต่ทั้งหมดล้วนแต่ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเป็นเพียงแต่แนวโน้มของการเกิดเท่านั้นยกเว้น SNP *FokI* (rs2228570) ที่ยืนยันแล้วว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจริง

4. การศึกษารูปแบบของแฮพลอไทป์ในแต่ละ SNPs ของยีน *VDR* และ *TNFSF11* ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุน โดยพบรูปแบบของแฮพลอไทป์ใน SNPs ตำแหน่ง *TaqI* (rs731236) *BsmI* (rs1544410) และ *FokI* (rs2228570) โดยมีรูปแบบแฮพลอไทป์ CAA เป็นแบบ protective haplotype ซึ่งพบในโรค 0.478 % แต่พบในประชากรปกติ 3.714 % ดังนั้นถ้าบุคคลใดมีรูปแบบแฮพลอไทป์แบบ CAA ก็จะไม่มีความสัมพันธ์ในการเกิดโรคกระดูกพรุนโดยมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ *P* value เท่ากับ 0.0204

จากการศึกษาของ Singh และคณะ ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ต่อภาวะพหุสัญญาณของยีน *VDR* กับการเกิดโรคกระดูกพรุนในกลุ่มประชากรชาวอินเดียโดยพบว่าตำแหน่ง SNP *FokI* มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจะสอดคล้องกับผลการทดลองในการศึกษานี้ และจากการศึกษาของ Arai และคณะพบว่าแอลลีส T ของ SNP *FokI* พบว่ามีความสัมพันธ์ต่อค่าความหนาแน่นมวลกระดูกที่ลดลง อีกทั้งยังพบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงจากแอลลีส C ไปเป็น แอลลีส T และเปลี่ยนกรดอะมิโนจากทรีโอนีน (threonine) ไปเป็น เมไทโอนีน (methionine) พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงแอลลีสแล้วส่งผลให้การกระตุ้นต่อตำแหน่ง vitamin D response element (VDRE) ลดลง แต่ในขณะเดียวกันก็ยังไม่เป็นที่ยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีกลไกอย่างไรต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน (Arai *et al.*, 1997) ในทางตรงกันข้ามจากการศึกษาของ Mencej-Bedrac และคณะ ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ต่อภาวะพหุสัญญาณของยีน *VDR* และ *TNFSF11* กับการเกิดโรคกระดูกพรุนในกลุ่มประชากรชาวสโลวาเนียจำนวน 641 คน โดยพบว่า ตำแหน่ง SNPs -290C>T (rs9525641) ของยีน *TNFSF11* มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของ SNP *FokI* กับการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Mencej-Bedrac *et al.*, 2009) จะสังเกตได้ว่ากลุ่มประชากรที่ Mencej-

Bedrac และคณะ ได้นำมาทำการศึกษามีจำนวนประชากรที่มาก ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการแม่นยำที่เพิ่มมากขึ้นต่อการทดลอง และในขณะที่การศึกษางานวิจัยในครั้งนี้จำนวนของกลุ่มตัวอย่างอาจจะไม่พอต่อการวิเคราะห์ผล อีกทั้งความแตกต่างทางด้านเชื้อชาติของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาทดลองซึ่งในการศึกษาของ Mencej-Bedrac และคณะ ได้ศึกษากลุ่มประชากรชาวสโลวาเนียซึ่งเป็นกลุ่มประชากรเชื้อชาติคอเคเซียน (Caucasians) ในขณะที่การศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษากลุ่มประชากรชาวไทยซึ่งจัดเป็นประชากรกลุ่มเชื้อชาติชาวเอเชีย (Asia) โดยจากผลการศึกษาในครั้งนี้จะสอดคล้องกับผลการทดลองของ Singh และคณะ ก็ด้วยเนื่องมาจากเป็นกลุ่มประชากรเชื้อชาติชาวเอเชียเหมือนกันนั่นเอง อีกทั้งปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม การควบคุมปริมาณแคลเซียมที่ได้รับ การรับวิตามินดี และการออกกำลังกายซึ่งปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นล้วนแต่มีความสัมพันธ์ของการเกิดโรคทั้งสิ้น

จากการศึกษาในครั้งนี้ก็สามารถแสดงถึงแนวทางและแนวโน้มในความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนในกลุ่มประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือน ซึ่งข้อมูลความสัมพันธ์ของแอลลีล จีโนไทป์ และรูปแบบของแฮพลอไทป์ ดังกล่าว สามารถนำมาเป็นข้อบ่งชี้หรือทำนายความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนในกลุ่มประชากรหญิงไทยวัยหมดประจำเดือนในอนาคตต่อไปได้

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *VDR* ที่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาโรคกระดูกพรุนในตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานที่ *TaqI* (rs731236) *BsmI* (rs1544410) และ *FokI* (rs2228570) และ ยีน *TNFSF11* ในตำแหน่งภาวะพหุสัณฐานที่ -693G>C (rs9533155) -643C>T (rs9533156) และ -290C>T (rs9525641) พบว่าที่ตำแหน่ง SNP *FokI* (rs2228570) มีลักษณะการแสดงออกในลักษณะด้อยโดยมีรูปแบบของจีโนไทป์ homozygous (TT) อีกทั้งยังพบรูปแบบของแฮพลอไทป์ในตำแหน่งของ SNPs *TaqI* (rs731236) *BsmI* (rs1544410) และ *FokI* (rs2228570) โดยมีรูปแบบแฮพลอไทป์เป็นแบบ CAA จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าถ้าบุคคลใดที่มีรูปแบบแฮพลอไทป์และรูปแบบของจีโนไทป์ดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้อเสนอแนะ

โรคกระดูกพรุนมีปัจจัยในการเกิดโรคได้หลายปัจจัยด้วยกัน เช่น สิ่งแวดล้อม โภชนาการ ฮอร์โมน และพันธุกรรม (สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, 2553) ซึ่งปัจจัยทางด้านพันธุกรรมเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผล แต่ปัจจัยอื่นก็มีความสำคัญไม่มากไปกว่ากัน จากการศึกษานี้ได้ควบคุมกลุ่มทดลองที่อายุ เพศ และ สภาวะการหมดประจำเดือน แต่ไม่ได้ติดตามชีวิตประจำวันของผู้ป่วยทุกราย ทั้งด้านโภชนาการ ด้านสิ่งแวดล้อม ฮอร์โมนต่างๆ การรับวิตามินดีหรือแคลเซียมระหว่างการรักษา การสูบบุหรี่ และการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ซึ่งอาจจะมีความแปรปรวนของการศึกษานี้ก็เป็นได้ ถ้ามีการควบคุมปัจจัยต่างในกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาก็อาจจะทำให้ผลการศึกษามีความแม่นยำมากขึ้น

อีกทั้งยังพบปัญหาสำคัญในการเก็บข้อมูล เช่น BMD (Bone mineral density หรือ ค่าความหนาแน่นของกระดูก) ซึ่งเป็นค่าที่มีความสำคัญอย่างมากเพราะจะสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนได้อย่างแม่นยำมากยิ่งขึ้น ซึ่งจากรายงานอื่นๆพบว่ามี การวิเคราะห์ค่า BMD (Bone mineral density) กับ SNPs ที่มีผลต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน หากแต่ในงานวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้จึงทำให้ค่าที่ได้เป็นเพียงแนวโน้มของการทดลองเท่านั้น

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาจากกลุ่มตัวอย่างในประชากรไทยซึ่งผลการศึกษา อาจจะไม่พ้องต้องงานวิจัยอื่นที่ทำการศึกษาจากกลุ่มตัวอย่างจากในประชากรอื่นๆ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าความแตกต่างของเชื้อชาติมีผลอย่างมากต่อความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค อีกทั้งยังต้องเพิ่มจำนวนกลุ่มทดลองที่นำมาศึกษาน่าจะมีโอกาสที่จะมีความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ที่เหลือกับการเกิดโรคกระดูกพรุนได้อย่างมีนัยสำคัญ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ฉัตรเลิศ พงษ์ไชยกุล. 2552.ตำราโรคกระดูกพรุน.เล่มที่ 1-2.กรุงเทพฯ:โอสถิสติก พับลิชชิง.

นิมิต เตชไกรชนะ, มาลินี แสงถวัลย์, บัญชา วรรณล้วน, ฉัตรชัย นาวิกะชีวิน และ มาค่อมครอง โปษะจินดา. 2536. ฐานข้อมูลผู้หญิงที่มารับการตรวจวัดความหนาแน่นกระดูกโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์. กรุงเทพมหานคร : สาขาเวชศาสตร์นิวเคลียร์ และหน่วยวิจัยผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน.

บุญส่ง องค์พิพัฒนกุล.2537.Vitamin D receptor gene และ estrogen receptor gene alleles กับบทบาทในการทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนในคนไทย.คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาริบัติ มหาวิทยาลัยมหิดล

สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก.2553.ชีววิทยาของกระดูก.พิมพ์ครั้งที่1.กรุงเทพฯ:โรงพิมพ์จามจุรีโปรดักท์.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2548. สารานุกรมพันธุศาสตร์. เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น. 3-11.

ภาษาอังกฤษ

Arden, N.K., Baker, J., Hogg, C., Baan, K., and Spector, T.D. 1996. The heritability of bone mineral density,ultrasound of the calcaneus and hip axis length,a study of postmenopausal twins. *J Bone Miner Res* 11: 530-4.

Arden, N.K., and Spector, T.D. 1997. Genetic influence on muscle strength, lean body mass and bone mineral density: a twin study. *J Bone Miner Res* 12: 2076-81.

Andrew, T., Antoniadis, L., Scurrah, K.J., Macgregor, A.J., and Spector, T.D. 2005. Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD. *J Bone miner Res* 20:67-74.

Aubin, J.E., and Triffitt, J.Y. 2002. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In Bilezikian, J., Raisz, L.G., and Rodan, G.A., *Principle of Bone Biology 2 nd ed*, 59-81. San Diego: Academic Press.

- Boyce, B.F., and Xing, L. 2008. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473: 139-46.
- Baron, R. 2003. General principal of bone biology. In Favus, M., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism 5th*, 1-8. Washington DC: American Society for Bone and Mineral Research.
- Canalis, E. 2003. Osteogenic growth factors. In Favus, M., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism 5th*, 28-31. Washington DC: American Society for Bone and Mineral Research.
- Consensus Development Conference. 1991. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 90: 107-10.
- Cullinane, D.M. 2002. The role of osteocytes in regulation: mineral homeostasis versus meachanoreception. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2: 242-4.
- Deng, H.W., Mahaney, M.C., Williams, J.T., Li, J., Conway, T., Davies, K.M., *et al.* 2002. Relevance of genes for bone mass variation to susceptibility to osteoporotic fractures and its implications to gene search for complex human diseases. *Genet Epidemiol* 22: 12-25.
- Downey, P.A., and Siegel, M.L. 2006. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical Therapy* 86: 77-81.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G. 1997. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 747-54.
- Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., *et al.* 1999. A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Gene Dev* 13: 1025-36.
- Eijken, M. 2007. *Human Osteoblast Differentiation and Bone Formation: Growth Factors, Hormones and Regulatory Networks*. The Netherlands : Haveka BV.

- Fernandez, T.H.G.I., Alobera, G.M.A., Delcanto, P.M., and Blanco, J.L. 2006. Physiological bases of bone regeneration II: the remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11: 151-7.
- Gersbach, C.A., Byers, B.A., Pavlath, G.K., and Garcia, A.J. 2004. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype. *Exp Cell Res* 300: 406-17.
- Gross, C., Eccleshall, T.R., Malloy, P.J., Villa, M.L., Marcus, R., and Feldman, D. 1996. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 11:1850-5.
- Hadjidakis, D.J., and Androulakis, I.I. 2006. Bone remodeling. *Ann NY Acad Sci* 1092: 385-96.
- Hauge, E.M., Qvesel, D., Eriksen, E.F., Mosekilde, L., and Melson, F. 2001. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic marker. *J Bone Miner Res* 16: 1575-82.
- Hofbauer, L.C., Gori, F., Riggs, B.L., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Spelsberg, T.C., *et al.* 1999. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid induced osteoporosis. *Endocrinology* 140: 4382-9.
- Hunter, D., De Lange, M., Snieder, H., Macgregor, A.J., Swaminathan, R., Thakker, R.V., *et al.* 2001. Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. *J Bone Miner Res* 16: 371-8.
- Katagiri, T. and Takahashi, N. 2002. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 8: 147-59.
- Kaprio, J., Rimpela, A., Winter, T., Viken, R.J., Rimpela, M., and Rose, R.J. 1995. Common genetic influences on BMI and age at menarche. *Hum Biol* 67: 739-53.

- Kanis, J.A., Johansson, H., Oden, A., Johnell, O., De Laet, C., Eisman, J.A., *et al.* 2004. A family history of fracture and fracture risk: a meta-analysis. *Bone* 35: 1029-37.
- Kannus, P., Palvanen, M., Kaprio, J., Parkkari, J., and Koskenvuo, M. 1999. Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people: prospective 25 year follow up of a nationwide cohort of elderly Finnish twins. *BMJ* 319: 1334-7.
- Karaplis, A.C. 2002. Embryonic development of bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondral bone formation. In Bilezikian, J., Raisz, L.G., and Rodan, G.A., *Principle of Bone Biology 2 nd*, 33-58. San Diego: Academic Press.
- Lari, R., Fleetwood, A.J., Kitchener, P.D., Cook, A.D., Pavasovic, D., HertZog, P.J., *et al.* 2007. Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis-complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta. *Bone* 40: 323-6.
- Lian, J.B., Stein, G.S., and Aubin, J.E. 2003. Bone formation: maturation and functional activities of osteoblast lineage cells. In Favus, M., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism 5th*, 13-28. Washington DC : American Society for Bone and Mineral Research.
- Liu, X.H., Kirchenbaum, A., Yao, S., and Levine, A.C. 2005. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* 146: 1991-8.
- Macgregor, A., Snieder, H., and Spector, T.D. 2000. Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people: twin data support genetic contribution to risk of fracture. *BMJ* 320: 1669-70.
- Marks, S.C., and Odgren, P.R. 2002. Structure and development of the skeleton. In Bilezikian, J., Raisz, L.G., Rodan, G.A., *Principle of Bone Biology 2 nd*, 3-15. San Diego: Academic Press.

- Marie, P.J. 2008. Transcription factor controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 473: 98-105.
- Martin, T.J., and Seeman, E. 2008. Bone remodeling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22: 701-22.
- Manolagas, S.C. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115-37.
- Meregalli, M., Farini, A., and Torrente, Y. 2011. Mesenchymal stem cells as muscle reservoir. *J Stem Cell Res Ther* 1: 1-9.
- Mencej, S., Albagha, O.M.E., Prezelj, J., Kocjan, T., and Marc, J. 2008. Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal of Molecular Endocrinology* 40: 273-9.
- Mencej-Bedrac, S., Prezelj, J., Kocjan, T., Karmen, T., and Barbara, O. 2008. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. *Journal of Molecular Endocrinology* 42: 239-47.
- Michaelsson, K., Melhus, H., Ferm, H., Ahlbom, A., and Pederson, N.L. 2005. Genetic liability to fractures in the elderly. *Arch Intern Med* 165: 1825-30.
- Morrison, N.A., Qi, J.Q., Tokita, A., Kelly, P.J., Croft, I., Nguyen, T.V., *et al.* 1994. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 327: 284-7.
- Monica, S., Puneet, S., Surinder, S., Pawan, K.J., and Taranpal, K. 2013. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism influences the risk of osteoporosis in postmenopausal women of Northwest India. *Arch Osteoporos* 8:147: 1-8.
- Mundy, G.R., Chen, D., and Oyajobi, B.O. 2003. Bone remodeling. In Favus, M., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism 5th*, 46-58. Washington DC: American Society for Bone and Mineral Research.

- Nakashima, K., Zhou, X., Kunke, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., *et al.* 2002. The novel zinc-finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29.
- Novack, D.V., and Teitelbaum, S.L. 2008. The osteoclast. *Annu Rev Pathol* 3: 457-84.
- Nijweide, P.J., Burger, E.H., and Klien-Nulend, J. 2002. The osteocyte. In Bilezikian, J., Raisz, L.G., and Rodan, G.A., *Principle of bone biology 2 nd*, 93-107. San Diego : Academic Press.
- Ott, S.M. 2002. Histomorphometric analysis of bone remodeling. In Bilezikian, J., Raisz, L.G., and Rodan, G.A., *Principle of Bone Biology 2nd*. 303-19. San Diego: Academic Press.
- Patrick, R.F., and Angela, M.C. 2006. Nothing but skin and bone. *The Journal of Clinical Investigation* 116: 1140-9.
- Pocock, N.A., Eisman, J.A., Hopper, J.L., Yeates, M.G., Sambrook, P.N., and Eberl, S. 1987. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest* 80: 706-10.
- Randell, A., Sambrook, P.N., Nguyen, T.V., Lapsley, H., Jones, G., Kelly, P.J., *et al.* 1995. Direct clinical and welfare costs of osteoporotic fractures in elderly men and women. *Osteoporosis International* 5: 32.
- Reed, T., and Dick, D.M. 2003. Heritability and validity of healthy physical aging (wellness) in elderly male twins. *Twin Res* 6: 227-34.
- Saika, M., Inoue, D., Kido, S., and Matsumoto, T. 2001. 17betaestradiol stimulates expression of osteoprotegerin bu a mouse stomal cell line, ST-2 via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 142:2205-12.
- Sims, N.A., and Gooi, J.H. 2008. Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 19: 444-51.

- Silventoinen, K. 1995. Determinants of variation in adult body height. *J Biosoc Sci* 35: 263-85.
- Smith, D.M., Nance, W.E., Kang, K.W., Christian, J.C., and Johnston, C.C.J.R. 1973. Genetic factors in determining bone mass. *J Clin Invest* 52: 2800-8.
- Snieder, H., Macgregor, A.J., and Spector, T.D. 1998. Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1875-80.
- Takahashi, N., Udagawa, N., and Suda, T. 1999. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 449-54.
- Takahashi, N., Udagawa, N., Takami, M., and Suda, T. 2002. Cells of bones: osteoclast generation. In Bilezikian, J., Raisz, L.G., and Rodan, G.A., *Principle of Bone Biology 2 nd*, 109-26. San Diego : Academic Press.
- Thirunavukkarasu, K., Miles, R.R., Halladay, D.L., Yang, X., Galvin, R.J., Chandrasekhar, S., et.al. 2001. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta) Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *J Biol Chem* 276: 36241-50.
- Thakkinstian, A., D'Este, C., Eisman, J., Nguyen, T., and Attia, J. 2004. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res* 19: 419-28.
- US Department of Health and Human Services. 2004. The basics of bone in health and disease. In McGowan, J.A., Raisz, L.G., Noonan, A.S., and Elderkin, A.L., *Bone health and osteoporosis*, 16-38. US: The Surgeon General US Department of Health and Human Services.
- Vannanen, K., and Laitata-Leinonen, T. 2009. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473: 132-8.

- Valsamis, H.A., Arora, S.K., Labban, B., and McFarlane, S.L. 2006. Antiepileptic drugs and bone metabolism. *Nutr Metab* 3: 36-46.
- Vilarino, F.L., Bianco, B., Lerner, T.G., Teles, J.S., Mafra, F.A., Christofolini, D.M., *et al.* 2011. Analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in women with and without endometriosis. *Elsevier Incorporation* 72: 359–363.
- Weinstein, R.S., Jilka, R.L., Parfitt, A.M., and Manolagas, S.C. 1998. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. *J Clin Invest* 102: 274-82.
- Yanatatsaneeji, P., Kitkumthorn, N., Dhammawipark, C., Rabalert, J., Patel, V., and Mutirangura, A. 2010. Codon72 polymorphism in the P53 tumor suppressor gene in oral lichen planus lesions in a Thai population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 11: 1137-1141.
- Yamaguchi, A., and Kahn, A.J. 1991. Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential. *Calcif Tissue Int* 49: 221-5.
- Yano, N., Nakagawa, N., Yasuda, H., Tsuda, E., and Higashino, K. 2001. Synovial cells from a patient with rheumatoid arthritis produce osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin: reciprocal regulation of the production by inflammatory cytokines and basic fibroblast growth factor. *J Bone Miner Metab* 19: 365-72.
- Zintzaras, E., Rodopoulou, P., and Koukoulis, G.N. 2006. BsmI, TaqI, Apal and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and the risk of osteoporosis: A meta-analysis. *Disease Markers* 22: 317-26.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ใบอนุญาตปฏิบัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์
โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล



คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล
๒๗๐ ถนนพระราม ๖ แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กทม. ๑๐๔๐๐
โทร. ๐-๒๓๕๔-๗๒๗๕, ๐-๒๒๐๑-๑๒๙๖ โทรสาร ๐-๒๓๕๔-๗๒๗๓
Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University
270 Rama VI Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand
Tel. (+66) 2354-7275, (+66) 2201-1296 Fax (+66) 2354-7233

เอกสารรับรองโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล

เลขที่ ๒๕๕๔/๒๒๕

ชื่อโครงการ	การศึกษายีนตัวรับวิตามินดีในกลุ่มสตรีวัยทอง
เลขที่โครงการ/รหัส	ID ๐๔-๕๔-๔๔ B
ชื่อหัวหน้าโครงการ	อาจารย์ ดร.แอนนา วงษ์กุลหาบ
ที่ทำงาน	ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

ขอรับรองว่าโครงการดังกล่าวข้างต้นได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบโดยสอดคล้องกับแนวปฏิบัติฯ เสด็จจึง
จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามธิบดี

ลงนาม	
กรรมการและเลขานุการจริยธรรมการวิจัยในคน	(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงดวงฤดี วัฒนศิริชัยกุล)
ลงนาม	
ประธานกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน	(ศาสตราจารย์ นายแพทย์บุญส่ง องค์กรพัฒน์กุล)
วันที่รับรอง	๑๒ พฤษภาคม ๒๕๕๔

รูปที่ 34 เอกสารอนุมัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์
โรงพยาบาลรามธิบดีมหาวิทยาลัยมหิดล

ใบอนุญาตปฏิบัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์
โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 (คณะแพทยศาสตร์)

หนังสือรับรองเลขที่ 108/2556
โครงการวิจัยชื่อ ภาวะทุพสุทธภาพของจีน VDR และ จีน TNFSF11 ในหญิงวัยหมดประจำเดือนคนไทย
เป็นโรคกระดูกพรุนชาวไทย
รหัสโครงการวิจัย MTU-EC-OT-4-087/56
ผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วัฒนพล อรรถโชติ
อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ฉายาทันนิจิต
นางสาว นันทฉา เศษะปฏิภาณดี
หน่วยงานที่รับผิดชอบ โครงการจัดตั้งภาควิชาศัลยศาสตร์ออร์โธปิดิกส์
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทร. 02 9269775, 081 9116300

เอกสารที่รับรอง

1. โครงร่างการวิจัย Version 260 Date 5/2555
2. เอกสารชี้แจงข้อมูลแก่ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย Version 260 Date 5/2555
3. หนังสือขอสงวนเจตนายินยอมเข้าร่วมการวิจัย Version 260 Date 5/2555

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 ได้พิจารณาอนุมัติผ่าน
จริยธรรมการทำวิจัยในคนให้ดำเนินการวิจัยข้างต้น ได้ ความดีที่ประชุม ครั้งที่ 9/2556 วันที่ 20 กันยายน 2556
ระยะเวลาที่อนุมัติ 3 ปี

กำหนดส่งรายงานความก้าวหน้า 1 ปี วันที่ 1 ธันวาคม 2557

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วัฒนพล อรรถโชติ)
ประธานคณะกรรมการ

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ทิพพร ชาระวานิช)
อนุกรรมการและเลขานุการ

อนุมัติ ณ วันที่ 2 ธันวาคม 2556

รูปที่ 35 ใบอนุญาตปฏิบัติงานวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมทางการวิจัยในมนุษย์
โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

ภาคผนวก ข

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดโดยวิธี Pheno/Chloroform extraction

1. นำตัวอย่างเลือดมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3300 rpm เวลา 10 นาที
2. ดูด Buffy coat หรือ ใช้ทั้งตัวอย่างเลือดทั้งหมดมาปั่น (ในกรณีที่ตัวอย่างน้อย)
3. เติม lysis buffer 1 ต่อ buffy coat ในอัตราส่วน 10 : 1 ผสมให้เข้ากัน
4. นำไปปั่นเหวี่ยง 1000 g เป็นเวลา 8 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง
5. เติม lysis buffer 1 ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 g เป็นเวลา 8 นาที เป็นจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง
7. ใส่ lysis buffer 1 และนำไปปั่นเหวี่ยงไปเรื่อยๆจนเม็ดเลือดแดงหายไป
8. เติม lysis buffer 2 950 μ l + 10 % SDS 50 μ l (20 mg/ml) จากนั้นเติม Protein Kinase K 20 μ l ผสมให้เข้ากัน
9. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
10. เติม Phenol : Chloroform : Isopropylalcohol ที่มีอัตราส่วน 25:24:1 ในอัตราส่วน 1:1 หรือ 1 เท่า ผสมให้เข้ากันในหลอด 1.5 ml
11. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูสารส่วนบนใสลงในหลอดใหม่
12. เติม 100 % เอทานอล (แช่เย็น) 1 เท่า และ 10 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (NH_4OAC) 0.5 เท่าของ ปริมาตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ
13. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง
14. เติม 70 % เอทานอล (แช่เย็น) 500 μ l
15. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
16. เทเอทานอลหลังจากนำไปปั่นเหวี่ยงทิ้ง airdry (อย่าให้แห้งเกินไป)
17. ละลายดีเอ็นเอใน dH_2O 20-50 μ l บ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
18. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย

1. Lysis buffer 1 ประกอบด้วย

- Tris HCL pH 7.5	10	มิลลิลิตร
- Sucrose	109.54	กรัม
- 1M MgCl	5	มิลลิลิตร
- Tritron X-100	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. Lysis buffer 2 ประกอบด้วย

- 5M NaCl	15	มิลลิลิตร
- 0.5M EDTA pH 8.0	48	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

3. 10X TBE Electrophoresis Buffer

- Tris Base	108	กรัม
- Boric Acid	55	กรัม
- 0.5M EDTA pH 8.0	20	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. 1X TBE Electrophoresis Buffer

- 10X TBE	100	มิลลิลิตร
- H ₂ O	900	มิลลิลิตร

5. 3% Agarose gel

- Agarose	1.5	กรัม
- 1X TBE	50	มิลลิลิตร
- Ethidium bromide	2	ไมโครลิตร

6. 8% Acrylamide gel

- dH ₂ O	7	มิลลิลิตร
- 10X TBE	1	มิลลิลิตร

- 40% Acrylamide/Bis Solution 19:1	2	มิลลิลิตร
- 10% APS	100	ไมโครลิตร
- TEMED	10	ไมโครลิตร
7. 10 mg/ml Ethidium bromide		
- Ethidium bromide	1.0	กรัม
- Distilled water	100	มิลลิลิตร

Mix the solution and store in the dark at 4°C.

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจาก Agarose gel โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit by (QIAGEN ®)

1. ใส่ Buffer QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักริบ Agarose gel ที่ตัด
2. บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที (mix ทุกๆ 2-3 นาที) จนกว่า Agarose gel ที่ตัดจะละลายหมด
3. ใส่ 100% Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักริบ Agarose gel ที่ตัด
4. จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวลงในคอลัมน์ (Min Elute Kits) ที่เตรียมไว้
5. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง 17,900 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่อยู่ด้านล่างทิ้ง
6. ใส่ Buffer QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 17,900 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่อยู่ด้านล่างทิ้ง
7. ล้างด้วย Buffer PE (add 100% Ethanol) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 17,900 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่อยู่ด้านล่างทิ้งอีกครั้ง
8. นำไป Air dry เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 17,900 g เป็นเวลา 1 นาที
9. เปลี่ยนหลอดด้านล่างโดยใส่ลงใน หลอด Eppendorf ขนาด 1000 ไมโครลิตร
10. จากนั้นล้างดีเอ็นเอให้ตกลงมาที่หลอด Eppendorf โดยใช้ EB ปริมาตร 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 17,900 g เป็นเวลา 1 นาที ทำทั้งหมด 2 ครั้ง จึงได้สารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ในหลอด Eppendorf



รูปที่ 36 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN ®)

(<http://www.qiagen.com>)

ขั้นตอนการสกัดทำความสะอาดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN ®)

1. ใส่ Buffer PB ปริมาตร 5 เท่าของ PCR Product
2. จากนั้นดูดสารละลายดังกล่าวลงในคอลัมน์ (Min Elute Kits) ที่เตรียมไว้
3. นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยง 17,900 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่อยู่ด้านล่างทิ้ง
4. ใส่ Buffer PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 17,900 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนที่อยู่ด้านล่างทิ้ง
5. เปลี่ยนหลอดด้านล่างโดยใส่ลงใน หลอด Eppendorf ขนาด 1000 ไมโครลิตร
6. จากนั้นล้างดีเอ็นเอให้ตกลงมาที่หลอด Eppendorf โดยใช้ EB ปริมาตร 15 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 17,900 g เป็นเวลา 1 นาที ทำทั้งหมด 2 ครั้ง จึงได้สารละลายดีเอ็นเอที่อยู่ในหลอด Eppendorf



รูปที่ 37 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN ®)

(<http://www.qiagen.com>)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

1. *TaqI*

- | | |
|------------------------------|-------------------------|
| | 5'... TCGA... 3' |
| | 3'... AGCT... 5' |
| - Recognition Site | |
| - Storage Temperature | Store at -20°C |
| - Reaction Conditions | 1X CutSmart™ Buffer |
| - Incubate Conditions | at 65°C. |
| - 1X CutSmart™ Buffer | 50 mM Potassium Acetate |
| | 20 mM Tris-acetate |
| | 10 mM Magnesium Acetate |
| | 100 µg/ml BSA |
| | pH 7.9 @ 25°C |
| - Storage Conditions Buffer | 10 mM Tris-HCl |
| | 300 mM NaCl |
| | 1 mM Dithiothreitol |
| | 0.1 mM EDTA |
| | 500 µg/ml BSA |
| | 50% Glycerol |
| | pH 7.4 @ 25°C |
| - Percent Activity in Buffer | |

- Storage Conditions Buffer
 - 10 mM Magnesium Acetate
 - 100 µg/ml BSA
 - pH 7.9 @ 25°C
 - 10 mM Tris-HCl
 - 50 mM NaCl
 - 1 mM Dithiothreitol
 - 0.1 mM EDTA
 - 200 µg/ml BSA
 - 50% Glycerol
 - pH 7.4 @ 25°C
- Percent Activity in Buffer

NEBuffer 1.1	NEBuffer 2.1	NEBuffer 3.1	CutSmart™ Buffer
100%	100%	75%	100%

4. *Bsa*I

- Recognition Site
 - 5'... CCNNGG... 3'
 - 3'... GGNNCC... 5'
- Storage Temperature
 - Store at -20°C
- Reaction Conditions
 - 1X CutSmart™ Buffer
- Incubate Conditions
 - at 60°C.
- 1X CutSmart™ Buffer
 - 50 mM Potassium Acetate
 - 20 mM Tris-acetate
 - 10 mM Magnesium Acetate
 - 100 µg/ml BSA
 - pH 7.9 @ 25°C
- Storage Conditions Buffer
 - 10 mM Tris-HCl
 - 100 mM KCl
 - 1 mM Dithiothreitol
 - 0.1 mM EDTA
 - 0.1% Triton® X-100
 - 50% Glycerol
 - pH 7.4 @ 25°C

- Percent Activity in Buffer

NEBuffer 1.1	NEBuffer 2.1	NEBuffer 3.1	CutSmart™ Buffer
50%	100%	100%	100%

5. *Tsp*RI

- Recognition Site


```
5'...NNCASTGNN...3'
3'...NNGTSACNN...5'
```
- Storage Temperature

Store at -20°C
- Reaction Conditions

1X CutSmart™ Buffer
- Incubate Conditions

at 65°C.
- 1X CutSmart™ Buffer

50 mM Potassium Acetate
 20 mM Tris-acetate
 10 mM Magnesium Acetate
 100 µg/ml BSA
 pH 7.9 @ 25°C
- Storage Conditions Buffer

10 mM Tris-HCl
 200 mM NaCl
 1 mM Dithiothreitol
 0.1 mM EDTA
 200 µg/ml BSA
 50% Glycerol
 pH 7.4 @ 25°C
- Percent Activity in Buffer

NEBuffer 1.1	NEBuffer 2.1	NEBuffer 3.1	CutSmart™ Buffer
25%	50%	25%	100%

DNA Ladder

1. 25bp DNA Step Ladder (Promega Corporation)

6X Blue/Orange Loading Dye

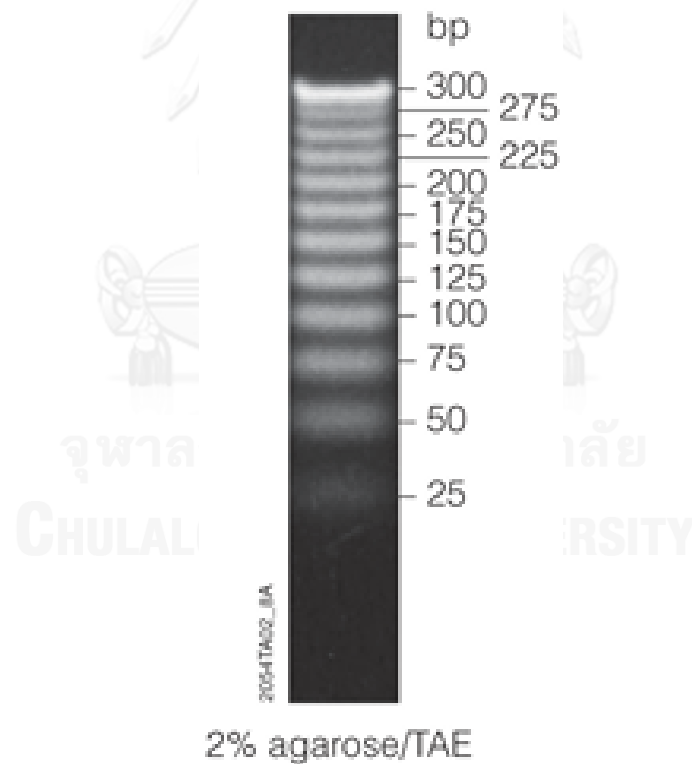
- 0.4% orange G
- 0.03% bromophenol blue
- 0.03% xylene cyanol FF
- 15% Ficoll® 400
- 10mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 50mM EDTA (pH 8.0)

Storage Buffer (TE buffer)

- 10mM Tris-HCl (pH7.6) and 1mM EDTA

Storage Condition

- -20°C



รูปที่ 38 25bp DNA Step Ladder (Promega Corporation)

(<http://www.promega.com>)

2. GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

6X DNA Loading Dye

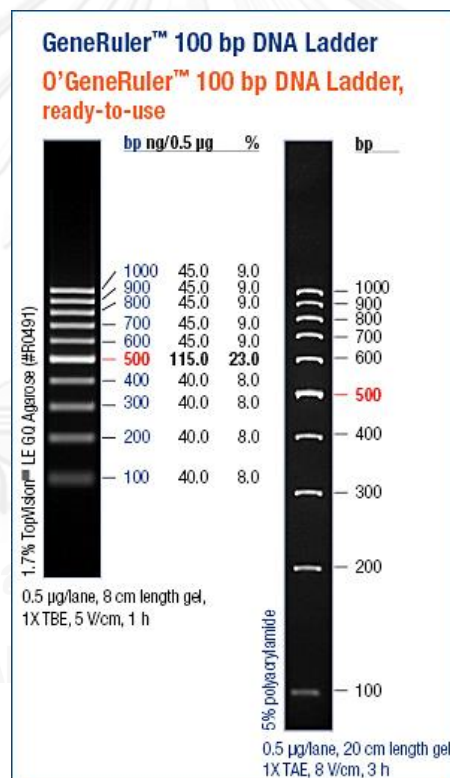
- 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)
- 0.03% bromophenol blue
- 0.03% xylene cyanol FF
- 60% glycerol
- 60 mM EDTA

Storage Buffer (TE buffer)

- 10mM Tris-HCl (pH7.6) and 1mM EDTA

Storage Condition

- -20°C



รูปที่ 39 GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

(<http://www.thermoscientificbio.com>)

SNPs and haplotype analysis

PLINK v1.07 คือโปรแกรมที่คิดค้นโดย Purcell et al จาก the Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital, Boston (Purcell et al., 2007) ซึ่งสามารถดาวน์โหลด software ได้ที่ <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>
วิธีการใช้โปรแกรม PLINK v1.07

1. การเตรียมข้อมูลตามรูปแบบของโปรแกรม

การทำงานของโปรแกรม PLINK นั้นจะต้องมีข้อมูลอยู่ 2 แบบ คือข้อมูล PED files และ MAP files

1.1 PED ประกอบไปด้วย

- Family ID
- Individual ID
- Paternal ID
- Maternal ID
- Sex (1=male; 2=female)
- Phenotype (normal=1; SLE=2)

กรอกข้อมูลลงใน Excel และนำข้อมูลไปวางใน Notepad แล้วบันทึกเป็นไฟล์นามสกุล .PED

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	FN1	N1	0	0	2	1	CC	CT	CT	GG	TT	AA
2	FN2	N2	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	TT
3	FN3	N3	0	0	2	1	CC	TT	TT	GG	TT	AA
4	FN4	N4	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	TA
5	FN5	N5	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	TT
6	FN6	N6	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	TT
7	FN7	N7	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	TA
8	FN8	N8	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	TT
9	FN9	N9	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	TA
10	FN10	N10	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	TA
11	FN11	N11	0	0	2	1	CC	TT	TT	GG	TT	TA
12	FN12	N12	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	TA
13	FN13	N13	0	0	2	1	CC	TT	TT	GG	TT	AA
14	FN14	N14	0	0	2	1	CG	CT	CT	GA	TC	AA
15	FN15	N15	0	0	2	1	GG	CC	CC	GG	TT	TA
16	FN16	N16	0	0	2	1	GG	CC	CC	GA	TT	AA
17	FN17	N17	0	0	2	1	CG	CT	CT	GG	TT	AA
18	FN18	N18	0	0	2	1	CC	TT	TT	GG	TT	TA
19	FN19	N19	0	0	2	1	GG	CC	CC	GG	TT	TT

รูปที่ 40 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงใน Excel

2.ped - Notepad															
File	Edit	Format	View	Help											
FN1	N1	0	0	2	1	C	C	C	T	G	G	T	T	A	A
FN2	N2	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	T	T
FN3	N3	0	0	2	1	C	C	T	T	G	G	T	T	A	A
FN4	N4	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	T	A
FN5	N5	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	T	T
FN6	N6	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	T	T
FN7	N7	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	T	A
FN8	N8	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	T	T
FN9	N9	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	T	A
FN10	N10	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	T	A
FN11	N11	0	0	2	1	C	C	T	T	G	G	T	T	T	A
FN12	N12	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	T	A
FN13	N13	0	0	2	1	C	C	T	T	G	G	T	T	T	A
FN14	N14	0	0	2	1	C	G	C	T	G	A	T	C	A	A
FN15	N15	0	0	2	1	G	G	C	C	G	G	T	T	T	A
FN16	N16	0	0	2	1	G	G	C	C	G	A	T	T	A	A
FN17	N17	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	A	A
FN18	N18	0	0	2	1	C	C	T	T	G	G	T	T	T	A
FN19	N19	0	0	2	1	G	G	C	C	G	G	T	T	T	T
FN20	N20	0	0	2	1	C	C	T	T	G	G	T	T	A	A
FN21	N21	0	0	2	1	C	C	T	T	G	G	T	T	T	A
FN22	N22	0	0	2	1	C	C	T	T	G	G	T	T	T	A
FN23	N23	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	A	A
FN24	N24	0	0	2	1	C	G	C	T	G	A	T	C	T	A
FN25	N25	0	0	2	1	C	G	C	T	G	A	T	C	T	A
FN26	N26	0	0	2	1	C	G	C	T	G	G	T	T	A	A
FN27	N27	0	0	2	1	C	C	T	T	G	G	T	T	T	T

รูปที่ 41 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงบน Notepad (2.ped)

2. MAP ประกอบไปด้วย

- chromosome (1-22, X, Y or 0 if unplaced)
- rs# or snp identifier
- Genetic distance (morgans)
- Base-pair position (bp units)

กรอกข้อมูลลงใน Excel นำข้อมูลไปวางใน Notepad แล้วบันทึกเป็นไฟล์นามสกุล MAP

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	13	rs9533155	0	43147621						
2	13	rs9525641	0	43148024						
3	13	rs9533156	0	43147671						
4	12	rs1544410	0	48239835						
5	12	rs731236	0	48238757						
6	12	rs2228570	0	48272895						
7										
8										
9										
10										

รูปที่ 42 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงบน Excel

File	Edit	Format	View	Help
13	rs9533155	0	43147621	
13	rs9525641	0	43148024	
13	rs9533156	0	43147671	
12	rs1544410	0	48239835	
12	rs731236	0	48238757	
12	rs2228570	0	48272895	

รูปที่ 43 ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงบน Notepad (map.map)

3. คำสั่งเริ่มการทำงานของ PLINK program

การใช้โปรแกรม PLINK

- เข้าโปรแกรม Command Prompt
- พิมพ์ cd \ (enter) --> cd plink-1.07-dos (enter)
- พิมพ์ plink --ped 2.ped --map.map -- คำสั่งที่ต้องการหาค่าความสัมพันธ์

(ดูคำสั่งได้จากคู่มือ PLINK v1.07)

3.1 Allelic association test

```

C:\Windows\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Version 6.1.7601]
Copyright (c) 2009 Microsoft Corporation. All rights reserved.

C:\Users\Aurug>cd\
C:\>cd plink-1.07-dos
C:\plink-1.07-dos>plink --ped 2.ped --map map.map --assoc --ci 0.95_

```

รูปที่ 44 คำสั่งเพื่อศึกษา Allelic association test บน Plink1.07

เมื่อทำการสั่งโปรแกรมเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ข้อมูลที่ได้จะมีดังนี้

- CHR คือ Chromosome
- SNP คือ SNP ID

- BP คือ Physical position (base-pair)
- A1 คือ Minor allele name (based on whole sample)
- F_A คือ Frequency of this allele in cases
- F_U คือ Frequency of this allele in controls
- A2 คือ Major allele name
- P คือ Exact p-value for this test
- OR คือ Estimated odds ratio (for A1)
- L95 คือ Lower bound of 95% confidence interval for odds ratio
- U95 คือ Upper bound of 95% confidence interval for odds ratio

CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR	SE	L95	U95
12	rs731236	48238757	C	0.04762	0.06439	T	0.6127	0.4338	0.7265	0.4097	0.3254	1.622
12	rs1544410	48239835	A	0.1	0.125	G	0.7242	0.3948	0.7778	0.2959	0.4355	1.389
12	rs2228570	48272895	T	0.4857	0.4129	A	2.512	0.113	1.343	0.1863	0.9323	1.935
13	rs9533155	43147621	G	0.3714	0.3712	C	2.347e-005	0.9961	1.001	0.1914	0.6879	1.456
13	rs9533156	43147671	C	0.4	0.4015	T	0.001118	0.9733	0.9937	0.1887	0.6865	1.438
13	rs9525641	43148024	C	0.4048	0.3826	T	0.2415	0.6231	1.097	0.1892	0.7574	1.59

รูปที่ 45 ข้อมูล Allelic association test

3.2 Model of inheritance analysis

การศึกษารูปแบบการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมว่ามีลักษณะเด่นหรือลักษณะด้อย โดยศึกษา minor allele เป็นตัวทดสอบ ให้ D เป็น minor allele และ d เป็น major allele) (ดังรูปที่ 54 และ 55)

Allelic	:	D versus d
Dominant	:	(DD, Dd) versus dd
Recessive	:	DD versus (Dd, dd)
Genotypic	:	DD versus Dd versus dd

```

C:\Windows\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Version 6.1.7601]
Copyright (c) 2009 Microsoft Corporation. All rights reserved.

C:\Users\Aurng>cd\
C:\>cd plink-1.07-dos
C:\plink-1.07-dos>plink --ped 2.ped --map map.map --model_

```

รูปที่ 46 คำสั่งเพื่อศึกษา Model of inheritance analysis บน Plink1.07

CHR	SNP	A1	A2	TEST	AFF	UNAFF	CHISQ	DF	P
12	rs731236	C	T	GENO	2/6/97	1/15/116	NA	NA	NA
12	rs731236	C	T	TREND	10/200	17/247	0.5213	1	0.4703
12	rs731236	C	T	ALLELIC	10/200	17/247	0.6127	1	0.4338
12	rs731236	C	T	DOM	8/97	16/116	NA	NA	NA
12	rs731236	C	T	REC	2/103	1/131	NA	NA	NA
12	rs1544410	A	G	GENO	1/19/85	4/25/103	NA	NA	NA
12	rs1544410	A	G	TREND	21/189	33/231	0.6703	1	0.413
12	rs1544410	A	G	ALLELIC	21/189	33/231	0.7242	1	0.3948
12	rs1544410	A	G	DOM	20/85	29/103	NA	NA	NA
12	rs1544410	A	G	REC	1/104	4/128	NA	NA	NA
12	rs2228570	T	A	GENO	28/46/31	18/73/41	6.7	2	0.03509
12	rs2228570	T	A	TREND	102/108	109/155	2.554	1	0.11
12	rs2228570	T	A	ALLELIC	102/108	109/155	2.512	1	0.113
12	rs2228570	T	A	DOM	74/31	91/41	0.0653	1	0.7983
12	rs2228570	T	A	REC	28/77	18/114	6.348	1	0.01175
13	rs9533155	G	C	GENO	11/56/38	18/62/52	1.111	2	0.5738
13	rs9533155	G	C	TREND	78/132	98/166	2.514e-005	1	0.996
13	rs9533155	G	C	ALLELIC	78/132	98/166	2.347e-005	1	0.9961
13	rs9533155	G	C	DOM	67/38	80/52	0.2548	1	0.6137
13	rs9533155	G	C	REC	11/94	18/114	0.5438	1	0.4608
13	rs9533156	C	T	GENO	13/58/34	21/64/47	1.204	2	0.5478
13	rs9533156	C	T	TREND	84/126	106/158	0.001204	1	0.9723
13	rs9533156	C	T	ALLELIC	84/126	106/158	0.001118	1	0.9733
13	rs9533156	C	T	DOM	71/34	85/47	0.2704	1	0.6031
13	rs9533156	C	T	REC	13/92	21/111	0.5924	1	0.4415
13	rs9525641	C	T	GENO	13/59/33	17/67/48	0.7529	2	0.6863
13	rs9525641	C	T	TREND	85/125	101/163	0.2728	1	0.6014
13	rs9525641	C	T	ALLELIC	85/125	101/163	0.2415	1	0.6231
13	rs9525641	C	T	DOM	72/33	84/48	0.6331	1	0.4262
13	rs9525641	C	T	REC	13/92	17/115	0.01311	1	0.9088

รูปที่ 47 ข้อมูล Model of inheritance analysis

3.3 Conditional analysis of SNP โดยวิเคราะห์ SNPs เพื่อให้ทราบถึง SNP แต่ละตำแหน่งว่ามีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมลักษณะใด โดยการเลือกคำสั่งเป็นแบบ dominant หรือ recessive

```

C:\Windows\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Version 6.1.7601]
Copyright (c) 2009 Microsoft Corporation. All rights reserved.

C:\Users\Aurng>cd\
C:\>cd plink-1.07-dos
C:\plink-1.07-dos>plink --ped 2.ped --map map.map --logistic --recessive --condition rs731236_
  
```

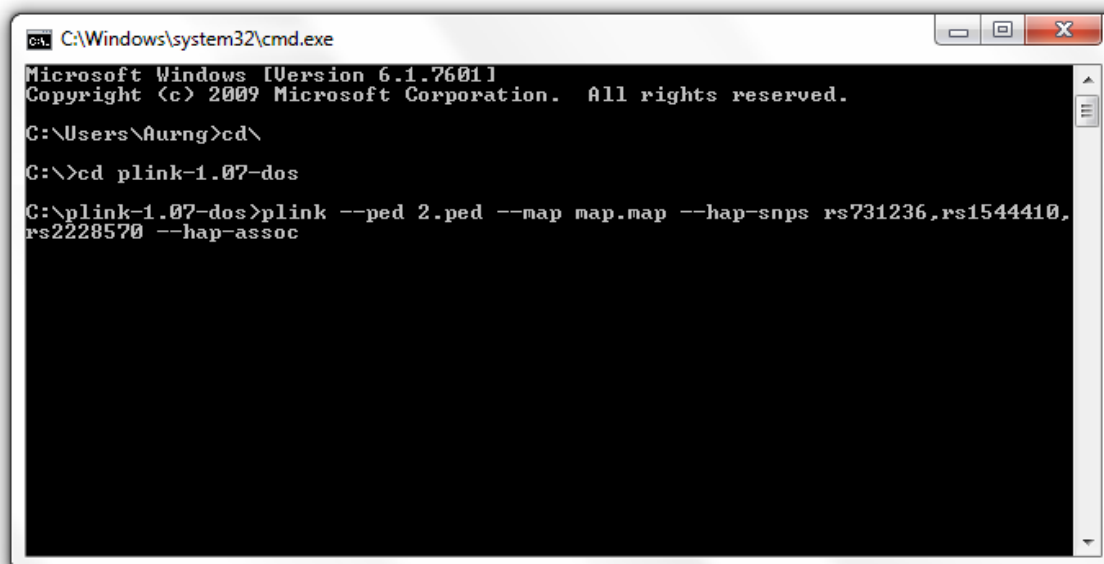
รูปที่ 48 คำสั่งเพื่อศึกษา Conditional analysis of SNP บน Plink1.07

CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	OR	STAT	P
12	rs731236	48238757	C	REC	237	NA	NA	NA
12	rs731236	48238757	C	rs731236	237	NA	NA	NA
12	rs1544410	48239835	A	REC	237	0.2069	-1.247	0.2124
12	rs1544410	48239835	A	rs731236	237	4.545	1.069	0.2849
12	rs2228570	48272895	T	REC	237	2.287	2.457	0.01401
12	rs2228570	48272895	T	rs731236	237	2.331	0.6766	0.4985
13	rs9533155	43147621	G	REC	237	0.7506	-0.7037	0.4816
13	rs9533155	43147621	G	rs731236	237	2.457	0.729	0.466
13	rs9533156	43147671	C	REC	237	0.7566	-0.7331	0.4635
13	rs9533156	43147671	C	rs731236	237	2.444	0.7249	0.4685
13	rs9525641	43148024	C	REC	237	0.9686	-0.0808	0.9356
13	rs9525641	43148024	C	rs731236	237	2.533	0.754	0.4509

รูปที่ 49 ข้อมูล Conditional analysis of SNP

3.4 Haplotype analysis

สำหรับการหาความสัมพันธ์ของ haplotype ต้องใช้คำสั่งตามภาพด้านล่าง

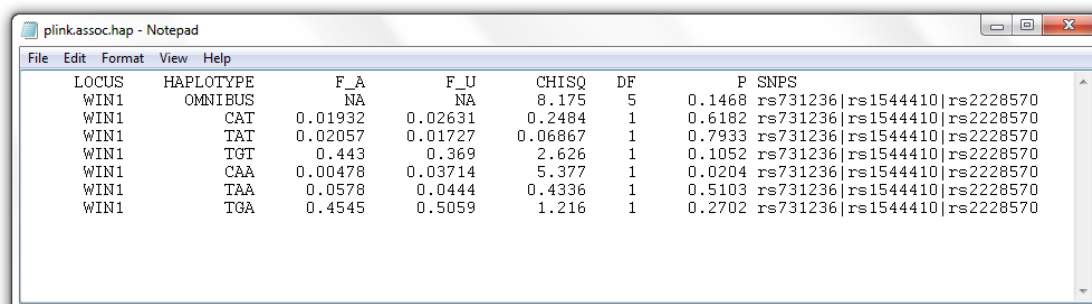


```

C:\Windows\system32\cmd.exe
Microsoft Windows [Version 6.1.7601]
Copyright (c) 2009 Microsoft Corporation. All rights reserved.

C:\Users\Aurug>cd\
C:\>cd plink-1.07-dos
C:\plink-1.07-dos>plink --ped 2.ped --map map.map --hap-snps rs731236,rs1544410,rs2228570 --hap-assoc
  
```

รูปที่ 50 คำสั่งเพื่อศึกษา Haplotype analysis บน Plink1.07



LOCUS	HAPLOTYPE	F_A	F_U	CHISQ	DF	P	SNPS
WIN1	OMNIBUS	NA	NA	8.175	5	0.1468	rs731236 rs1544410 rs2228570
WIN1	CAT	0.01932	0.02631	0.2484	1	0.6182	rs731236 rs1544410 rs2228570
WIN1	TAT	0.02057	0.01727	0.06867	1	0.7933	rs731236 rs1544410 rs2228570
WIN1	TGT	0.443	0.369	2.626	1	0.1052	rs731236 rs1544410 rs2228570
WIN1	CAA	0.00478	0.03714	5.377	1	0.0204	rs731236 rs1544410 rs2228570
WIN1	TAA	0.0578	0.0444	0.4336	1	0.5103	rs731236 rs1544410 rs2228570
WIN1	TGA	0.4545	0.5059	1.216	1	0.2702	rs731236 rs1544410 rs2228570

รูปที่ 51 ข้อมูล Haplotype analysis

Odds Ratio (อัตราส่วนออก)

เป็นการคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัวที่แต่ละตัวเป็นตัวแปรจัดกลุ่มที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (dichotomous) อัตราส่วนออกจะออกมาในรูปของตาราง 2 x 2 ดังนี้

ตารางที่ 24 รูปแบบการแจกแจงความถี่

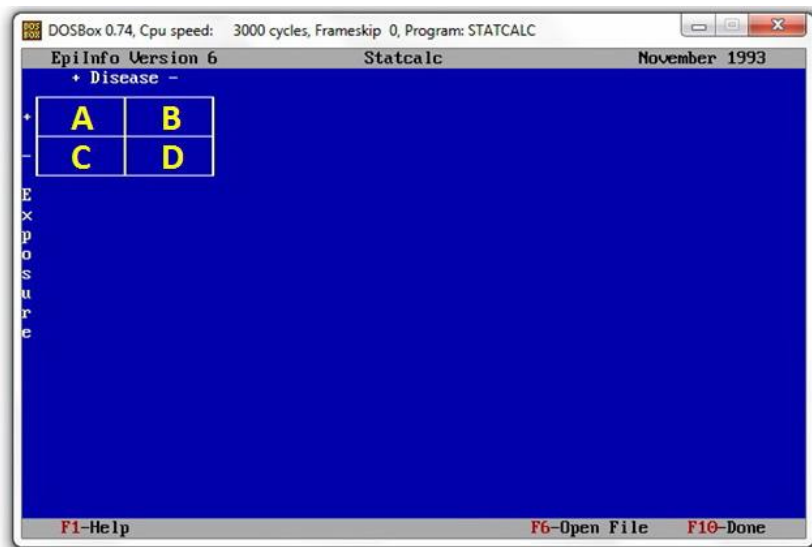
Exposure	Disease		
	+	-	
+	a	b	a + b
-	c	d	c + d
	a + c	b + d	Total

โดยนิยามอัตราส่วนออก หรือ OR ได้ว่า

$$OR = \frac{[a/(a+b)]/[b/(a+b)]}{[c/(c+d)]/[d/(c+d)]} \quad (1)$$

$$= \frac{a/b}{c/d} \quad (2)$$

$$= \frac{ad}{bc} \quad (3)$$



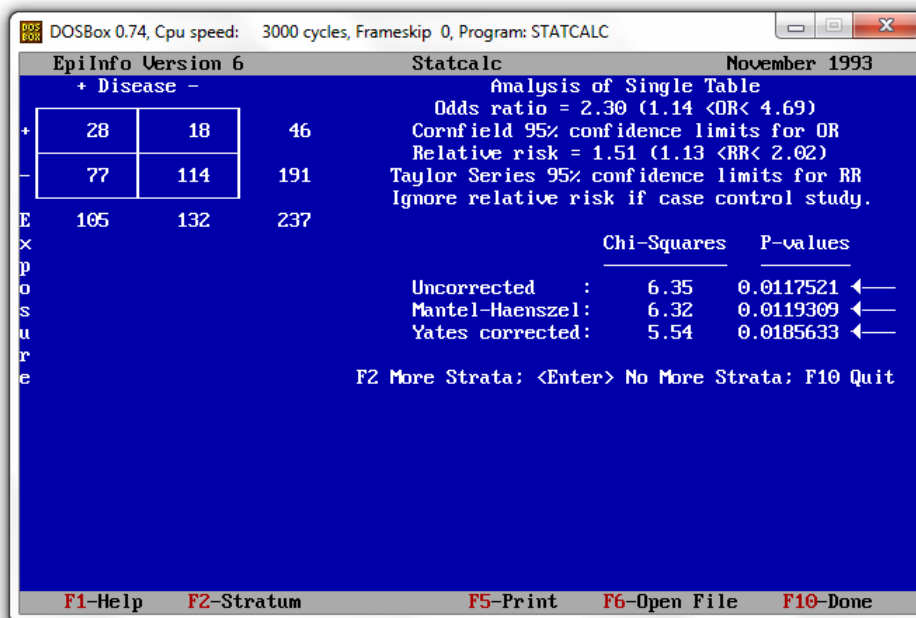
รูปที่ 52 ตาราง contingency tables โดยใช้โปรแกรม Statcalc

A คือ ความถี่ของแอลลีลที่เป็นปัจจัยเสี่ยง ที่ทำให้เกิดโรค

B คือ ความถี่ของแอลลีลที่เป็นปัจจัยเสี่ยง ที่ไม่ทำให้เกิดโรค

C คือ ความถี่ของแอลลีลที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยง ที่ทำให้เกิดโรค

D คือ ความถี่ของแอลลีลที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยง ที่ไม่ทำให้เกิดโรค



รูปที่ 53 ตัวอย่างค่า OR โดยใช้โปรแกรม Statcalc

การอ่านค่าจากโปรแกรม Statcalc

1. Odds Ratio มีค่า 2.30
2. 95% CI อยู่ระหว่าง 1.14-4.69
3. Chi-Squares และ P value เลือกที่ค่า Mentel-Haenzel

ซึ่งการคำนวณหาค่า odd ratios เป็นการหาค่าความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ตัวแปรตัวที่แต่ละตัวเป็นตัวแปรจัดกลุ่มที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อเปรียบเทียบระหว่าง SNP ที่สนใจมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคหรือไม่ และ มากน้อยเพียงใด โดยสามารถแปลค่า odd ratios ได้ดังนี้

= 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา นั้นไม่สัมพันธ์กับ SNP ที่สนใจ

> 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา นั้นสัมพันธ์กับ SNP ที่สนใจเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่เป็นโรค

< 1 การมีปัจจัยเสี่ยงนั้น ทำให้ไม่เกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษาและทุกครั้งที่ศึกษาค่า odd ratios ในแง่ปฏิบัติก็มักจะสุ่มมาเพียงครั้งเดียว จึงต้องมีการรายงานความน่าเชื่อถือเป็นช่วงๆ โดยกำหนดให้ค่า 95% confident intervals (95% CI) ต้องไม่ครอบคลุมค่า 1 และ ค่า P value < 0.05 จึงถือว่าเป็นนัยสำคัญทางสถิติ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อสกุล	นางสาว มณีนญา เตชะปฎิภาณดี
วัน/เดือน/ปี/เกิด	10 มีนาคม 2531 อายุ : 26 ปี
ที่อยู่ปัจจุบัน	25/87 หมู่บ้านพระรามสอง-ช.11 ถ.พระรามสอง (ซอย82)แขวง แสมดำ เขต บางขุนเทียน 10500
โทรศัพท์	089-221-3703
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ปีการศึกษา 2552
ประวัติเผยแพร่ผลงาน	งานประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 52 (วันที่ 5 กุมภาพันธ์ 2557)นำเสนอเรื่อง Polymorphisms of VDR and TNFSF11 genes in Thai osteoporosis patients.(Poster presentation)