



ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *SOX10* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด
ไทยและปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อสปีต่าแหน่ง rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene*
Single Nucleotide Polymorphisms of *SOX10* gene and their interaction with the
RET-protooncogene SNP rs2435357 in Thai Patients with Sporadic Hirschsprung
Disease

การุณ เอียดยาว

Karun Eadyow

วิทยานิพนธ์เล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *SOX10* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพอง โดยกำเนิดไทยและปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อส尼ตำแหน่ง rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene*

ผู้เขียน นายการุณ เอียดยาว

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.นพ.สุรศักดิ์สังขทัต ณ อยุธยา)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชลภัทร สุขเกษม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ดร.ธีรารุณี ภู่อันติสัมพันธ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นพ.สุรศักดิ์สังขทัต ณ อยุธยา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพร วรรณ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้
ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.นพ.สุรศักดิ์สังขทัต ณ อยุธยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(ดร.ธีรารุณี ภู่อันติสัมพันธ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....

(นายการุณ เอียดขาว)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายการุณ เอียดขาว)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>SOX10</i> ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดไทยและปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อสลิปตำแหน่ง rs2435357 บนยีน <i>RET-protooncogene</i>
ผู้เขียน	นายการุณ เอียดขาว
สาขาวิชา	ชีวเวชศาสตร์
ปีการศึกษา	2557

บทคัดย่อ

โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีความซับซ้อน มีลักษณะคือการขาดหายไปของเซลล์ประสาทในส่วนปลายของลำไส้ ได้มีการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ที่ยืนยันการเกิดการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมในหลายๆยีน เช่น *RET-protooncogene* ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรครวมถึงมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหาร และยีน *SOX10* เป็นยีนควบคุมการถอดรหัสซึ่งมีความสำคัญต่อการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหาร การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *SOX10* ได้แก่ สลิป rs139883 และ rs139884 ในผู้ป่วยแบบ sporadic ชาวไทยยังไม่เคยได้รับการรายงานมาก่อน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างสลิป rs139883 และ rs139884 กับการเกิดโรค และศึกษาปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อสลิป rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene* ซึ่งเป็นสลิปที่ได้รับการพิสูจน์มาก่อนหน้านี้ว่ามีความสัมพันธ์กับโรค โดยการศึกษาแบบ case-control study ที่ประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วย 120 ราย และ กลุ่มควบคุม 242 ราย การวิเคราะห์พบความสัมพันธ์ในผู้ป่วย long-segment HSCR และเพศหญิงกับสลิป rs139883 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P -value 0.02 และ 0.04) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ที่มีความเสี่ยง พบความสัมพันธ์กับโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสลิป rs2435357 และ สลิป rs139883 (P -value น้อยกว่า 0.01 และที่ค่า P -value 0.03) การศึกษายังพบว่าแต่ละจีโนไทป์ที่มีความเสี่ยงของสลิป rs2435357 เมื่อปฏิสัมพันธ์กับจีโนไทป์ที่มีความเสี่ยง CC ของสลิป rs139883 จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรค เมื่อเทียบกับจีโนไทป์ TT โดย

(6)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ TT ของ rs2435357 และจีโนไทป์ CC ของ rs139883 สัมพันธ์กับความเครียดสูงสุด ที่ค่า OR 3.19 (*P-value* 0.03) การศึกษาอาจนำไปสู่การทำนายความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคไตสำเภาใหญ่ไปงพองโดยกำเนิดชาวไทย

Thesis	Single Nucleotide Polymorphisms of <i>SOX10</i> gene and their interaction with the <i>RET-protooncogene</i> SNP rs2435357 in Thai Patients with Sporadic Hirschsprung Disease
Author	Mr. Karun Eadyow
Major Program	Biomedical Sciences
Academic Year	2014

ABSTRACT

Hirschsprung disease (HSCR or aganglionic megacolon) is a congenital and complex genetic disorder characterized by absence of ganglion cell in the distal part of intestine. The molecular genetic studies have discovered mutations and polymorphisms in various genes in HSCR such as *RET-protooncogene*, the key gene strongly associated with HSCR and implicated in neural crest development and *SOX10*, a transcriptional controller whose expression is important in development of the enteric nervous system. Disease association of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *SOX10* including rs139883 and rs139884 in sporadic HSCR has not been reported before. In this study, we evaluated disease association of the two SNPs in *SOX10* and their interaction with SNP rs2435357 in the *RET-protooncogene*, using case-control model. The study consisted of 120 sporadic HSCR and 242 healthy controls. The study found that the genotype distribution of rs139883 in cases and controls were significantly different in long-segment HSCR and female sex at a *P-value* 0.02 and 0.04 respectively. The association analysis found that risk genotypes in the rs2435357 (TT) were strongly associated with the disease at a *P-value* less than 0.01, so was the rs139883 (CC) at a *P-value* of 0.03. In addition, it could be demonstrated that, when combined with rs2435357-TT, both CT and CC in rs139883 has stronger disease association. The study may lead to a prediction marker which may help in screening for patients with increased risk of HSCR in Thai.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ซึ่งไม่อาจจะนำมากล่าวได้ทั้งหมดซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกที่คุณศึกษาใคร่ขอกราบพระคุณคือ รองศาสตราจารย์ ดร.นพ.สุรศักดิ์ สังขทัต ณ อุทยาน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่เปิดโอกาสในการศึกษาและทำวิจัย รวมถึงข้อเสนอแนะต่างๆ และให้คำปรึกษาแนะนำ ตรวจทาน แก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน และ ดร.ธีราวุฒิ ภูสันติสัมพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำในการค้นคว้าข้อมูล ความรู้ในด้านต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงมาด้วยดี นอกจากนี้ ผู้ศึกษาใคร่ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภก.ดร. ชลภัทร สุขเกษมหัวหน้าห้องปฏิบัติการเภสัชพันธุศาสตร์ และหัวหน้าสาขาวิชาเภสัชพันธุศาสตร์ และการแพทย์เฉพาะบุคคล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีที่ให้เกียรติมาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราพร วรรณ จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ในทุกๆ เรื่อง และยังคงคอยแนะนำรวมถึงให้กำลังใจเสมอมาตลอดระยะเวลาในการศึกษา

ขอบขอบคุณหน่วยส่งเสริมและพัฒนาทางวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่มอบทุนอุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และเพื่อนๆ ห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง เจ้าหน้าที่หน่วยคลังเลือด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อตัวอย่าง อุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงาน

(9)

ขอขอบคุณ คุณพ่อชอและห์ เอียดขาว และคุณแม่รานี เอียดขาว ที่อยู่เบื้องหลังใน
ความสำเร็จและให้โอกาสในการศึกษา ส่งเสริม และคอยเป็นแรงผลักดัน รวมถึงคอยให้กำลังใจใน
การต่อสู้กับอุปสรรคต่างๆ อีกทั้งยังคอยส่งเสียจนกระทั่งจบการศึกษา

การุณ เอียดขาว

สารบัญ

หน้า

รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ เนื้อเรื่อง	(15)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจสอบเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	43
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	44
วัสดุและอุปกรณ์	44
วิธีการดำเนินการ	46
บทที่ 3 ผลการวิจัย	67
บทที่ 4 บทวิจารณ์	94
บทที่ 5 บทสรุป	98
รายการเอกสารอ้างอิง	99
ประวัติผู้เขียน	110

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคกล้ามเนื้อหัวใจโตใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด	7
2. แสดงอุบัติการณ์การเกิดและการกลับมาเป็นซ้ำในรุ่นลูกของโรคกล้ามเนื้อหัวใจโตใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด	14
3. แสดงตัวอย่างการเกิด variation ของยีน <i>SOX10</i> ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค	29
4. แสดงรายละเอียดตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะและอุณหภูมิที่ใช้	52
5. สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวน DNA	52
6. สารองค์ประกอบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	53
7. สารองค์ประกอบปฏิกิริยา RFLP	53
8. สารองค์ประกอบปฏิกิริยา real-Time PCR	53
9. แสดงสายไพรเมอร์ (primer) และโอลิโกนิวคลีโอไทป์ (oligonucleotide sequence) ของสনিปต่างๆ	56
10. แสดงการกระจายตัวระหว่างเพศชายและหญิงในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม	68
11. แสดงความถี่จีโนไทป์และความถี่แอลลีล (Genotypes distribution and Alleles frequency) ทั้งสามสนิป (rs2435357, rs139883 และ rs139884)	74
12. แสดงการวิเคราะห์การกระจายของจีโนไทป์ในแต่ละสนิปและความเสี่ยงต่อการเกิดโรค	75
13. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Dominant ทั้งสามสนิป (rs2435357, rs139883 และ rs139884)	77
14. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Recessive ทั้งสามสนิป (rs2435357, rs139883 และ rs139884)	78
15. แสดงสัดส่วนความยาว aganglionosis ทั้งสามสนิป (rs2435357, rs139883 และ rs139884)	82
16. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ตามความยาวของ aganglionosis แบบ Recessive	83
17. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ตามความยาวของ aganglionosis แบบ Dominant	84

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
18. การวิเคราะห์การกระจายตัวระหว่างสปีและเพศ (Distribution between each SNPs and sex) แบบ Recessive	86
19. การวิเคราะห์การกระจายตัวระหว่างสปีและเพศ (Distribution between each SNPs and sex) แบบ Dominant	87
20. แสดงการศึกษาปฏิสัมพันธ์ (SNP-SNP interaction) ระหว่างสปี rs2435357 บนยีน <i>RET-protooncogene</i> และสปี rs139883 บนยีน <i>SOX10</i>	90
21. แสดงการศึกษาปฏิสัมพันธ์ (SNP-SNP interaction) ระหว่างสปี rs2435357 บนยีน <i>RET-protooncogene</i> และสปี rs139884 บนยีน <i>SOX10</i>	91
22. แสดงการศึกษาปฏิสัมพันธ์ (SNP-SNP interaction) ระหว่างสปี rs139883 และrs139884 บนยีน <i>SOX10</i>	92

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. แสดงความสัมพันธ์เชิงเครือข่าย (network of interaction) ในระหว่างการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหาร (enteric nervous system) โดยการกระตุ้นของ SOX10 ผ่าน <i>RET</i> และ <i>EDNRB</i>	11
2. แสดงความผิดปกติของลำไส้ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด	13
3. แสดงการกระจายตัวของระดับการขาดเซลล์ปมประสาทในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด	15
4. แสดงตำแหน่งของยีน <i>RET</i> บนตำแหน่งโครโมโซมที่ 10q11.2	24
5. แสดงโครงสร้างของเอกซอนของยีน <i>RET</i> และตำแหน่ง encode RET protein receptor	24
6. แสดงตำแหน่งของยีน <i>SOX10</i> บนตำแหน่งโครโมโซมที่ 22q13.1	30
7. ภาพแสดงการเกิดสลิปหรือ Single Nucleotide Polymorphism	32
8. โครงสร้างของ deoxynucleotide triphosphate และ dideoxynucleotide triphosphate	35
9. แสดงเครื่อง automate DNA sequencer	36
10. แสดงภาพตัวอย่างของข้อมูลลำดับเบสของ DNA ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์	36
11. แสดงหลักการของ TaqMan probe ซึ่งเป็น probe ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะกับ DNA แม่แบบ ปลายด้าน 5' ติดฉลากด้วย reporter dye และทางด้านปลาย 3' จะติดฉลากด้วย quencher dye	38
12. แสดงหลักการและขั้นตอนการทำ Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphism	40
13. แสดงโครงสร้างจีโนมิก (genomic structure) ของยีน <i>RET-protooncogene</i> และตำแหน่งสลิป	49
14. แสดงโครงสร้างจีโนมิก (genomic structure) ของยีน <i>SOX10</i> และตำแหน่งสลิป	49
15. แสดงความถี่แต่ละแอลลีลในกลุ่มประชากรต่างๆ	50

รายการภาพประกอบ(ต่อ)

รูปที่	หน้า
16. แสดงตัวอย่างตำแหน่งการออกแบบเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยโปรแกรม NEBcutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2)	52
17. แสดงภาพตัวอย่างแถบ DNA ของ PCR product ที่เห็นจาก gel electrophoresis เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide	55
18. แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing result) ของสনিปตำแหน่ง rs139883 บนยีน <i>SOX10</i> แสดงจีโนไทป์ TT, CT และ CC	70
19. แสดงผลการวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing result) ของสนิปตำแหน่ง rs139884 บนยีน <i>SOX10</i> แสดงจีโนไทป์ AA, AG และ GG	71
20. แสดงผลผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน <i>SOX10</i> โดย C1-C11 เป็นตัวอย่าง DNA ส่วน C12 เป็นตัวอย่างที่ไม่มี DNA (negative control)	79
21. แสดงผลจากการทำ PCR-RFLP โดย C1-C8 เป็นตัวอย่างที่ไม่ทราบจีโนไทป์ ส่วน C9-C11เป็นตัวอย่างที่ทราบจีโนไทป์ ได้แก่ CT, TT และ CC	79
22. แสดง discrimination plot ของสนิป rs139884 โดยจุดสีที่แตกต่างกันเป็นตัวแทนของจีโนไทป์ที่แตกต่างกัน ได้แก่ สีฟ้า แทน GG, สีเขียว แทน AG, สีส้ม แทน AA และสีดำแทน negative control	80
23. แสดง discrimination plot ของสนิป rs2435357 โดยจุดสีที่แตกต่างกันเป็นตัวแทนของจีโนไทป์ที่ต่างกัน ได้แก่ สีฟ้า แทน TT, สีเขียว แทน CT, สีส้ม แทน CC และสีดำแทน negative control	80
24. แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA ของยีน <i>SOX10</i> rs139883	93

สัญลักษณ์คำย่อและหน่วย

CAD	= Cadherin-like domain
CCHS	= Congenital central hypoventilation syndrome
CI	= Confidence interval
CYS	= Cysteine rich region
°C	= Degree Celsius
DNA	= Deoxyribonucleic acid
dNTP	= Deoxynucleotide triphosphate
EC	= Extracellular
ECE-1	= Endothelin converting enzyme
EDNRA	= Endothelin-A
EDNRB	= Endothelin-B
END3	= Endothelin-3 ligand
ENS	= Enteric nervous system
FAM	= Carboxyfluorescein
FMTC	= Familiar medullary thyroid carcinoma
GDNF	= Glial cell line-derived neurothrophic factor
GWAS	= Genome-wide association study
HMG	= High mobility group
HSCR	= Hirschsprung disease
HWE	= Hardy-Weinberg equilibrium
IC	= Intracellular
LD	= Linkage disequilibrium
L-HSCR	= Long-segment Hirschsprung disease
MAF	= Minor allele frequency
MEN2A	= Multiple endocrine neoplasia type2A
MEN2B	= Multiple endocrine neoplasia type2B
µg	= Microgram
µl	= Microliter

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

NCC	= Neural crest cell
ng	= nanogram
OR	= Odds ratio
RFLP	= Restriction fragment length polymorphism
PCR	= Polymerase chain reaction
PTC	= Papillary thyroid carcinoma
%	= Percent
S-HSCR	= Short-segment Hirschsprung disease
SNP	= Single nucleotide polymorphism
SRY	= Sex determining region Y
tagSNP	= Tagging single nucleotide polymorphism
TCA	= Total colonic aganglionosis
TK	= Tyrosine kinase domain
UV	= Ultraviolet
VIC	= Vasoactive intestinal contractor
WS	= Waardenburg-Shah syndrome
WS2E	= Waardenburg-Shah syndrometype2E

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Hirschsprung Disease; HSCR) หรือ aganglionic megacolon เป็นกลุ่มโรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีความซับซ้อน (complex genetic disorder) พบความชุกของการเกิดโรคในประชากร 1 ต่อ 5,000 ทารกแรกเกิดมีชีพราย ผู้ป่วยมากกว่าร้อยละ 80 แสดงอาการผิดปกติของการขับถ่ายก่อนอายุ 1 ปี และมากกว่าร้อยละ 90 แสดงอาการก่อนอายุ 5 ปี โดยมีเกณฑ์วินิจฉัยทางพยาธิคือการขาดเซลล์ปมประสาท หรือ ganglion cell ทำหน้าที่ควบคุมการบีบตัวแบบ peristalsis ของลำไส้ส่วนปลาย ส่งผลให้เกิดการกักตัวของกากอาหารในส่วนของลำไส้ที่ขาดเซลล์ปมประสาทและเกิดการโป่งพองของลำไส้ส่วนต้นและการอักเสบตามมา พยาธิกำเนิดของการขาดเซลล์ปมประสาทเชื่อว่าเกิดจากความล้มเหลวของการอพยพ (migration) ของ neural crest cell (NCC) และเป็นต้นกำเนิด (precursor) ที่สำคัญต่อการพัฒนาของระบบประสาทภายในทางเดินอาหาร (Gui *et al.* 2013) หลักฐานที่แสดงความเกี่ยวข้องของปัจจัยทางพันธุกรรม ได้แก่ ความเสี่ยงของการเกิดโรคที่เพิ่มขึ้นในบุตรหลานของผู้ที่เป็นโรคความไม่สมดุลของอัตราส่วนเพศชายและหญิง (unbalanced sex-ratio) และความสัมพันธ์ของโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดกับโรคทางพันธุกรรมอื่นๆ เช่น Down syndrome และ Shah-Waardenberg syndrome รวมถึงยังมีหลักฐานในสัตว์ทดลองที่แสดงถึงการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบเมนเดล (Mendelian mode of inheritance) (Paul K.H. Tam 2004) สมมุติฐานจากการศึกษาทางพันธุศาสตร์พบการกลายพันธุ์ (mutation) ในหลายยีน เช่น ยีน *RET-protooncogene (RET)*, *GDNF*, *EDNRB* และ *ET-3* ที่ต่างก็ทำหน้าที่เกี่ยวกับการพัฒนาและการอยู่รอดของเซลล์ปมประสาท (neurotropic factor) (Amiel *et al.* 2008)

ในช่วงปี 1980 ได้มีการค้นพบว่า โครโมโซมคู่ที่ 10q11.2 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ก่อให้เกิดความผิดปกติของกลุ่มอาการที่เรียกว่า Multiple Endocrine Neoplasia (MEN) (Simpson *et al.* 1987;

Mulligan *et al.* 1993) และเป็นตำแหน่งเดียวกันกับที่มีการระบุว่าเป็นสาเหตุของการเกิด Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) และ Familial Medullary Thyroid Carcinoma (FMTC) (Donis-Keller *et al.* 1993) การเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดในผู้ป่วยบางรายพบร่วมกับกลุ่มอาการ MEN type 2 (MEN2) มีการศึกษาพบการกลายพันธุ์ชนิด germline ของยีน *RET* ในครอบครัวผู้เป็นโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดที่มีการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษในครอบครัวเดียวกัน (HSCRfamilies) (Romeo *et al.* 1994; Ederly *et al.* 1994) และนับเป็นจุดเริ่มต้นซึ่งทำให้เกิดการรับรู้และเข้าใจถึงสาเหตุของการเกิดโรค โดยมีพยาธิสภาพบนยีน *RET*-protooncogene เป็นต้นเหตุของการเกิดโรค ยีน *RET* เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการอพยพ และการเจริญของ neural crest ภายในระบบประสาททางเดินอาหาร (enteric nervous system) (Paul K.H. Tam 2004)

ในยุคถัดมาได้มีการศึกษายีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดมากขึ้น โดยปัจจุบันพบการกลายพันธุ์ของหลายยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคดังกล่าว เช่น ยีน *GDNF*, *NRTN*, *PHOX2B*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECEL1*, *SOX10*, *ZFHX1B* เป็นต้น ยีนเหล่านี้เป็นยีนที่มีการเข้ารหัส (encode) โปรตีนที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของ enteric ganglia ทั้งสิ้น (Paul K.H. Tam 2004) แต่อย่างไรก็ตามยังมีเพียงรายงานประปรายถึงการพบการกลายพันธุ์ในกลุ่มของผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดซึ่งไม่มีประวัติถ่ายทอดทางพันธุกรรม กล่าวคือเป็น sporadic cases (Emison *et al.* 2005)

ยีน *SOX10* แม้ว่าไม่ใช่ยีนหลักที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดกลุ่ม sporadic แต่ก็ยังถือว่าเป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด จากหลักฐานซึ่งการแสดงออกที่ผิดปกติของยีน *SOX10* สามารถพบได้ในลำไส้ส่วนซึ่งขาดเซลล์ประสาทในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic (Paul K.H. Tam 2004) แต่ถึงกระนั้นก็ยังไม่เคยมีการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแปรผันทางพันธุกรรมในลักษณะ Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) หรือสลับบนยีน *SOX10* ในกลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic จากการศึกษาเบื้องต้นในผู้ป่วยจำนวนจำกัดสลับบนยีน *SOX10* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดชาวไทยพบว่าสลับตำแหน่ง rs139883 อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค (Phusantisampan *et al.*, รายงานยังไม่ได้ตีพิมพ์) และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ในขณะที่ในกลุ่ม

ประชากรชาวเอเชียการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบนยีน *RET* (*RET-protooncogene*) พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Sangkhathat *et al.* 2006) การศึกษายังพบว่าสลิปตำแหน่ง rs2435357 แอลลีล T มีความถี่ (frequency) สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Emison *et al.* 2010) การศึกษาเชิงหน้าที่การทำงานพบว่าการแปรผันทางพันธุกรรมบน rs2435357 สามารถขัดขวางการปฏิสัมพันธ์ระหว่าง SOX10 และ RET ส่งผลทำให้การแสดงออกของโปรตีน RET ลดลง (Emison *et al.* 2005; Emison *et al.* 2010; Garcia-Barcelo *et al.* 2005)

การศึกษาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphisms) ในผู้ป่วยด้วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดไทยแบบ sporadic ในปี 2006 แสดงให้เห็นการเกิดการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งมีรูปแบบที่แตกต่างในแต่ละคน (Sangkhathat *et al.* 2006) สลิปที่เกิดบนยีน *RET* สัมพันธ์กับการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดในประชากรที่แตกต่างกันในเด็กไทย (Phusantisampan *et al.* 2012) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะประเมินความสัมพันธ์ระหว่างสลิปที่เกิดบนยีน *SOX10* กับการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ชาวไทย และศึกษาปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อสลิป rs2435357 บนยีน *RET* ในผู้ป่วยกลุ่มเดียวกันนี้

การตรวจเอกสาร

โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Hirschsprung Disease; MIM 142623)

โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดหรือ aganglionic megacolon เป็นกลุ่มโรคที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีความซับซ้อนโดยมีลักษณะคือการขาดเซลล์ปมประสาท หรือ ganglion cell ซึ่งจะทำให้หน้าที่ในการควบคุมการบีบตัวของลำไส้ส่วนปลาย ดังนั้นเมื่อผนังลำไส้ขาดเซลล์ปมประสาท จึงส่งผลให้เกิดการอุดกั้นของกากอาหารในส่วนของลำไส้ซึ่งขาดเซลล์ปมประสาท และเกิดการโป่งพองของลำไส้ส่วนต้นและการอักเสบตามมา ส่วนสาเหตุของการขาดเซลล์ปมประสาทเชื่อว่าเกิดจากการหยุดการอพยพของ neural crest cell ซึ่งเป็นต้นกำเนิด (precursor) ที่สำคัญต่อการพัฒนาของระบบประสาทภายในทางเดินอาหาร (Gui *et al.* 2013) ปัจจุบันยังไม่มีการรักษาใดนอกจากการผ่าตัดนำส่วนที่ขาดเซลล์ปมประสาทนั้นออก ต้นกำเนิดของเซลล์ปมประสาทของทางเดินอาหารในมนุษย์จะเริ่มปรากฏเมื่ออายุครรภ์ได้ 5 สัปดาห์ ในรูปของ neural crest ที่ cervical vagal trunks ซึ่งเซลล์ต้นกำเนิดนี้จะเคลื่อนที่ไปตามแนวประสาท vagus ในทิศทางของ craniocaudal จนสามารถพบ neuroblasts ในชั้นกล้ามเนื้อของหลอดอาหารเมื่อตัวอ่อนอายุได้ 6 สัปดาห์ เซลล์ต้นกำเนิดของปมประสาทเคลื่อนที่ถึงลำไส้ใหญ่ส่วน mid-transverse colon ในสัปดาห์ที่ 8 และเคลื่อนที่ต่อไปจนถึงส่วนปลายสุดของทางเดินอาหารในสัปดาห์ที่ 12 เมื่อเคลื่อนที่ไปถึงผนังลำไส้ neural crest จะต้องมีการพัฒนาและแทรกตัวตามชั้นต่างๆของผนังลำไส้ เพื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์ปมประสาทที่เจริญเต็มที่ (mature ganglion cells) ในระบบประสาททางเดินอาหาร (enteric nervous system; ENS) ระบบประสาทอัตโนมัติภายในผนังทางเดินอาหารเป็นระบบที่มีความซับซ้อนทำงานเป็นอิสระในการควบคุมการเคลื่อนไหว การบีบตัว ตลอดจนการหลั่งสารคัดหลั่งต่างๆของลำไส้ ระบบประสาททางเดินอาหารประกอบด้วยเซลล์ปมประสาทที่สำคัญคือ myenteric plexus ที่แทรกตัวระหว่างชั้นของกล้ามเนื้อกับ submucous plexus ที่มีการกระจายอยู่บริเวณชั้นใต้เยื่อเมือก นอกจากนี้ยังมีการเลี้ยงด้วย (innervation) กลุ่มใยประสาทจากภายนอก (preganglionic fiber และ post-ganglionic fiber) ของระบบ sympathetic การบีบตัวและการคลายตัวของลำไส้จะถูกควบคุมโดยระบบประสาทภายในลำไส้เป็นหลัก รองลงมาคือ extrinsic innervation จากระบบประสาทอัตโนมัติที่เชื่อมโยงกับระบบประสาทส่วนกลาง รวมถึงอิทธิพลของฮอร์โมน

(Holschneider, Meier-Ruge, and Ure 1994) ทฤษฎีที่อธิบายถึงพยาธิกำเนิดโรคในผู้ป่วยส่วนใหญ่ เกิดจากการหยุดการอพยพหรือหยุดการเคลื่อนที่ของ neural crest cell โดยเมื่อมีการหยุดการอพยพ ในระดับใด ก็จะไม่พบ ganglion cells ในผนังลำไส้ที่อยู่ปลายต่อจากจุดนั้น สาเหตุของการหยุดการอพยพของ neural crest cell ยังไม่มีนักวิจัยท่านสามารถให้คำตอบที่แน่ชัด แต่หนึ่งในสมมุติฐาน จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์ พบการกลายพันธุ์ของหลายยีน เช่น *RET-protooncogene (RET)* และ ยีน *GDNF* ในวิถีสัญญาณ RET หรือการกลายพันธุ์ในวิถีสัญญาณ EDNRB และ ET-3 ที่ต่างก็ทำหน้าที่เกี่ยวกับการพัฒนาและการอยู่รอดของเซลล์ประสาท (neurotropic factor) (Amiel *et al.* 2008) และหลักฐานซึ่งชี้ว่า ปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic factor) เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค ได้แก่ ความเสี่ยงของการเกิดโรคที่เพิ่มขึ้นในบุตรหลานของผู้ที่เป็นโรคความไม่สมดุลของอูบัติการณใน เพศชายและหญิง (unbalanced sex-ratio) ความสัมพันธ์ของโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดกับ โรคทางพันธุกรรมอื่นๆ เช่น malformation syndromes ได้แก่ Waardenberg-Shar syndrome, Multiple endocrine neoplasia เป็นต้นและ chromosomal anomalies เช่น Down syndrome และมี หลักฐานในสัตว์ทดลองที่สามารถแสดงถึงการถ่ายทอดทางพันธุกรรม แบบเมนเดล (mendelian mendel) (Paul K.H. Tam 2004) พยาธิกำเนิดของการเกิดโรคเริ่มเป็นที่เข้าใจมากยิ่งขึ้น เมื่อมีการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (histopathology) ทำให้เกิดความเข้าใจถึงร่างแหประสาทภายในผนัง ลำไส้ (enteric nervous system) และยังสามารถค้นหาความผิดปกติของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคและเมื่อมีการศึกษาโดยวิธี Linkage analysis ในกลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดย กำเนิดแบบครอบครัว (HSCR families) โดยใช้โครโมโซมที่ 10 เป็น marker เผยให้เห็นตำแหน่ง pericentromeric region ภายในโครโมโซมที่ 10 และจากการคัดกษณะการแสดงออกของโรคลำไส้ ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด ในหนู mice พบการการกลายพันธุ์ระดับ germline ของยีน *RET* ใน ครอบครัวผู้เป็นโรค โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ families (Romeo *et al.* 1994; Edery *et al.* 1994) นับเป็นจุดเริ่มต้นที่มีการรับรู้และเข้าใจถึงสาเหตุของการเกิดโรค โดยมียีน *RET* เป็น ต้นเหตุของการเกิดโรคยีน *RET* หรือ *RET-protooncogene* เป็นยีนที่มีการแปลรหัสเป็น โปรตีน RET receptor tyrosine kinase ซึ่งเป็นโมเลกุลบนผิวเซลล์ ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ (receptor) ของ GDNF การทำงานของตัวรับ RET เกิดขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากโมเลกุลกลุ่ม neurotrophic

factor ที่มีความสำคัญต่อการอพยพ และการเจริญของเซลล์ (differentiation) ที่จำเป็นของ neural crest ภายในระบบประสาททางเดินอาหาร (Paul K.H. Tam 2004)

โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดและวิถีสัญญาณที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีการศึกษาขึ้นที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดมากขึ้นเรื่อยๆ โดยปัจจุบันพบการกลายพันธุ์ของหลายๆยีน เช่น *GDNF*, *NRTN*, *PHOX2B*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*, *SOX10*, *ZFHXB* และ ยีนอื่นๆ (ตารางที่ 1) ยีนเหล่านี้เป็นยีนที่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาและการเจริญของ enteric ganglia ทั้งสิ้น (Paul K.H. Tam 2004) การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคนำไปสู่ การหาความเชื่อมโยงของการทำงานและการรับส่งสัญญาณระหว่างยีน ได้แก่

1. วิถีสัญญาณ RET receptor tyrosine kinase

โปรตีน RET ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ของ Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) family โดยจะมีตัวรับที่ทำงานร่วมกัน (corrector) ได้แก่ GDNF-family receptor- α (Jing *et al.* 1996) การกระตุ้นการทำงานของตัวรับ RET ต้องผ่านกลุ่ม neurotrophic factors ที่สำคัญต่อการอพยพและการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดของ neural crest ภายในระบบประสาททางเดินอาหาร (Pachnis, Mankoo, and Costantini 1993; Taraviras *et al.* 1999) การพัฒนาที่ถูกต้องของระบบประสาททางเดินอาหารหรือ ENS จะขึ้นอยู่กับความสามารถของกลุ่ม neurotrophic factor ในการกระตุ้นตัวรับ RET

2. วิถีสัญญาณ Endothelin type B receptor

Endothelins เป็นกลุ่มของเปปไทด์ส่งสัญญาณ 3 ตัว (three signaling peptides) ได้แก่ EDN1, EDN2 และ EDN3 ซึ่งจะทำงานร่วมกับจีโปรตีน (G-protein) โดยมีตัวรับของ Endothelin-A และ Endothelin-B (EDNRA และ EDNRB) แสดงในรูปที่ 1 Endothelins จะถูกสังเคราะห์เป็นกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่และจะถูกตัด (cleaved) โดย endothelin converting enzyme

(ECE-1) เพื่อเป็นโปรตีนที่พร้อมจะทำงาน (active) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ววิถีสัญญาณตัวรับของ Endothelin-B ในโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดถูกค้นพบในหนูทดลองจะเกิดขึ้นเมื่อมีการขัดขวางเป้าหมาย (targets) ของยีน *endothelin-B receptor (Ednrb)* เป็นผลให้หนูทดลองมีลักษณะ (phenotype) ลำไส้ที่ขยายใหญ่และขาดเซลล์ประสาท หรือ aganglionic megacolon และมีค่างขาวบริเวณผิวหนัง (spotting of the coat) และพบการแสดงออกเช่นเดียวกันกับการขัดขวางการทำงานของยีน *endothelin-3 ligand (Edn3)* ซึ่งการค้นพบนี้นำไปสู่ความเข้าใจบทบาทของวิถีสัญญาณ (pathway) ของ EDNRB ในการพัฒนาของ neural crest-derived cell lineages ได้แก่ enteric neurons และ epidermal melanocytes (Baynash *et al.* 1994; Hosoda *et al.* 1994)

ตารางที่ 1 แสดงยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Paul K.H. Tam 2004)

ยีน	อัตราการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย	phenotype
<i>RET</i>	~50% familial cases; 7%-35% sporadic cases	HSCR (isolate หรือ syndromic)
<i>GDNF</i>	1 case	HSCR
<i>NRTN</i>	1 case	HSCR
<i>EDNRB</i>	~7%	HSCR หรือ WS4
<i>EDN3</i>	<5%	HSCR หรือ WS4
<i>ECE-1</i>	1 case	Syndromic HSCR
<i>SOX10</i>	17 cases	WS4
<i>ZFHX1B</i>	<1%	Syndromic HSCR
<i>PHOX2B</i>	12 cases	Haddad syndrome

โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดและยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ RET

บทบาทที่สำคัญของยีน *RET* ในโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมยีน *RET* นำไปสู่ลักษณะการแสดงออกของ aganglionosis และยังไม่ใช่นยีนทั้งหมดที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการ (process) ที่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานอย่างชัดเจน การค้นหาโมเลกุลที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมยีน *RET* กำลังจะเป็นที่กระจ่างมากขึ้น โดยมีโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดเป็นต้นแบบ

1. ยีน *SOX10*

ยีน *SOX10* เป็นยีนที่มีการแปลรหัสเป็นตัวควบคุมการถอดรหัส (transcriptional regulator) ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของ neural crest lineage ประกอบด้วยเซลล์สร้างเม็ดสี (melanocytes) และเซลล์ประสาท (enteric neurons) ในระหว่างการเจริญของระบบประสาทของทางเดินอาหาร โปรตีน SOX10 จะมีปฏิสัมพันธ์ (interaction) และทำงานร่วมกับ transcriptional regulator ตัวอื่นๆ เช่น *PAX3* ในการกระตุ้นการทำงานของยีน *RET* และจากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบถึงพันธุศาสตร์และการทำงานของ *SOX10* ที่มีการกระตุ้นการทำงานผ่านยีน *EDNRB* ในหนู mice อีกด้วย (รูปที่ 1) (Paul K.H. Tam 2004; Lang and Epstein 2003; Lang 2000) การค้นพบความสำคัญของยีน *SOX10* เป็นการค้นพบโดยบังเอิญในระหว่างการสร้างหนูทดลองที่เป็นลำไส้ใหญ่โป่งพอง (*Dom*) ที่ถูกสร้างขึ้นมาสำเร็จจากห้องปฏิบัติการ Jackson Laboratory (Lane and Liu 1984) โดยค้นพบโมเลกุลที่มีความบกพร่องในหนูลักษณะ *Dom* mice พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *SOX10* หนูที่มีลักษณะ heterozygous *Dom* mice มีพยาธิสภาพเป็น distal colonic aganglionosis และมีหย่อม hypomelanosis ของผิวหนังและเส้นผม (ลักษณะคล้ายกับกลุ่มอาการ Waardenburg's syndrome) ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่า neural crest-derived melanocytes และระบบประสาททางเดินอาหารได้รับผลกระทบจากการกลายพันธุ์ของยีน *SOX10* และหนู mice ที่มีลักษณะ homozygous *Dom* นั้นส่วนใหญ่จะตายตั้งแต่ระยะตัวอ่อน

ส่วนในมนุษย์มีรายงานระบุถึงการกลายพันธุ์ของยีน *SOX10* แบบ heterozygous ทั้งหมด 17 ตำแหน่งในผู้ป่วยกลุ่มอาการ Waardenburg's Shah syndrome (WS4; HSCR type2) ผู้ป่วยที่มี

อาการในกลุ่ม WS4 จะมีการรวมกันของลักษณะในกลุ่มอาการ Waardenburg's syndrome (ลักษณะของจมูกที่มีสันใหญ่ มีความผิดปกติของการสร้างเม็ดสี (pigmentary abnormalities) และสูญเสียการได้ยิน) และโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Southard-Smith *et al.* 1999; Pingault *et al.* 1998) การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *SOX10* ในมนุษย์เป็นผลให้เกิดการตัดสั้น (truncation) ของโปรตีน *SOX10* โดยส่วนใหญ่แล้วการตัดสั้นของโปรตีนจะไปลดกระบวนการถอดรหัส (transcription activity) ในลักษณะ dominant negative effect (Paul K.H. Tam 2004) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่พบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย isolated trait หรือ sporadic และดูเหมือนว่ายีน *SOX10* อาจจะไม่ใช่อินหลักในกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มนี้ (Emison *et al.* 2005) แต่เป็นที่น่าสนใจว่า แม้จะไม่มี การกลายพันธุ์ของยีน สามารถพบการแสดงออกที่ผิดปกติของยีน *SOX10* ได้ในลำไส้ส่วนมีการขาดหายไปของเซลล์ประสาทในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic (Sham *et al.* 2001)

2. ยีน *PHOX2B*

PHOX2B หรือ *Paired mesoderm Homobox 2b* เป็นยีนที่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีนกลุ่ม Transcription factors ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาตัวของหลายๆเซลล์ประสาทในกลุ่ม noradrenergic neuron ในหนู mice ที่มีลักษณะ homozygous การขัดขวางการทำงานของยีน *PHOX2B* ส่งผลให้ไม่มีเซลล์ประสาท (enteric ganglia) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Dubreuil *et al.* 2000) และยังพบว่าไม่พบการแสดงออกของยีน *RET* ในหนูระยะตัวอ่อน ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *PHOX2B* ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่าการทำงานของยีน *RET* ถูกควบคุมโดยยีน *PHOX2B* โดยดูจากข้อมูลของการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหาร (Brunet and Pattyn 2002; Pattyn *et al.* 1999) อย่างไรก็ตามรายละเอียดของกลไก (mechanism) ของโปรตีน *PHOX2B* ที่เปลี่ยนแปลงการทำงานของยีน *RET* ยังไม่ทราบแน่ชัด และยังเป็นที่น่าสนใจว่า การเปลี่ยนแปลงระดับโครโมโซมที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการกลายพันธุ์แบบขาดหาย (deletion) ของยีน *PHOX2B* ที่เคยมีการอธิบายก่อนหน้านี้ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด syndromic (Benailly *et al.* 2003) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า *PHOX2B* haploinsufficiency อาจจะนำไปสู่การเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด รวมถึงยังมีรายงานการเกิดความหลากหลายทาง

พันธุกรรม หรือ polymorphism ที่สัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อการเกิดโรคในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อโง่งงโดยกำเนิดแบบ sporadic อีกด้วย

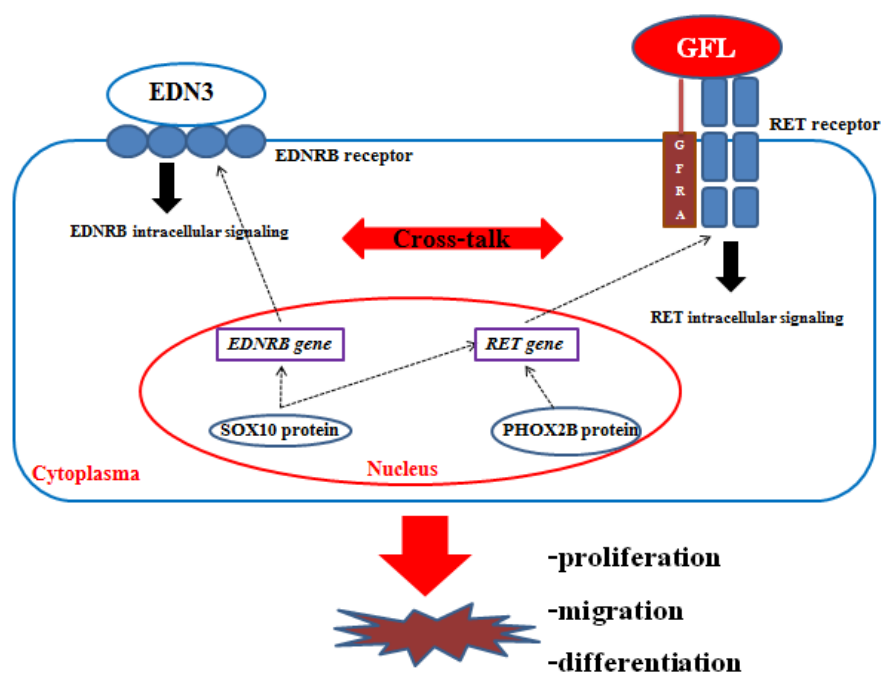
ยีน *PHOX2B* เป็นตัวแทนของยีนแรกสำหรับการเกิดการกลายพันธุ์ชนิด germline ที่ส่งผลให้เกิดเนื้องอก neuroblastoma (Trochet *et al.* 2004; Mosse *et al.* 2004) และเป็นตำแหน่งที่มีรายงานการเกิดของกลุ่มอาการ congenital central hypoventilation syndrome (CCHS หรือ Ondine's curse) (Amiel *et al.* 2003) และเป็นที่น่าสนใจอีกว่า ทั้ง neuroblastoma และกลุ่มอาการ CCHS ยังมีระดับวิทยาซึ่งสัมพันธ์กับโรคกล้ามเนื้อโง่งงโดยกำเนิด (Masumoto *et al.* 2002; Rohrer *et al.* 2002) และประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยกลุ่มอาการ CCHS เป็นผลมาจาก aganglionosis (Haddad syndrome) และการกลายพันธุ์บางตำแหน่งบนยีน *RET*, *BDNF* และยีน *GDNF* (Kanai *et al.* 2002; Sakai *et al.* 1998; Weese-Mayer *et al.* 2002)

3. ยีน *ZFX1B*

จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของ *ZFX1B* บริเวณตำแหน่งโครโมโซมที่ 2q22 ในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อโง่งงโดยกำเนิด, microcephaly, ปัญญาอ่อน (mental retardation), โรคลมบ้าหมู (epilepsy) และลักษณะที่ปรากฏออกมาบริเวณใบหน้า นำไปสู่การบันทึกเริ่มแรกของยีน *ZFX1B* ที่มีความเกี่ยวข้องกับรูปแบบการเกิดของโรคกล้ามเนื้อโง่งงโดยกำเนิด (Nagaya *et al.* 2002) ความผิดปกติของโครโมโซมอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับโครโมโซมที่ 2q22 และการเกิดการกลายพันธุ์ในยีน *ZFX1B* เริ่มมีการอธิบายในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกที่คล้ายๆกัน แต่ไม่ใช่ทั้งหมดที่จะมีลักษณะ aganglionosis (Yamada *et al.* 2001; Amiel *et al.* 2001)

ZFX1B จะแปลรหัสมาเป็นโปรตีน transcriptional repressor ได้แก่ Smad interacting protein 1 หรือ SIP1 ซึ่งจะมีปฏิสัมพันธ์กับกลุ่มของ Smad family ซึ่งโปรตีนบางตัวของ Smad จะมีการแปลงสัญญาณ (transducers) ในวิถีสัญญาณของ cascades ที่จำเป็นต่อ embryogenesis ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าการกลายพันธุ์ใน *ZFX1B* จะส่งผลอย่างไรต่อระบบประสาททางเดินอาหาร แม้ว่าจะอาจมีความเป็นไปได้ถึงความสัมพันธ์ที่เชื่อมโยงกันระหว่าง SIP1 และเครือข่ายที่จำเป็นต่อการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหาร เช่นเดียวกับยีน *SOX10* ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย

โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ด้วยเหตุนี้ยีน *ZFHX1B* จึงอาจไม่ใช่ยีนที่บ่งชี้ถึงโรคที่สำคัญในผู้ป่วย non-syndromic HSCR

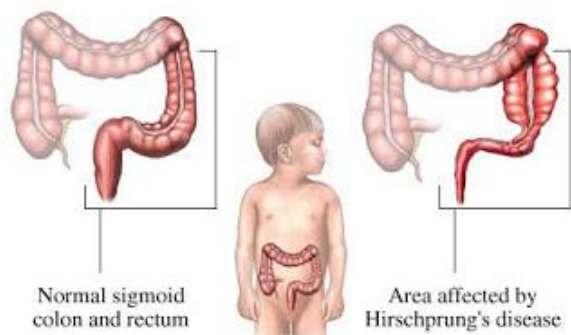


รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงเครือข่าย (network of interaction) ในระหว่างการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหาร (enteric nervous system) โดยการกระตุ้นของ SOX10 ผ่าน *RET* และ *EDNRB* (ดัดแปลงจาก Tam and Garcia-Barcelo.2009)

ระบาดวิทยาของโรค (Epidemiology)

โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด เป็นโรคที่มีความผิดปกติด้านพัฒนาการโดยมีการขาดหายไปของ ganglion cell หรือเซลล์ประสาทตามส่วนต่างๆของลำไส้ เป็นผลให้เกิดการอุดตันตามส่วนต่างๆของลำไส้ (รูปที่ 2) อุบัติการณ์การเกิดโรคพบประมาณ 1 ต่อ 5,000 รายของทารกแรกเกิดมีชีพทั่วโลก อุบัติการณ์การเกิดโรคในแต่ละเชื้อชาติจะแตกต่างกัน ได้แก่ Caucasians, African-American, และ Asians คือ 1.5, 2.1 และ 2.8 ต่อประชากรทารกแรกเกิดมีชีพ 10,000 คน ตามลำดับ (Torfs and Christianson 1998) พบอัตราส่วนเพศหญิงเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยซึ่งความยาวของ aganglionosis เพิ่มขึ้น (L-HSCR) (Badner *et al.* 1990) (ตารางที่ 2)

อุบัติการณ์ในประเทศไทยจาก Thai index medicus ยังไม่มีผู้รายงานไว้ แต่พบว่าผู้ป่วยมีประวัติเป็นโรคในสายตระกูล (familial cases) ตั้งแต่ 4 – 8 % ความเสี่ยงในการเกิดโรคในผู้มีประวัติครอบครัวมากขึ้นตามความยาวของ aganglionic segment กล่าวคือโอกาสที่จะเป็นซ้ำในบุตรคนถัดไปมีประมาณ 5% และผู้เป็นโรคมีความเสี่ยงที่จะถ่ายทอดให้บุตรราว 2% ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพไม่เกิน rectosigmoid region (short segment disease) ขณะที่โอกาสถ่ายทอดสู่ลูกสูงถึง 20 – 30% ในรายที่เป็น long segment aganglionosis (Skinner 1996) และยังพบความผิดปกติร่วมที่บ่อยที่สุดคือ กลุ่มอาการดาวน์ (Down syndrome) ร้อยละ 2-10 (Amiel *et al.* 2008) ส่วนความผิดปกติอื่นๆมีอุบัติการณ์ที่แตกต่างกันไป (Ryan *et al.* 1992; Skinner 1996) ความผิดปกติที่พบบ่อยได้แก่ ระบบหัวใจและหลอดเลือด กะโหลกศีรษะและใบหน้า และระบบทางเดินปัสสาวะ เป็นต้น



รูปที่ 2 แสดงความผิดปกติของลำไส้ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (ที่มา: รูปภาพ
จาก <http://worldourhealth.blogspot.com>)

ตารางที่ 2 แสดงอุบัติการณ์การเกิดและการกลับเป็นซ้ำในรุ่นลูกของโรคกล้ามเนื้อหัวใจโตใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Amiel *et al.* 2008)

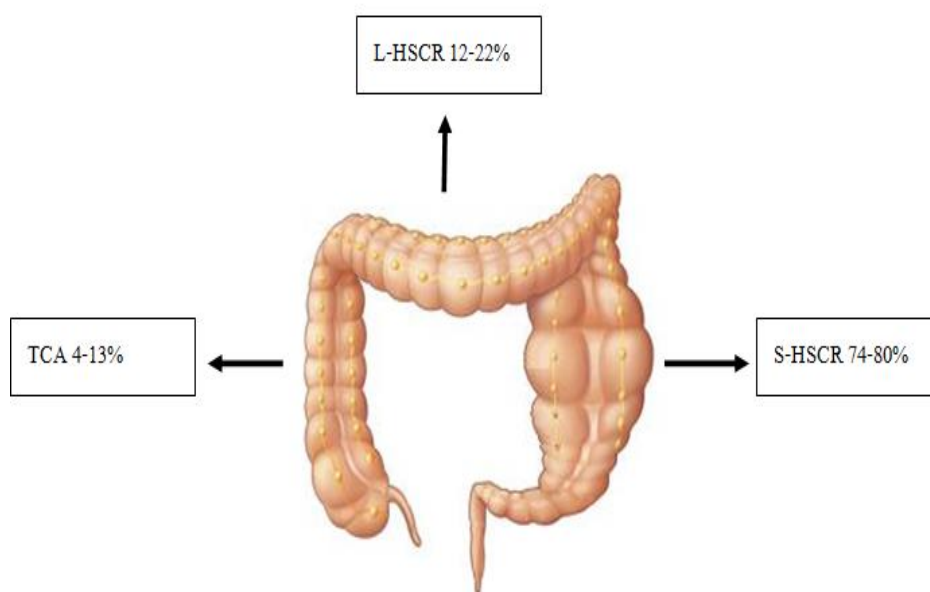
	L-HSCR (Long segment disease)	S-HSCR (Short segment disease)
%probands	19	81
Sex ratio (ชาย:หญิง)	1.75	5.5
Genetic model	Dominant	Multigenic or recessive
Penetrance (%) (ชาย:หญิง)	52:40	17:4
Recurrence risk to sibs (%)		
Male proband	17/13	5/1
Female proband	33/9	5/3

พยาธิสภาพของโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด สามารถจำแนกออกได้เป็นสามกลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

(1) Short-Segment Hirschsprung disease หรือ S-HSCR พบประมาณ 80% ของผู้ป่วย มีจุดเริ่มต้นของลำไส้ส่วนขาดเซลล์ปมประสาทไม่เกินส่วน rectosigmoid หากสูงไปกว่านี้จัดอยู่ในกลุ่ม

(2) Long-Segment Hirschsprung disease หรือ L-HSCR พบประมาณ 20% ของผู้ป่วย

(3) Total colonic aganglionosis หรือ TCA พบประมาณ 5% คือมีจุดที่ขาดเซลล์ปมประสาทสูงถึงส่วน cecum (รูปที่ 3) (Amiel and Lyonnet 2001)



รูปที่ 3 แสดงการกระจายของระดับการขาดเซลล์ปมประสาทในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (ที่มา: รูปภาพดัดแปลงจาก <http://colorectalsurgeonssydney.com.au>)

พันธุศาสตร์ของการเกิดโรค (Genetic background)

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้มีประวัติครอบครัวพบการถ่ายทอดได้หลายรูปแบบ อาทิเช่น autosomal dominant, autosomal recessive, x-link recessive หรือ แบบ polygenic ขณะที่ในกลุ่มผู้ป่วยแบบ sporadic มีลักษณะที่ซับซ้อน ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล มีลักษณะ penetrance ที่ต่ำและยังมีปัจจัยเรื่องเพศเข้ามาเกี่ยวข้อง (Amiel *et al.* 2008) การศึกษาในระดับโมเลกุลทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของยีนกับโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดได้แก่ ยีน *RET* บนโครโมโซมคู่ที่ 10 (10q11.2) อย่างที่กล่าวแล้วข้างต้น ร่วมกับยีนอื่นๆที่พบการกลายพันธุ์ในผู้เป็นโรค โดยการศึกษาทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง *RET* มีตัวจับ (ligand) บนผนังเซลล์ได้แก่ *GDNF* จากการทดลองในหนูที่มีการขาดหายของ *GDNF* พบว่า ทำให้ไม่มีการพัฒนาของเซลล์ปมประสาทและรวมถึงไม่มีการเจริญของเซลล์ไตอีกด้วย และโปรตีน *EDNRB* ซึ่งเป็นตัวรับอีกตัว มีตัวจับคือ *ET-3* ที่มีความสำคัญต่อการอพยพของ neural crest cell โดยการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *EDNRB* พบในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดประมาณร้อยละ 5 (Amiel *et al.* 2008) และการกลายพันธุ์ของยีน *ET-3* พบได้น้อย นอกจากนี้ยังมีวิถีสัญญาณ (pathway) อื่นๆ ที่มีการรายงานในโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดเช่น ยีน *SOX10* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม *SRY*(sex-determining factor)-like, high mobility group (HMG) DNA binding protein (Amiel *et al.* 2008) จากการรายงานการศึกษาในคนไข้โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดชาวไทยจำนวน 41 ราย พบการกลายพันธุ์แบบ missense ของยีน *RET* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ประมาณ 7.3% การกลายพันธุ์ในยีน *EDNRB* และยีน *ET-3* ในผู้ป่วย 1 และ 2 รายตามลำดับ แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *GDNF* และยีน *SOX10* (Sangkhatthath *et al.* 2006)

การศึกษาในช่วงหลัง นอกจากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่ส่งผลกับการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนต่างๆกับการเกิดโรคอีกด้วย ส่วนหนึ่งจากงานวิจัย ได้แก่ ยีน *RET* เป็นยีนหลักที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคตามที่กล่าวมาแล้ว โดยส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการมี rare และ common variant ที่เกิดขึ้นภายในยีน ทั้งในส่วนที่มีการแปลรหัส (coding) และไม่แปลรหัส (non-coding) รวมถึงปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเกิดโรค โดยมีหลักฐานการศึกษาในประชากรไทยพบว่าสปีท์ที่พบบนยีน *RET*

ตำแหน่ง rs2435357 และ *NRG1* ตำแหน่ง rs2439305 พบว่ามีความสัมพันธ์ต่อกันและมีความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นต่อการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดในประชากรไทย (Phusantisampan *et al.* 2012) และยังมียีนอื่นๆที่ได้มีการระบุว่าพบ rare coding mutation และมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค เช่น *GDNF*, *NRTN*, *PSPN*, *EDNRB*, *EDN3*, *ECE1*, *NTF3*, *NTRK3*, *SOX10*, *PHOX2B*, *LICAM*, *ZFH1B*, *KIAA1279*, *TCF4*, *PROK1*, *PROKR1* และ *PROKR2* (Amiel *et al.* 2008; Emison *et al.* 2010; Ruiz-Ferrer *et al.* 2008; Ruiz-Ferrer *et al.* 2011)

ยีน *NRG1* (8p12) เป็นยีนซึ่งแปลรหัสสำหรับโปรตีน neuregulin 1 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหาร (enteric nervous system; ENS) และยังพบ rare และ common variant ในยีนนี้อีกด้วย จากการรายงานก่อนหน้านี้พบว่าสปีทั้งหมด 243 ตัวบน *NRG1* ที่พบในคนไข้โรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดของประชากรจีน เมื่อวิเคราะห์แบบ genotype analysis narrowed down พบว่ามี 6 สปีที่ส่งผลต่อ *NRG1* promoter ได้แก่ rs16879552, rs7835688, rs10088313, rs10094655, rs4624987 และ rs3884552 และพบว่ามียีนผลต่อการแสดงออกของ *NRG1* ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน rs10088313 ที่ดูเหมือนว่าเป็น risk genotype (Tang *et al.* 2011) และจากการรายงานการวิเคราะห์ยีน *NRG1* แบบครอบคลุม (comprehensive) ในกลุ่มของผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดชาวสเปน จำนวน 207 คน โดยจะค้นหาการกลายพันธุ์ของยีนบริเวณที่มีการแปลรหัส (coding sequence) รวมถึงประเมิน common tag SNPs 3 ตัว และค้นหา rare variant ที่มีผลต่อหน้าที่การทำงานของยีน การศึกษาพบว่า rare variant มีความสัมพันธ์กับการสร้างโปรตีน *NRG1* ที่ลดลงและการวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน *NRG1* อาจจะบอกถึงความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่ไม่ใช่เจอในประชากรจีนเท่านั้นแต่ยังเจอในประชากรผิวขาว (caucasian) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องระหว่างยีน *NRG1* กับการเกิดโรค (Luzon-Toro *et al.* 2012)

การศึกษา rare และ common variant (RV, CV) ของยีน *RET* และ *NRG1* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ชาวจีน 254 ราย โดยการวิเคราะห์แบบ logistic regression และ pair-wise Kendall correlations พบความสัมพันธ์ระหว่าง common และ rare variant

บนยีน *RET* หรือ common และ rare variant บนยีน *NRG1* กับการเกิดโรค และพบว่ายังส่งผลต่อการทำงานของ neural crest cell (NCC) ที่แย่งอีกด้วย (Gui *et al.* 2013)

นอกจากโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแล้ว ยังมีการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างสลับบนยีน *SOX10* ตำแหน่ง rs139883 กับโรคความผิดปกติทางระบบประสาทอื่นๆ อีกด้วย ได้แก่โรคจิตเภท (Schizophrenia) ที่ศึกษาในประชากรญี่ปุ่น พบว่าสลับตำแหน่ง rs139883 และ rs139887 มีความสัมพันธ์กับอายุขณะเริ่มเกิดอาการของผู้ป่วยโรคจิตเภทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yuan *et al.* 2013) อย่างไรก็ตามยังไม่มียีนที่วิจัยท่านใดได้เคยรายงานถึงความสัมพันธ์ของการเกิด Single Nucleotide Polymorphisms หรือสลับบนยีน *SOX10* กับกลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบsporadic จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสลับของยีน *SOX10* ในผู้ป่วยด้วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดไทย โดยธีรวิทย์ ภูสันติสัมพันธ์ พบว่าสลับตำแหน่ง rs139883 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รายงานยังไม่ได้ตีพิมพ์)

ยีนที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้และการรายงานความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้อง

ยีน *RET* (MIM 164761)

ยีน *RET* เป็นตัวรับไทโรซีนไคเนส (receptor tyrosine kinase) ที่ประกอบด้วย 21 เอกซอน (รูปที่ 4) บนโครโมโซมที่ 10q11 (รูปที่ 4) ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 1,114 ตัวทำหน้าที่เป็นตัวรับของ Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) การทำงานของตัวรับ *RET* จะถูกกระตุ้นผ่านโมเลกุลกลุ่ม neurotrophic factor ซึ่งมีความสำคัญต่อการอพยพ และการเจริญ (differentiation) ของ neural crest cell ที่จะพัฒนาไปเป็นระบบประสาททางเดินอาหาร (Paul K.H. Tam 2004)

การกลายพันธุ์ระดับ germline ของยีน *RET* มีความสัมพันธ์กับกลุ่มอาการของโรคในมนุษย์ ได้แก่ HSCR, MEN2A, MEN2B และกลุ่มอาการ Medullary Thyroid Carcinoma (MTC)

ตัวรับ RET เป็น single pass transmembrane protein ที่ประกอบด้วยสองโดเมนหลักได้แก่ extracellular (EC) ที่มี cadherin-like domain (CAD) และกลุ่มของ cysteine rich region (CYS) ส่วน intracellular (IC) ประกอบด้วย tyrosine kinase domain (TK) (รูปที่ 5) รวมถึงยังมีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการระบุถึงการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *RET* ในผู้ป่วยด้วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพอง โดยกำเนิด จากการศึกษานี้ใน 20 เอซอน ของยีน *RET* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic จำนวน 45 รายและผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ familial จำนวน 35 รายโดยวิธี denaturing gradient gel electrophoresis และ SSCP พบการเกิดการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ familial 50 % โดยไม่คำนึงถึงความยาวของ aganglionic segment และมีค่าเฉลี่ย penetrance ของแอลลีลที่มีการกลายพันธุ์ที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยเพศชาย คือ 72% ซึ่งมากกว่าในเพศหญิงที่พบเพียง 51% การเกิดการกลายพันธุ์ที่มีการกระจายทั่วไปบนยีน *RET* พบอย่างน้อย 1 ใน 3 ของผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic และพบการกลายพันธุ์ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน (novo mutation) ในผู้ป่วย 7 ราย การศึกษานำไปสู่ข้อสรุปที่ว่า การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นมี penetrance ที่ต่ำ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง genotype/phenotype การกลายพันธุ์บนยีน *RET* จะขึ้นอยู่กับเพศ และความแปรปรวนของอาการทางคลินิกสามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ familial (Attie *et al.* 1995)

และเช่นเดียวกันการวิเคราะห์ยีน *RET* โดย SSCP พบการกลายพันธุ์ 7 ตำแหน่งในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic และแบบ familial จำนวน 39 ราย (detection rate 18%) และพบว่า การตรวจสอบการกลายพันธุ์ไม่มีประสิทธิภาพพอสำหรับการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic heterogeneity) โดยไม่สามารถไปสนับสนุนผลการศึกษาความเชื่อมโยง (linkage analysis) ในการวิเคราะห์พงสาวดารสายตระกูล (pedigrees) การเกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation มากกว่า 74% แต่มีการระบุแค่ 25% ในกลุ่มผู้ป่วย long segment (Seri, Yin, *et al.* 1997) และจากรายงานการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 260 ถูกแทนที่จากกรดอะมิโนชนิดอื่นไปเป็นอาร์จินีน (C620R) ในผู้ป่วย Total Colonic Aganglionosis; TCA และพบการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าวในผู้ป่วย medullary thyroid carcinoma การศึกษายังได้ระบุถึงการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 313 มีการเปลี่ยนจากอาร์จินีนไป

เป็นกลูตามีน (R313Q) ในเด็กทารกแรกเกิดที่มีสายตระกูลเดียวกันและยังมีความสัมพันธ์กับลักษณะการแสดงออกโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดในกลุ่ม Total Colonic Aganglionosis อีกด้วย (Seri, Celli, *et al.* 1997)

การศึกษาในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดในประชากรชาวแอฟริกาใต้ที่มีหลากหลายทางเชื้อชาติ จำนวน 40 ราย พบมีการกลายพันธุ์บนยีน *RET* ในผู้ป่วยจำนวน 8 ราย หรือคิดเป็น 20 % และเป็น การกลายพันธุ์ที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อน 5 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการรายงานการกลายพันธุ์ในกลุ่มคนผิวดำ และการศึกษายังมีผู้ป่วยที่ใช้ร่วมการศึกษาจำนวนน้อยและยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับวิธีการค้นหา (screening method) รวมถึงความแตกต่างทางด้านพันธุศาสตร์ (different genetic basis) (Julies *et al.* 2001)

จากการทบทวนเอกสารที่กล่าวถึงยีน *RET* ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด มีรายงานในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ familial เพียง 1 ราย ที่ไม่เชื่อมโยงกับ *RET* แต่มีการรายงานระบุถึงการเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่มีการแปลรหัสในกลุ่มผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ familial 50% และ 15-35% ในกลุ่มผู้ป่วยแบบ sporadic ในขณะที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมมากในยีน *GDNRB* และ *RET* ที่ส่งผลต่อการเกิดโรค การเกิดการกลายพันธุ์บนยีน *RET* ยังไม่เป็นที่กระจ่างพอที่จะนำไปสู่สาเหตุของการขาดหายไปของเซลล์ปมประสาท และ penetrance ของการกลายพันธุ์ในเพศชายอยู่ที่ 65% และเพศหญิงอยู่ที่ 45% และอาจกล่าวได้ว่ายีน *RET* เป็นยีนที่มีบทบาทในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ familial ในกลุ่ม Long-segment HSCR (Gabriel *et al.* 2002) เพื่อระบุยีนที่มีบทบาทต่อการถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่ซับซ้อนในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ familial (complex inheritance) แบบ Short-segment การศึกษาได้ระบุถึงตำแหน่งที่มีความอ่อนไหว ได้แก่ โครโมโซมที่ 3q21, 10q11 และ 19q12 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เพียงพอต่อการอธิบายความเสี่ยงที่จะกลับมาเป็นซ้ำในผู้ป่วยและอุบัติการณ์ในประชากร โครโมโซมตำแหน่ง 10q11 ที่อยู่บนยีน *RET* พบว่าเป็นตำแหน่งที่มีบทบาทในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดในทุกๆรูปแบบ อย่างไรก็ตามยังมีการพบการกลายพันธุ์บนยีน *RET* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ familial ในตำแหน่งที่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่พบเพียง 40% เท่านั้น ที่เหลือเกิดจากความหลากหลาย

ทางพันธุกรรม หรือ variant ในตำแหน่งที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน (non-coding) (Gabriel *et al.* 2002)

การศึกษาเพื่อประเมินการทำงานของสปีในตำแหน่ง RET promoter haplotype ที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธีสารเรืองแสง dual-luciferase assay ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด 80 ราย ที่ประกอบไปด้วยความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือ polymorphism ในบริเวณ RET promoter 2 ตำแหน่ง ได้แก่ -5G-A และ -1CA พบว่าตำแหน่ง -5G-Apolymorphism มีความสัมพันธ์ linkage disequilibrium กับ polymorphism ตำแหน่ง 135G-A และยังพบว่า -5G-A และ -1CA มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคและยังส่งผลต่อการลดการแสดงออกของยีน *RET* อีกด้วย จากการศึกษาสามารถสรุปผลได้ว่า *RET* haplotypes ที่มี -5G-A promoter variant เป็นสาเหตุของการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Fitze *et al.* 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาในประชากรชาวจีน พบความสัมพันธ์ของ -5G-A และ -1CA promoter variant กับการเกิดโรคเช่นเดียวกัน โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบsporadic จำนวน 172 ราย และทำการศึกษา SNPs overlapped เพื่อที่จะคาดเดาการทำงานและตำแหน่งจับของ TTF1-binding site การศึกษาพบว่าสปีบริเวณ promoter มีความสัมพันธ์กับการลดการแสดงออกของยีน *RET* และการแสดงออกของ TTF1 จะกระตุ้นการถอดรหัสของ RET promoter ซึ่งการทำงานของ TTF1 จะลดลงเมื่อมีสปีบริเวณ RET promoter ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Garcia-Barcelo *et al.* 2005)

การศึกษาเครื่องหมาย (marker) 13 ตัว บนยีน *RET* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบsporadic ชาวดัตช์ จำนวน 117 ราย พบเพียง 6 ตัวบ่งชี้ ในบริเวณ 5'UTR ที่มีความสัมพันธ์กับยีน *RET* และผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด และ 6 ตัวบ่งชี้ยังเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคโดยมีค่า OR มากกว่า 20 (Burzynski *et al.* 2004) และการศึกษาจากคณะเดียวกันสรุปว่าหากไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *RET* แต่ยังคงพบ variants ที่อยู่บริเวณ promoter และเอกซอนที่ 2 ของยีน *RET* ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic กลุ่มนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย

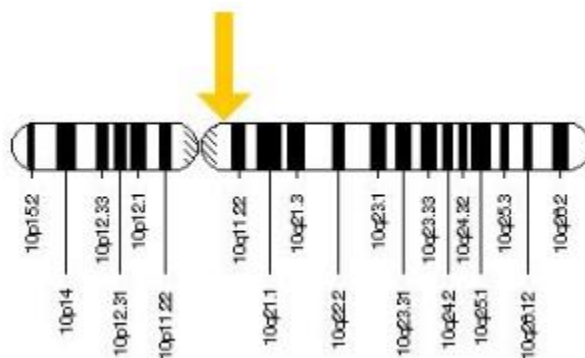
นอกจากการศึกษาที่มีการรายงานการเกิดการกลายพันธุ์บนยีน *RET* ที่พบมากกว่า 50% ในผู้ป่วย familial HSCR และพบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic บนยีน *RET* บริเวณส่วนที่มีการแปลรหัสมากกว่า 20% อย่างไรก็ตามหากไม่มุ่งประเด็นการกลายพันธุ์ของ *RET* locus ยีนดังกล่าว ยังมีความเชื่อมโยงอื่นๆกับผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดโดยเฉพาะ familial และมีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ในกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่ ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ในส่วนที่มีการแปลรหัส ตัวอย่างเช่น การพบ SNPs haplotype ในส่วนของ 5'UTR บนยีน *RET* ในประชากรชาวยุโรป (European) (Borrego *et al.* 2003)

การศึกษาเพื่อค้นหาการกลายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณที่มีการแปลรหัสไปเป็นโปรตีนบนยีน *RET* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดชาวสเปนจำนวน 106 ราย โดยเปรียบเทียบการกระจายตัวของ *RET* haplotype ระหว่างผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic กับกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *RET* พบการกลายพันธุ์ชนิด germline ที่เคยมีการรายงาน 9 ตำแหน่ง และอีก 1 ตำแหน่งเคยรายงานมาแล้วจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Ruiz-Ferrer *et al.* 2006) และยังมีการศึกษาพบว่าสลับตำแหน่ง promoter -200A/-196C มีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fernandez *et al.* 2005)

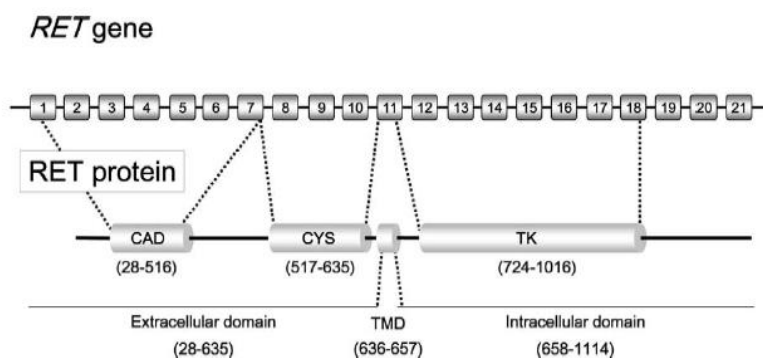
การศึกษาในปี 2005 พบความหลากหลายทางพันธุกรรมบริเวณที่ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีนบนยีน *RET* ในอินทรอนที่ 1 สลับ rs2435357 (IVS1C-T) พบมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และตำแหน่งดังกล่าวยังมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคถึง 20 เท่า เมื่อเทียบกับ rare alleles ที่ได้จากการศึกษาและจากการศึกษาในหลอดทดลอง ความหลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่งนี้ ยังมีผลไปลดการทำงานของ enhancer *RET* และยังพบว่ามิ penetrance ที่ต่ำ รวมถึงมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในเพศชายและเพศหญิง ซึ่งเป็นการอธิบายลักษณะรูปแบบที่ซับซ้อนของการถ่ายทอดทางพันธุกรรม การศึกษาได้สรุปว่าการกลายพันธุ์ของยีน *RET* ทั้งในส่วนที่มีการแปลรหัสและไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีน เป็นไปได้ถึงความสำคัญในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดทุกๆแบบ อย่างไรก็ตามยังได้กล่าวอีกว่าการ

กลายพันธุ์ของยีน *RET* ไม่เพียงพต่อการเกิดโรคเนื่องจากต้องการพยาธิสภาพบนยีนอื่น ๆ หรือตำแหน่งอื่น ๆ ร่วมด้วย (Emission *et al.*, 2005)

การศึกษาในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด 882 probands และ 1,478 first-degree ที่สัมพันธ์ในชาวอเมริกันชาวยุโรป และครอบครัวชาวจีน พบสภาวะตำแหน่ง rs2435357 ที่สัมพันธ์กับชาวยุโรปและชาวจีนและยังเพิ่มความถี่ต่อการเกิดโรคในกลุ่มประชากรดังกล่าว (Emission *et al.*, 2010) และการศึกษาในปี 2010 เพื่อดูผลของสภาวะ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ rs10900296 (-5G-A), rs10900297 (-1A-C) บริเวณ promoter และ rs2435357C-T ในอินทรอนที่ 1 ใน ganglionic gut tissue โดยใช้ real-time PCR และทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทป์โดย PCR และการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทป์ (direct sequencing) ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดชาวจีน 315 ราย และกลุ่มควบคุม 325 ราย โดยกำหนดให้มีเชื้อชาติที่สอดคล้องกัน (ethnically match) การแสดงออกของ *RET* mRNA ใน ganglionic gut tissue สัมพันธ์กับจีโนมไทป์ของแต่ละคน และมีการแสดงออกของ *RET* ที่ลดลงในทั้ง 3 สภาวะแบบ homozygous (A-C-T/A-C-T) แต่พบการแสดงออกที่มากขึ้นใน homozygous (G-A-C/G-A-C) แอลลีล A rs10900296, แอลลีล C rs10900297 และแอลลีล T rs2435357 มีความสัมพันธ์กับผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Miao *et al.*, 2010)



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งของยีน *RET* บนตำแหน่งโครโมโซมที่ 10q11.2 (ที่มา: รูปจาก <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/RET>)



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้าง เอกซอนของยีน *RET* และตำแหน่ง encode RET protein receptor (Paul K.H. Tam 2004)

ยีน *SOX10* (MIM 602229)

ยีน *SOX10* หรือ SRY (sex determining region Y)-box 10 บนโครโมโซมที่ 22q13.1 (รูปที่ 6) มีทั้งหมด 5 เอกซอนประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 466 ตัว สามารถตรวจพบการแสดงออกได้ในช่วงการพัฒนาของตัวอ่อน เป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อและอวัยวะในระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน โปรตีนในกลุ่ม SOX (*SOX gene family*), high mobility group (HMG) DNA binding protein จะจับบริเวณที่จำเพาะบริเวณสาย DNA และจะมีส่วนช่วยในการควบคุมการถอดรหัสของยีนอื่นๆด้วย รู้จักกันในกลุ่มการทำงานที่เรียกว่า transcriptional regulator ซึ่งมีความสำคัญต่อการพัฒนาของเซลล์ใน neural crest lineage ซึ่งประกอบด้วย melanocyte และ enteric neuron (Paul K.H. Tam 2004)

โปรตีน *SOX10* เป็น transcription factor ระหว่างการพัฒนาของ neural crest การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *SOX10* ซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคในกลุ่ม neurocristopathies เช่น WS4 เป็นกลุ่มอาการความผิดปกติของการได้ยิน ความผิดปกติของเซลล์สร้างเม็ดสี (pigmentary abnormalities) และการขาดหายไปของเซลล์ปมประสาท (ganglion cell) หรือโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด

จากการรายงานการพบการเกิดการกลายพันธุ์แบบ deletion ของยีน *SOX10* ในผู้ป่วย WS2E (Waardenburg Syndrome Type 2E) จำนวน 5 ราย ทำให้ยีน *SOX10* กลายเป็นยีนใหม่ที่ส่งผลกับรูปแบบของโรค Waardenburg Syndrome และไม่พบการเกิดการกลายพันธุ์แบบ point mutation จากการหาลำดับนิวคลีโอไทป์ (DNA sequencing) ของ 3 coding เอกซอนและความผิดปกติของโรคที่เกี่ยวกับความทรงจำ (neurologic phenotypes reminiscent) สามารถพบได้ในผู้ป่วย WS4 และโรคอื่นๆ รวมถึงกลุ่มอาการต่างๆ ได้แก่ PCWH syndrome (peripheral demyelinating neuropathy, central demyelination, WS และ Hirschsprung สามารถพบได้ในผู้ป่วย WS2 ที่มีการกลายพันธุ์แบบ deletion ของยีน *SOX10* (Bondurand *et al.* 2007) และมีการรายงานถึงการวิเคราะห์ยีน *SOX10* ในผู้ป่วย hypogonadotropic hypogonadism และ anosmia ที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีกลุ่มอาการ Kallmann syndrome ร่วมด้วย และมีการแสดงอาการของโรค Waardenburg อย่างน้อยหนึ่งอย่าง พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *SOX10* จำนวน 6 ราย (Pingault *et al.* 2013) และยังมีการรายงานการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมบนยีน *SOX10* ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคต่างๆ (ตารางที่ 3)

การศึกษาในผู้ป่วย Waardenburg-Shah Syndrome ที่คัดเลือกมาจากศูนย์พันธุศาสตร์ของโรงพยาบาลในกรุงปารีสได้ให้ข้อมูลที่อยู่ถึงผู้ป่วย 3 รายที่มีการเจริญเติบโตช้า (growth retardation) ข้อมูลยังไม่มีการรายงานถึงลักษณะทางประสาทวิทยา (neurologic phenotype) ที่พบว่ามี การศูนย์เสียระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทอัตโนมัติและมีความสัมพันธ์กับโรค neonatal hypotonia และ arthrogryposis ผู้ป่วย 3 รายนี้พบมีการกลายพันธุ์แบบ heterozygous ที่ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนไทโรซีนไปเป็นกรดอะมิโนตัวอื่น (Y313X) หรือการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเซรีนไปเป็นกรดอะมิโนตัวอื่น (S251X) และการขยาย spectrum ของผู้ป่วย WS4 เผยให้เห็นการแสดงออกของโปรตีน SOX10 ในสมองมนุษย์ช่วงที่ยังเป็นตัวอ่อนและช่วงการพัฒนาตัวของตัวอ่อน การแสดงออกของโปรตีน SOX10 ในตัวอ่อนมนุษย์ไม่ได้ไปขัดขวางการเจริญของ neural crest-derived แต่ยังเกี่ยวข้องกับเซลล์ในสมองของตัวอ่อน ได้แก่ เซลล์ดั้งเดิมของ glial (glial origin) จากข้อมูลยังให้ความสำคัญของบทบาทของโปรตีน SOX10 ในช่วงที่เริ่มมีการพัฒนาตัวของทั้ง neural crest-derived tissue, เซลล์สร้างเม็ดสี (melanocytes), ระบบประสาทอัตโนมัติ, ระบบประสาททางเดินอาหาร (enteric nervous systems) และ glial cell ของระบบประสาทส่วนกลาง (Touraine *et al.* 2000)

จากการศึกษาในเด็กที่มีการสูญเสียการได้ยินของหูทั้งสองข้าง (bilateral hearing loss) กลุ่มผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ Short-segment และผู้ที่มีความผิดปกติของการสร้างเซลล์เม็ดสี (pigmentary abnormalities) ซึ่งทั้งหมดมีลักษณะของ WS4C ร่วมด้วย โดยผู้ป่วยทั้งหมดพบที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *SOX10* แบบ heterozygous rs74315514 ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนกลูตามิกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนตัวอื่น (E189X) ซึ่งเป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ ซึ่งเกิดขึ้นใหม่ (de novo mutation) และการกลายพันธุ์ดังกล่าวไม่มีผลต่อตำแหน่ง HMG binding domain (Pingault *et al.* 1998) และจากการศึกษาในเด็กผู้ชายที่มีลักษณะของโรค WS4C และมีการสูญเสียการได้ยินของหูทั้งสองข้าง พบว่ามีนิยน์ตาสีฟ้า และมีปัญหาเกี่ยวกับกล้ามเนื้อหัวใจ พบการกลายพันธุ์แบบ heterozygous ตำแหน่ง rs73415876 ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไทโรซีนเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนตัวอื่น (Y83X) บนยีน *SOX10* ที่อยู่ต้นทาง (upstream) ของ HMG domain และยังมีผลการตรวจเนื้อเยื่อลำไส้ตรง (rectal biopsy) พบว่ามีจำนวนของ ganglia ที่ลดลงอีกด้วย การศึกษาในผู้ที่มีความผิดปกติทางการได้ยิน (deafness) และ Short-segment aganglionosis

ร่วมด้วยพบการแทนที่ (insertion) ของตำแหน่งนิวคลีโอไทป์ 6 เบส (GCTCCT) rs 397515366 ระหว่างนิวคลีโอไทป์ที่ 482 และ 483 บน เอกซอนที่ 4 ของยีน *SOX10* เป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนอาร์จินีนตำแหน่ง 161 และลิวซีนตำแหน่ง 162 ตรงกลางของสาย helix 3 บริเวณ HMG domain การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้มีช่องว่างระหว่าง 2 highly conserved residues และจะไปขัดขวางโครงสร้างของบริเวณที่จับของ DNA (DNA binding domain) การศึกษายังพบการกลายพันธุ์แบบ deletion 2 เบส (107delGA) rs397515367 บนเอกซอนที่ 5 ของยีน *SOX10* ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ mRNA sequence และชักนำให้เกิด premature termination codon ตำแหน่งโคดอนที่ 400 ซึ่งการกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้ส่งผลให้การทำงานของยีนลดลง (Pingault *et al.* 2002)

การศึกษาในปี 1996 และ 1999 ในเด็กหญิงที่มีลักษณะ Waardenburg Syndrome type 2E และมี cutaneous hypo-hyperpigmented regions รวมถึงการสูญเสียการได้ยิน พบการกลายพันธุ์แบบ heterozygous rs74315515 ตำแหน่งกรดอะมิโนเซรีนเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนทรีโอนีน(S135T) บนยีน *SOX10* (Henekam and Gorlin 1996; Bondurand *et al.* 1999) และการศึกษาในผู้ป่วย 2 รายที่มีลักษณะ Waardenburg-Shah Syndrome ในปี 2000 การศึกษาค้นพบสลิป rs74315518 ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเซรีนเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนทรีโอนีน (S251T) บนยีน *SOX10* ในเด็กชายชาวฝรั่งเศสที่มีลักษณะ Waardenburg Syndrome และ neurologic variant และไม่มีสมาชิกในครอบครัวมีประวัติเป็นโรคในกลุ่มอาการ Waardenburg Syndrome และโรคกล้ามเนื้อหัวใจโตโดยกำเนิด (Touraine *et al.* 2000)

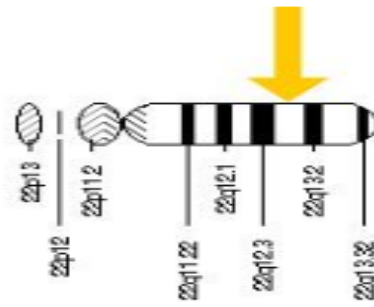
ผู้ป่วย Waardenburg Syndrome type 4C ที่มีลักษณะ Short-segment HSCR ร่วมด้วย พบสลิป rs281797260 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนไทโรซีนตำแหน่ง 207 เปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนตัวอื่น (Y207X) บนเอกซอนที่ 4 ซึ่งเป็นบริเวณ HMG box ของยีน *SOX10* เช่นเดียวกับในหนูทดลองที่มีลักษณะ *SOX10 (Dom)* (Southard-Smith *et al.* 1999)

นอกจากนั้นแล้วมีการรายงานในฐานข้อมูลจีโนมมนุษย์ (<http://www.ensembl.org>) ถึงความถี่ของแต่ละแอลลีล (allele frequencies) ของแต่ละเชื้อชาติ พบว่า สลิปตำแหน่ง rs139883 บนยีน *SOX10* ในกลุ่มเชื้อชาติแอฟริกัน มีความถี่แอลลีล T และ C คือ 45% และ 55% ตามลำดับเชื้อชาติอเมริกัน มีความถี่แอลลีล T และ C คือ 61% และ 40% ตามลำดับ เชื้อชาติเอเชีย มีความถี่แอลลีล T

และ C คือ 74% และ 26% ตามลำดับและเชื้อชาติยุโรป มีความถี่แอลลีล T และ C คือ 62% และ 38% ตามลำดับสปีดตำแหน่ง rs139884 บนยีน *SOX10* ในกลุ่มเชื้อชาติแอฟริกัน มีความถี่แอลลีล A และ G คือ 13% และ 87% ตามลำดับเชื้อชาติอเมริกัน มีความถี่แอลลีล A และ G คือ 38% และ 62% ตามลำดับเชื้อชาติเอเชีย มีความถี่แอลลีล A และ G คือ 25% และ 75% ตามลำดับและเชื้อชาติยุโรป มีความถี่แอลลีล A และ G คือ 37% และ 63% ตามลำดับ ส่วนสปีดตำแหน่ง rs2435357 บนยีน *RET* ในกลุ่มเชื้อชาติแอฟริกัน มีความถี่แอลลีล T และ C คือ 2% และ 98% ตามลำดับเชื้อชาติอเมริกัน มีความถี่แอลลีล T และ C คือ 19% และ 81% ตามลำดับเชื้อชาติเอเชีย มีความถี่แอลลีล T และ C คือ 46% และ 54% ตามลำดับและเชื้อชาติยุโรป มีความถี่แอลลีล T และ C คือ 27% และ 73% ตามลำดับ (รูปที่ 10)

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างการเกิด variation ของยีน *SOX10* ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค (ที่มา: <http://www.omim.org>)

การแสดงออกของโรค	การกลายพันธุ์	dbSNP	อ้างอิง
Waardenburg syndrome, Type4C	<i>SOX10</i> , GLU189TER	[rs74315514]	Pingault et al. (1998)
Waardenburg syndrome, Type4C	<i>SOX10</i> , TYR83TER	[rs73415876]	Pingault et al. (1998)
Waardenburg syndrome, Type 2E, without Neurologic involvement	<i>SOX10</i> , SER135THR	[rs74315515]	Hennekam and Gorlin (1996), Bondurand et al. (1999)
Peripheral demyelinating neuropathy, Central dysmyelination, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease	<i>SOX10</i> , TYR313TER	[rs74315516]	Touraine et al. (2000)
Peripheral demyelinating neuropathy, Central dysmyelination, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease	<i>SOX10</i> , SER251TER	[rs74315518]	Touraine et al. (2000)
Waardenburg syndrome, Type4C	<i>SOX10</i> , TYR207TER	[rs74315519]	Southard-Smith et al. (1999)
Waardenburg syndrome, Type4C Waardenburg syndrome, Type 2E, with neurologic involvement, included	<i>SOX10</i> , GLN377TER	[rs74315520]	Southard-Smith et al. (1999)
Peripheral demyelinating neuropathy, Central dysmyelination, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease	<i>SOX10</i> , GLN250TER	[rs74315521]	Inoue et al. (2002)
Waardenburg syndrome, Type4C	<i>SOX10</i> , ALA157VAL	[rs121909117]	Morin et al. (2008)

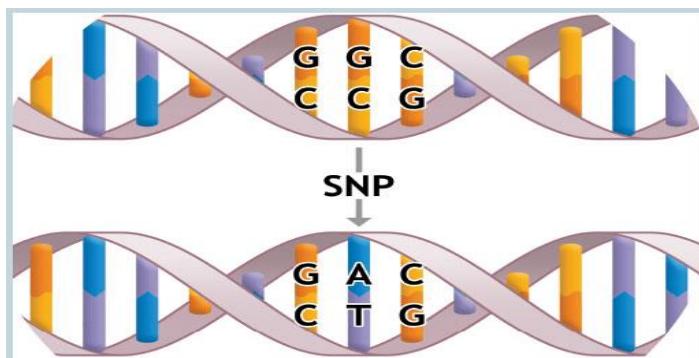


รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของยีน *SOX10* บนตำแหน่งโครโมโซมที่ 22q13.1 (ที่มา: รูปจาก <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SOX10>)

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) หรือสลิป

เป็นความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แต่ละบุคคลมีลำดับเบสต่างกัน เพียงตำแหน่งเดียว ณ ตำแหน่งเดียวกันของยีนบน โครโมโซม (รูปที่ 7) เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้บ่อย โดยมีการประมาณว่า จะพบสลิปทุกๆหนึ่งพันเบส แต่จำนวนสลิปทั้งหมดไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด คาดว่าน่าจะอยู่ในช่วง 3-4 ล้านเบสตลอดจีโนมมนุษย์สลิปเป็นความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง โดย 2 ใน 3 ของสลิปที่พบจะเป็นการเปลี่ยนแปลงจากเบส C ไปเป็นเบส T ความแตกต่างของลำดับเบสที่พบแม้เพียง 1 ตำแหน่ง อาจส่งผลถึงการแสดงออกของยีน ปริมาณและการทำงานของโปรตีน หรืออาจไม่ส่งผลกระทบต่อใดๆเลย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของสลิปบนสาย DNA

สลิปแฮปโลไทป์ (SNP haplotype) คือ สลิปแอลลีล (SNP alleles) หลายๆตำแหน่งที่อยู่ใกล้กันบนโครโมโซมเดียวกัน ลักษณะสลิปแฮปโลไทป์ในจีโนมของมนุษย์จะกระจายอยู่ทั่วไปเป็นกลุ่มเรียกว่า แฮปโลไทป์บล็อก (haplotype block) นั่นคือสลิปแอลลีลที่อยู่ใกล้กันมีแนวโน้มที่จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันทั้งหมดเป็นชุดโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มประชากรที่ไม่มีการอพยพ เคลื่อนย้าย หรือแต่งงานข้ามเชื้อชาติ ซึ่งมีโอกาสสูงที่สลิปจะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันเป็นชุด ปรากฏการณ์ที่สลิปแอลลีลหลายตำแหน่งถูกพบอยู่ด้วยกันในประชากรบ่อยกว่าที่จะพบโดยบังเอิญ แสดงถึงการถูกถ่ายทอดไปพร้อมๆกัน เรียกว่า Linkage Disequilibrium; LD ต่อกันและกัน ซึ่งหมายความว่าสลิปเป็นลักษณะอย่างหนึ่งในกลุ่มประชากร (กนกวรรณ จารุกัจรม 2007)



รูปที่ 7 ภาพแสดงการเกิดสปีหรือ Single Nucleotide Polymorphism (ที่มา: รูปภาพจาก

<http://www.ibbl.lu/personalised-medicine>)

Hardy-Weinberg Law

กฎของ Hardy-Weinberg เป็นหลักการสำคัญมากต่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ทำให้นำไปสู่การเข้าใจการอธิบายเกี่ยวกับกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบเมนเดล (Mendelian principles) ที่เป็นผลมาจากกระบวนการไมโอซิส (meiosis) และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ที่สัมพันธ์กับอัลลีลและความถี่ของจีโนไทป์ (genotypic frequencies) ของประชากร ซึ่งทฤษฎีนี้ได้ถูกอธิบายโดย G.H.Hardy นักคณิตศาสตร์ชาวอังกฤษ และนักฟิสิกส์ชาวเยอรมัน W.Weinberg ต่างก็ศึกษาค้นคว้าปัญหาทางคณิตศาสตร์ในปี ค.ศ. 1908 กล่าวคือ เมื่อประชากรมีขนาดใหญ่และมีการผสมพันธุ์กันแบบอิสระ โดยไม่มีการคัดเลือก (selection) การกลายพันธุ์ (mutation) การอพยพ (migration) หรือสภาพประชากรกลุ่มเล็ก (genetic drift) เข้ามาเกี่ยวข้องของกลุ่มประชากรขนาดใหญ่ ที่ทำการผสมพันธุ์แบบอิสระและกำหนดให้ค่าของยีนต่างๆในประชากรเป็นดังนี้ (J.Russell 2000)

p = ค่าความถี่ของ dominant allele

q = ค่าความถี่ของ recessive allele

และ $p + q = 1$

ประชากรนี้จะอยู่ในสมดุล (equilibrium) เมื่อสัดส่วนของประชากรเป็นดังนี้

Homozygous Dominant: $D = p^2$

Heterozygous: $H = 2pq$

Homozygous: $R = q^2$

$D + H + R = p^2 + 2pq + q^2$ หรือ $H^2 = 4DR$

เมื่อประชากรอยู่ในสมดุล และมีการผสมพันธุ์กันไปอีกกี่ชั่วรุ่น (generation) ก็ตาม ประชากรจะอยู่ในสภาพสมดุลเสมอหรือเรียกว่าประชากรเข้าสู่สภาพสมดุล (equilibrium) เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg ส่วนปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนในประชากร ได้แก่ การคัดเลือก โดยจะทำให้ความถี่ของยีนเปลี่ยนแปลงได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มงวดในการคัดเลือก (intensity) การอพยพ (migration) หรือการนำเอาสายพันธุ์ใหม่หรือยีนใหม่สู่ประชากร มีผลทำให้ยีนเก่ามีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนที่ลดลง ในขณะที่เดียวกันสัดส่วนของยีนใหม่ในกลุ่มประชากรจะเพิ่มขึ้น จนในที่สุดเข้าสู่สภาพสมดุล ต่อมาคือการกลายพันธุ์ (mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทป์ภายในยีน และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนในประชากร และสุดท้ายคือ อิทธิพลของประชากรขนาดเล็ก (genetic drift) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ยีนในประชากรเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากรุ่นหนึ่งไปอีกรุ่นหนึ่ง มีทิศทางเปลี่ยนแปลงที่ไม่แน่นอน โดยขึ้นอยู่กับโอกาส (chance) หรือเกิดขึ้นแบบสุ่ม (random drift) ของการจับคู่ผสมพันธุ์

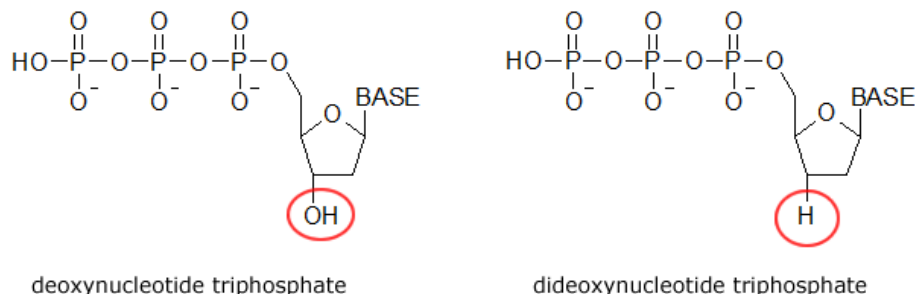
วิธีการและหลักการตรวจสอบนิวคลีโอไทป์

การศึกษาลำดับเบส DNA หรือ DNA Sequencing

DNA sequencing เป็นเทคนิคที่สำคัญอีกเทคนิคหนึ่งสำหรับการศึกษาในครั้งนี้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำให้ทราบลำดับของเบสที่ถูกต้องของ DNA การศึกษาลำดับเบสนี้สามารถศึกษาได้ทั้งใน genomic DNA และ cDNA รวมทั้ง mitochondrial DNA นอกจากนี้การศึกษาลำดับเบสที่ได้จะทำให้ทราบรายละเอียดของยีน โดยเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาลำดับเบสมีการพัฒนาเทคนิคซึ่งแตกต่างกันอยู่สองวิธี ได้แก่

1. dideoxy chain termination method หรือเรียกอีกอย่างว่า The Sanger-Coulson method วิธีนี้อาศัยการเลียนแบบกระบวนการ DNA replication คือการสร้างสาย DNA ใหม่จากสาย DNA ต้นแบบสายเดียว โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะนำนิวคลีโอไทด์ปกติ (dGTP, dATP, dCTP, และ dTTP) และนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีมาสร้าง DNA สายใหม่ การสิ้นสุดการสร้าง DNA สายใหม่จะเกิดขึ้นในตำแหน่ง dideoxy nucleotide (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหมู่ $3' \text{ OH}^-$ ทำให้ไม่สามารถสร้างพันธะ phosphodiester กับนิวคลีโอไทด์ตัวถัดไป (รูปที่ 8) ซึ่งต่อมาได้มีการพัฒนามาเป็นเครื่อง automated DNA sequencing

2. chemical degeneration method หรือ The Maxam-Gilbert Method หลักการของลำดับเบสวิธีการนี้ ไม่ใช่การสังเคราะห์ DNA สายใหม่ขึ้นมา แต่เป็นการตัดโมเลกุลของ DNA โดยใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์เฉพาะต่อนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว โดยที่สารเคมีจะไปปรับเปลี่ยนเบสของ DNA เช่น การเติม methyl group ในตำแหน่งของเบสจำเพาะบางตำแหน่ง เบสที่ถูกปรับเปลี่ยนจะถูกทำลายไปเหลือเพียง deoxyribose ซึ่งจะถูกทำลายต่อไปจนทำให้เกิดการขาดของสาย DNA ที่ตำแหน่งของเบสดังกล่าว ทั้งนี้สามารถติดตาม DNA โดยการติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี และสามารถดูผล DNA ที่แยกได้โดย polyacrylamide gel electrophoresis และอ่านลำดับเบสจากแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม เอ็กซ์เรย์ (X-ray)

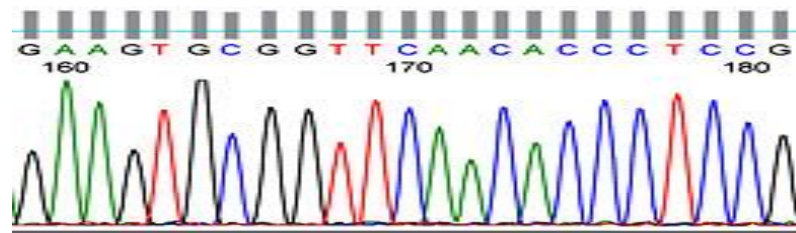


รูปที่ 8 โครงร่างของ deoxynucleotide triphosphate (ซ้าย) และ dideoxynucleotide triphosphate (ขวา)(ที่มา: รูปจาก <http://biochem.com>)

ในปัจจุบันมีวิธีการศึกษาลำดับเบสของ DNA โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencing เครื่อง automated นี้ใช้หลักการพื้นฐานเช่นเดียวกับ dideoxy chain termination แต่มีข้อแตกต่างกัน บางประการเท่านั้น ได้แก่ เอ็นไซม์ DNA polymerase ที่ใช้เป็นชนิดทนความร้อน เช่น AmpliTaq DNA polymerase คือเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่มีความบกพร่องการทำงาน 3'-5' เอกซอน uclease หรือ AmpliTaq DNA polymerase FS ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง deoxynucleotides กับ dideoxynucleotides และใช้เทคนิค cycle sequencing ซึ่งอาศัยหลักการของ PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA ซึ่งประกอบด้วยสามขั้นตอน คือ denaturing, annealing และ extension และการใช้สารเรืองแสงที่มีอันตรายน้อยกว่าในการติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี ซึ่งสารเรืองแสงนี้จะเรืองแสงของสีในช่วงความยาวคลื่นต่างๆกัน สำหรับสี่เบส คือ A, G, T และ C เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ และต่อมาคือการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยเครื่อง automated DNA sequencer (รูปที่ 9) ใช้แสงเลเซอร์เป็นพลังงานให้แก่สารเรืองแสง โดยมีการตรวจวัดความเข้มข้นของสารเรืองแสงส่งข้อมูลไปให้เครื่องคอมพิวเตอร์ วิเคราะห์แล้วรายงานผลเป็นลำดับเบสของ DNA (รูปที่ 10)



รูปที่ 9 เครื่อง automated DNA sequencer (ที่มา: รูปจาก<http://www.sci.ku.ac.th>)



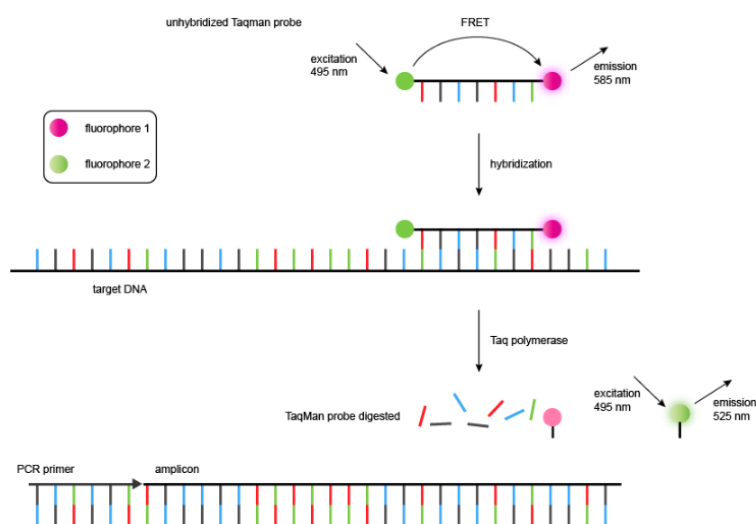
รูปที่ 10 แสดงภาพตัวอย่างของข้อมูลลำดับเบสของ DNA ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ (รูปจาก <http://www.ohsu.edu>)

Real-time PCR โดย TaqMan probe

เทคนิค real-time PCR เป็นการนำเอาคอมพิวเตอร์เข้ามาตรวจวัดปริมาณของ DNA ที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา โดยการวัดปริมาณชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มขึ้นนี้สามารถวัดได้ตั้งแต่ปฏิกิริยาเริ่มต้น และขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินไป ดังนั้นจึงอาจเรียกเทคนิคนี้ว่า kinetic PCR การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ของเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมโดยวิธีการทำ agarose gel electrophoresis นั้นสามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่าง DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน 10 เท่าขึ้นไป ในขณะที่ real-time PCR จะสามารถแยกความแตกต่างได้แม้ความเข้มข้นแตกต่างกันเพียง 2 เท่า โดยในปฏิกิริยา real-time PCR จะมีทั้งหมด 3 เฟส ได้แก่ exponential phase เป็นระยะที่ปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นสองเท่า โดยเพิ่มแบบ exponential ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้มีความจำเพาะเจาะจงและมีความแม่นยำสูง ถือเป็นเฟสที่ใช้ในการตรวจปริมาณ DNA ในเทคนิค real-time PCR ส่วนใน linear phase ถือเป็น high variability phase นั้นจะมีการนำ reagent มาใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เป็นผลให้อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาลดลง และผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นจะเริ่มมีการเสื่อมสลายไปในแต่ละรอบ และสุดท้าย plateau phase ปฏิกิริยาการเพิ่ม DNA จะหยุดลงและไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นอีก โดยเป็นเฟสที่ใช้ในการตรวจสอบ DNA ในเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม เรียกว่า end point detection

เนื่องจากเทคนิค real-time PCR เป็นการตรวจสอบ DNA เป้าหมายในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินไป ซึ่งมีการพัฒนาไปหลายเทคนิควิธี ได้แก่ DNA-binding dye และ fluorescence resonance energy transfer (FRET) โดยเทคนิค FRET จะใช้เมื่อต้องการความจำเพาะสูง โดยวิธีการนี้เป็นการถ่ายทอดพลังงานจาก dye ที่มีพลังงานสูงไปสู่โมเลกุล dye ที่มีพลังงานต่ำกว่า ซึ่งมีหลายรูปแบบ แต่ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธี TaqMan Probe ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทป์ชนิดหนึ่งโดยปลาย 5' ของ TaqMan Probe ติดฉลาก fluorescent reporter dye และปลาย 3' ติดฉลากด้วย quencher dye ซึ่ง quencher dye นี้ทำให้ fluorescent reporter dye ไม่สามารถเรืองแสงได้ เมื่อเกิดการ hybridization และ reporter dye ถูกกระตุ้นด้วยแสงแล้ว จะถ่ายเทพลังงานไปให้ quencher dye และเมื่อปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสเข้าสู่ elongation step เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จะทำการสร้างสาย DNA มาจนถึงบริเวณที่ TaqMan Probe เกาะอยู่ โดยปลาย 5' ของ *Taq* DNA polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น exonuclease ก็จะย่อย probe ทำให้ reporter dye หลุดออกจาก quencher dye และคายพลังงาน

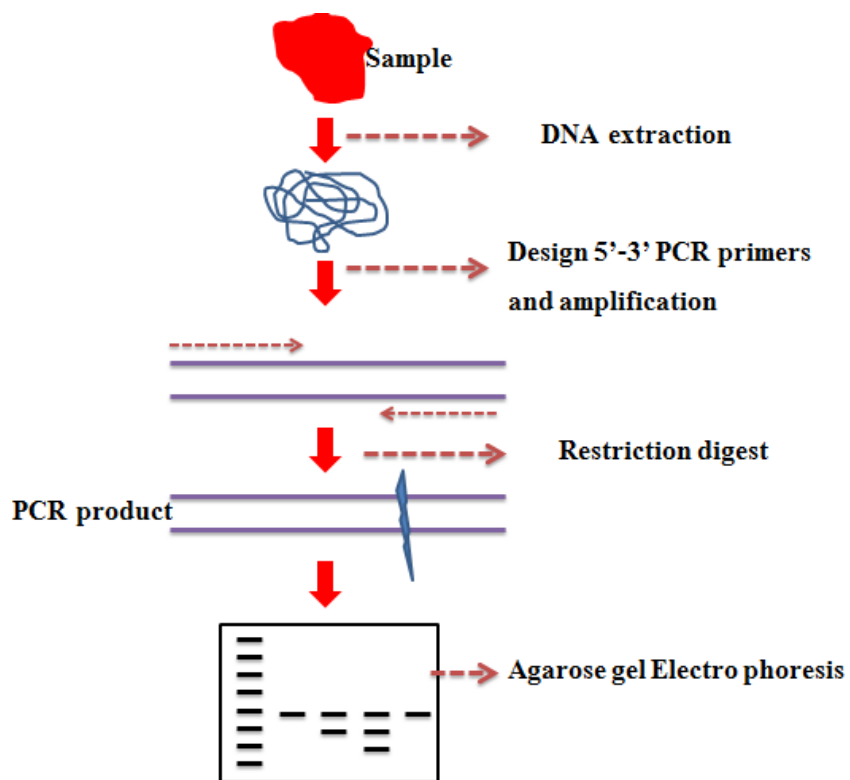
ออกมาในรูปของแสง fluorescence ได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง (รูปที่ 11) *Taq* polymerase จะย่อยเฉพาะ probe ที่สามารถจับคู่แบบคู่สมกับ DNA เป้าหมายเท่านั้น ดังนั้นวิธีการนี้จึงมีความจำเพาะสูงมาก อุณหภูมิในปฏิกิริยาต้องมีความเหมาะสมเพื่อยืนยันการจับระหว่าง probe กับ DNA เป้าหมาย โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ TaqMan probe ในช่วง annealing step และ polymerization step คือประมาณ 70 องศาเซลเซียส และ 60-62 องศาเซลเซียส ตามลำดับ



รูปที่ 11 แสดงหลักการของ Taqman probe ซึ่งเป็น probe ที่มีลำดับเบสที่จำเพาะกับ DNA แม่แบบปลายด้าน 5' ติดฉลากด้วย reporter dye (สีเขียว) และทางด้านปลาย 3' จะติดฉลากด้วย quencher dye (สีแดง)(ที่มา: รูปจาก <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>)

Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

เป็นวิธีที่ใช้หลักการของ sequence polymorphism ซึ่งเกิดขึ้นในยีนการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นใน genome นั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อ restriction site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ เช่น เดิมยีนในตำแหน่งนี้ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนี้ได้ แต่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ มี polymorphism ขึ้น อาจทำให้ยีนในบริเวณดังกล่าวสามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันนี้ได้ หรืออาจจะเกิดขึ้นในทางกลับกันคือ เดิมยีนส่วนนี้อาจถูกตัดด้วยเอนไซม์ได้ แต่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ขึ้น ทำให้ไม่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัวเดิมได้ เป็นต้นจากลักษณะนี้เองทำให้สาย DNA ของยีนถูกเอนไซม์ตัดได้ จะมีขนาดเล็กกว่าสาย DNA ของยีนเดียวกันที่ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้ได้ ความแตกต่างในความยาวของสาย DNA ชนิดเดียวกันที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันที่เรียกว่า RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เกิดขึ้นเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสบางเบสในสาย DNA นี้ ดังนั้นเมื่อนำ DNA ส่วนนั้นมาย่อยด้วย restriction enzyme ก็จะทำให้รูปแบบที่ต่างกัน ในบางครั้งการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรค อาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ ทำให้เราสามารถนำเทคนิคนี้มาช่วยในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคนั้นๆ ได้ PCR-RFLP เป็นการตรวจสอบลำดับเบสบนสาย DNA ที่ต้องการด้วย PCR โดย primer ที่จำเพาะและตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หลังจากนั้นนำไปแยกขนาดโดยกระแสไฟฟ้าผ่านเจล เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบ DNA (DNA banding pattern) (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 หลักการและขั้นตอนการทำ Restriction Enzyme fragment length Polymorphisms;RFLP
(ที่มา: คัดแปลงจาก http://www.seafoodid.com/pcr_rflp.htm)

การศึกษาสปีในด้านต่างๆ

นอกจากการศึกษาทบาทการกลายพันธุ์ (mutation) ที่ส่งผลนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพต่างๆแล้ว ปัจจุบันการศึกษานี้ยังมีความสำคัญต่อปัจจัยที่นำไปสู่ความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคและยังสามารถเกิด linkage equilibrium และถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ และยังพบว่าการเกิดสปียังเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความถี่ต่อการเกิดโรคในหลายๆ โรคอีกด้วย การศึกษานี้ในงานวิจัย เช่น โปรตีน adrenomedellin หรือ AM มีคุณสมบัติในการขยายหลอดเลือด จะพบมีปริมาณที่สูงในกระแสเลือดในผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดการศึกษาโครงสร้างของยีน adenomedullin พบว่ามีสปี 2 ตำแหน่ง ได้แก่ +223A/C บริเวณอินทรอนที่ 1 และ +1100C/G บริเวณอินทรอนที่ 3 การศึกษาพบว่าสปีสองตำแหน่งนี้มีผลต่อการแสดงออกของยีน โดยจะไปทำให้โครงสร้างของสาย DNA เกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดการจับกันระหว่าง transcription factor ได้ไม่ดี สปีดังกล่าวยังสามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้และยังเพิ่มความถี่ต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดด้วย โดยจะไปมีผลต่อการแสดงออกของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบหลอดเลือด (Ishimitsu *et al.* 2006)

การประยุกต์ใช้สปีในด้านคลินิก ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีบนยีนที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแลกเปลี่ยน urate ion ของยีน *SLC22A12* หรือ *URATI* กับระดับกรดยูริกในกระแสเลือดของชาวญี่ปุ่น โดยการตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เพื่อดูสปี rs893006 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า G/T บนยีน *SLC22A12* มีความสัมพันธ์กับระดับกรดยูริก โดยพบว่าจีโนไทป์ GG จะมีระดับกรดยูริกที่สูงกว่าจีโนไทป์แบบ GT และจีโนไทป์แบบ TT การศึกษาดังกล่าวพบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในเพศหญิง อาจเนื่องมาจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน และประชากรเพศหญิงมีจำนวนน้อย (Shima, Teruya, and Ohta 2006) และการศึกษากลไกการทำงานของยาลดระดับกรดยูริก เช่น benzbromarone หรือ probenacid ที่มีกลไกยับยั้งการทำงานของยีน *SLC22A12* พบว่ายีน *SLC22A12* มีแนวโน้มที่จะเป็นยีนหลักในการควบคุมระดับกรดยูริกในกระแสเลือด (Enomoto *et al.* 2002) และการศึกษาพบความสัมพันธ์ของสปีตำแหน่ง rs893006 กับระดับกรดยูริก สามารถใช้สปีดังกล่าวของยีน *SLC22A12* ในการเป็นปัจจัยเฝ้าระวังโรคเกาต์ และยังป้องกันภาวะไตอักเสบเฉียบพลันได้อีกด้วย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง แต่อาจจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนและโปรตีน อาจไม่ส่งผลโดยตรงต่อการเกิดโรค แต่มีความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรค การศึกษาชนิดต้องอาศัยการรวบรวมข้อมูลที่ ถูกต้องและมากเพียงพอจึงจะสามารถมั่นใจในการใช้ข้อมูลดังกล่าวได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความถี่แอลลีลของสลิปตำแหน่ง rs139883 และ 139884 บนยีน *SOX10* เทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจโตโป่งพองแต่กำเนิดชาวไทยเทียบกับกลุ่มควบคุมเชื้อชาติเดียวกัน
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs rs139883 และ 139884 บนยีน *SOX10* กับสลิปตำแหน่ง rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene* กับการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจโตโป่งพองแต่กำเนิดในประชากรไทย

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

เกณฑ์การคัดเลือกและการเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด ในการวิจัยในครั้งนี้ใช้กลุ่มผู้ป่วย sporadic HSCR อายุน้อยกว่า 15 ปีที่เข้ารับการผ่าตัดในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ และได้รับการยืนยันการวินิจฉัยโดยลักษณะพยาธิวิทยาแล้วว่าการขาดหายไปของเซลล์ประสาท จำนวนทั้งหมด 120 ราย โดยตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้เป็นตัวอย่างที่เหลือจากการส่งตรวจตามปกติจากห้องปฏิบัติการ โดยมีขนาดประมาณ 0.5-1 ซม. เก็บในหลอดเก็บตัวอย่างและเก็บรักษาชิ้นเนื้อไว้ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) ก่อนการสกัด DNA และใช้เลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำจากกลุ่มอาสาสมัครหรือกลุ่มควบคุม (control group) ประมาณ 5 มิลลิลิตรภายใต้ความยินยอมอย่างเป็นทางการเป็นลายลักษณ์อักษร และใช้สาร EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จำนวนทั้งสิ้น 224 ราย ที่มีอายุที่มากกว่า 15 ปี เพื่อเป็นการยืนยันเบื้องต้นถึงการไม่เป็นโรคและไม่มีประวัติทางครอบครัวเกี่ยวข้องกับกำเริบโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด รวมทั้งอาการท้องผูกเรื้อรัง (chronic constipation) โดยข้อมูลได้จากการทำแบบสอบถามก่อนการเจาะเลือดและจะควบคุมอัตราส่วนเพศในกลุ่มผู้ป่วย (cases group) และกลุ่มควบคุม (control group) ให้ใกล้เคียงกัน (sex-matched)

สารเคมี

1. PCR kit (QIAGEN, Germany)
2. PCR purification kit (QIAGEN, Germany)
3. 100,50 bp DNA ladder (Invitrogen, USA)
4. Agarose gel (Invitrogen, USA)
5. Ethidium bromide (Invitrogen, USA)

6. TapMan universal mastermix (Applied Biosystems, USA)
7. *HpaII*enzyme (Thermo Scientific)
8. Big Dye Terminator (Applied Biosystems, USA)
9. Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA)
10. Blood DNA Mini Kit(OMEGA)
11. Tissue DNA Mini Kit (OMEGA)
12. Absolute Ethanol
13. PBS buffer
14. TE buffer
15. Tris acetate

อุปกรณ์

1. Automated pipette, P10/20/200/1000 μ L (Gilson, USA)
2. Pipette tip ART 1000E, 1000 μ L aerosol resistant tip, pre-sterilized
(Molecular BioProducts, USA)
3. Pipette tip ART 200E, 200 μ L aerosol resistant tip, pre-sterilized
(Molecular BioProducts, USA)
4. Pipette tip ART 20E, 20 μ L aerosol resistant tip, pre-sterilized
(Molecular BioProducts, USA)
5. Pipette tip ART 10E, 10 μ L aerosol resistant tip, pre-sterilized
(Molecular BioProducts, USA)
6. Freezer (-20°C)
7. Refrigerator (4°C)
8. Microcentrifuge (Tomy, USA)
9. Vortex (Vortex-Genie2, USA)

10. Microcentrifuge tube 1.5 (Invitrogen, USA)
11. 96well-plate (Applied Biosystems, USA)
12. UV spectrophotometer (BIORAD, USA)
13. UV light trasilluminator (BIORAD, USA)
14. Gel Doc 1000 (BIORAD, USA)
15. Mini spin down (Biosan)
16. Nanodrop 2000 Spectrophotometer
17. Temperature Shaker (Biosan)

ฐานข้อมูลสลิป (SNP database)

Ensembl's Compara database (<http://www.ensembl.org>)

วิธีการดำเนินการ

การสกัด DNA (DNA extraction) จากอย่างตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อ

สกัด DNA จากเลือด โดยใช้ Blood DNA Mini Kit (OMEGA, Germany) การสกัด DNA จากเลือด โดยใช้เลือดประมาณ 5 มิลลิลิตรที่เก็บในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยการถ่ายเลือดลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติม TE buffer ปริมาตร 10-15 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีเลือด ปิดฝาหลอด กลับหลอดไปมาเพื่อให้ buffer กับเลือด ผสมกันดี จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะสังเกตเห็นเม็ดเลือดตกอยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นเทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วล้างเม็ดเลือดด้วย TE buffer ซ้ำอีก แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมโดยทำตามขั้นตอนที่กล่าวไว้ข้างต้น ล้างประมาณ 3-4 ครั้ง จนแน่ใจว่าไม่มีเม็ดเลือดแดงปะปนอยู่กับเม็ดเลือดขาว จากนั้นถ่ายเม็ดเลือดขาว 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย protease ลงไป 25 ไมโครลิตร และเติม BL buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นทำการผสมรวม โดยใช้เครื่อง vortex 15 วินาที จากนั้นทำนํามาบ่ม

ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม 100% ethanol ผสมรวมโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 20 วินาที และปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 1 นาที หลังจากนั้นถ่ายตัวอย่างทั้งหมดลงใน column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 1 นาที เติสารละลายที่ผ่านการกรองโดย column ส่วนบนทิ้ง แล้วใส่ column ใหม่เข้าไปแทน จากนั้นเติม HBC buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตรแล้วปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 1 นาที เติสารละลายที่ผ่านการกรองโดย column ส่วนบนทิ้ง แล้วเติม DNA wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที 1 นาที เติสารละลายชั้นล่างของ column ที่ทำซ้ำโดยเติม DNA wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นด้วยความเร็วรอบที่กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นย้าย column ใสลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติ Elution buffer ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที ก็จะได้สารละลาย DNA ที่ตกลงไปในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำตัวอย่าง DNA ที่ได้ไปวัดปริมาณและคุณภาพโดยเครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) เก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

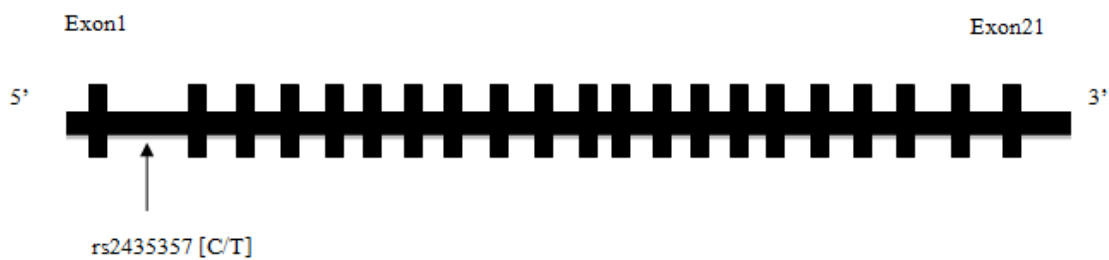
ขั้นตอนการสกัด DNA จากชิ้นเนื้อ เริ่มนำชิ้นเนื้อปริมาณ 30 มิลลิกรัมมาสับให้ละเอียด หลังจากนั้น นำชิ้นเนื้อที่สับละเอียดแล้ว ใสลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติสารช่วยย่อย TL buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย protease ผสมรวมโดยใช้เครื่อง vortex เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที ได้สารละลายส่วนบนแล้วใสลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม BL buffer ปริมาตร 220 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex นำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม 100% ethanol ปริมาตร 220 ไมโครลิตรผสมรวมกันโดยใช้เครื่อง vortex คูณสารละลายส่วนล่างลงใน column 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที เติสารละลายที่ผ่านการกรองจาก column ส่วนบนทิ้ง เติ HBC buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เติสารละลายที่ผ่านการกรองจาก column ส่วนบนทิ้ง แล้วใส่ column ใหม่เข้าไปแทน เติ DNA wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที 30 วินาที เติสารละลายที่ผ่านการกรองจาก column ส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำโดยเติม DNA wash buffer

ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บั่นด้วยความเร็วรอบที่กล่าวไว้ข้างต้น เทสารละลายที่ผ่านการกรองจาก column ส่วนบนทิ้ง แล้วนำ column เปล่ามาบั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที 2 นาที หลังจากนั้นย้าย column ใสลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution buffer ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาทีหรือมากกว่านั้น แล้วบั่นด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อ นาที 1 นาที ก็จะได้สารละลาย DNA ที่ตกลงไปในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำตัวอย่าง DNA ที่ได้ ไปวัดปริมาณและคุณภาพโดยเครื่อง NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) เก็บ DNA ที่สกัดได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

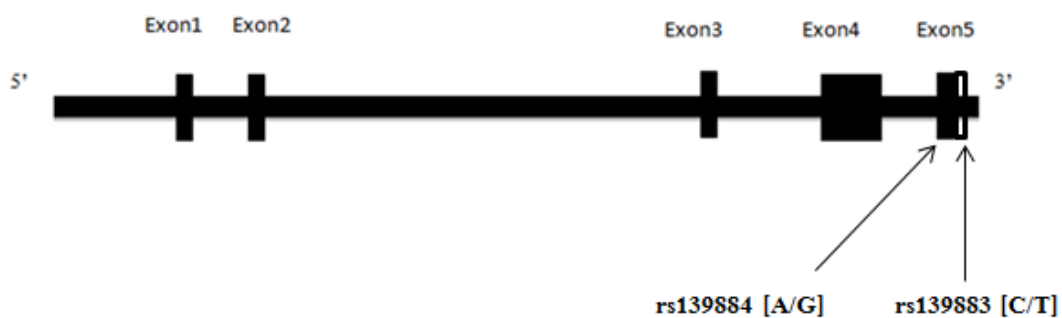
การคัดเลือกยีนและสเนิป (Selection of candidate genes and SNPs)

ยีนที่เลือกเพื่อทำงานวิจัยในครั้งนี้ ได้แก่ ยีน *RET-protooncogene* และยีน *SOX10* โดยคัดเลือกจากฐานข้อมูลการศึกษาจีโนมมนุษย์ (human genome project) และการศึกษา Genome Wide Association Study (GWAS) และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ถึง ความสัมพันธ์ของสเนิปในตำแหน่ง rs139883 บนยีน *SOX10* และ rs2435357 ของยีน *RET-protooncogene* (Phusantisampan *et al.* 2012) กับผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจโตโป่งพองโดยกำเนิดในประชากรไทย เช่นเดียวกับการศึกษา polymorphisms ที่พบความสัมพันธ์ระหว่างสเนิปตำแหน่ง rs139884 ของยีน *SOX10* และมีความถี่แอลลีลที่มากกว่า 0.05 การศึกษาในครั้งนี้จะเพิ่มจำนวนตัวอย่างของผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อหัวใจโตโป่งพองโดยกำเนิด และกลุ่มควบคุม

สเนิปตำแหน่ง rs139883 เป็นสเนิปที่ตั้งอยู่บริเวณ 3'UTR บนเอกซอนที่ 5 เป็นบริเวณที่ไม่มี การแปลรหัสไปเป็นโปรตีน โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเบส C เป็น T และสเนิปตำแหน่ง rs139884 เป็นสเนิปบนเอกซอนที่ 5 โดยมีการเปลี่ยนแปลงของเบส A เป็น G และไม่มีการเปลี่ยนแปลง กรดอะมิโน คือ ฮิสติดีน (histidine; H) ของยีน *SOX10* ส่วนสเนิปตำแหน่ง rs2435357 ที่อยู่บริเวณ อินทรอนที่ 2 โดยมีการเปลี่ยนแปลงเบส A เป็นเบส G บนยีน *RET* (รูปที่ 8 และ 9)

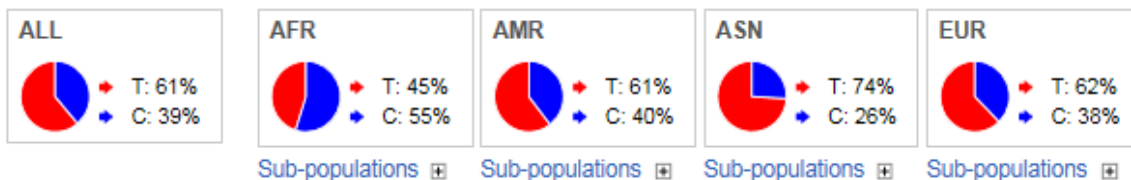


รูปที่ 13 แสดงโครงสร้างจีโนมิก (genomic structure) ของยีน *RET*-protooncogene และตำแหน่งสแน็ป (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs)

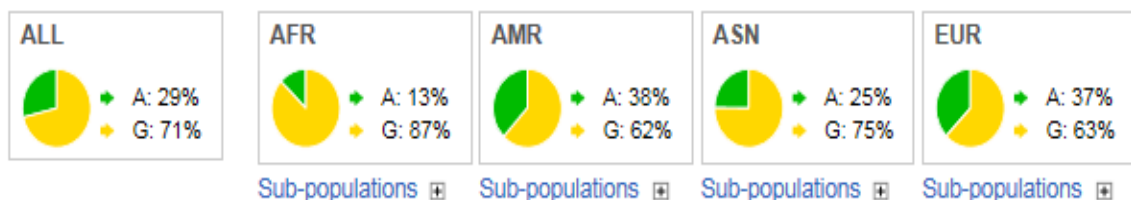


รูปที่ 14 แสดงโครงสร้างจีโนมิก (genomic structure) ของยีน *SOX10* และตำแหน่งสแน็ป (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs)

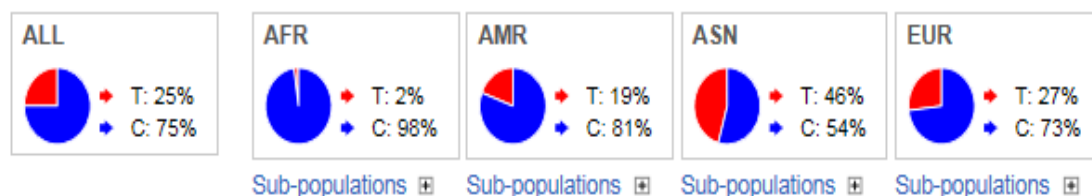
[A]



[B]



[C]



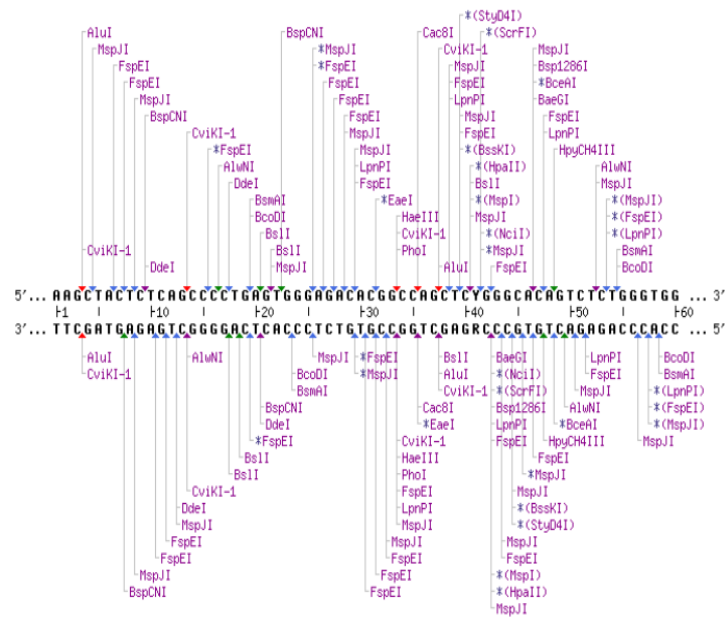
รูปที่ 15 แสดงความถี่ของแต่ละแอลลีลในกลุ่มประชากรต่างๆ (ภาพA) แสดงความถี่ของแอลลีล T และ C ของสปีตำแหน่ง rs139883 (ภาพB) แสดงความถี่ของแอลลีล A และ G ของสปีตำแหน่ง rs139884 (ภาพC) แสดงความถี่ของแอลลีล T และ C ของสปีตำแหน่ง rs2435357 (ที่มา: ข้อมูล จาก <http://www.ensembl.org>)

การตรวจสอบจีโนไทป์

ใช้ความเข้มข้นของ DNA ที่เจือจาง (diluted) เพื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA (polymerase chain reaction; PCR) ที่ 50 ng/ul โดยใช้กลุ่มตัวอย่าง 50 ตัวอย่างเพื่อคัดกรองความถี่เบื้องต้นของสไนป์ทั้งสองบนยีน *SOX10* โดยการทำลูกโซ่โพลีเมอเรส; polymerase chain reaction (PCR) (ตารางที่ 6) และยืนยันผลโดยวิธีตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือ DNA direct sequencing และใช้หลักการของ TaqMan SNP genotyping เพื่อตรวจหาสไนป์ตำแหน่ง rs139884 เช่นเดียวกับในยีน *RET* ตำแหน่งสไนป์ rs2435357 (Phusantisampan *et al.* 2012) และใช้วิธีการ polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) หรือการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจหาสไนป์ตำแหน่ง rs139883

วิธีการ TaqMan SNP genotyping โดยใช้ชุดน้ำยาที่มีการผสมรวมกันของ PCR primers, FAMTM และ VIC[®] dye-labeled TaqMan MGB probes ที่ออกแบบโดยบริษัท ABI (Applied Biosystems Foster City) ในปฏิกิริยาจะประกอบด้วย DNA ความเข้มข้น 50 ng, 2x TaqMan Genotyping Master Mix 2 μ L, 40x Assay Mix 0.5 μ L, และ Milli-Q H₂O ในปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร; μ L (ตารางที่ 8)

สำหรับวิธีการ PCR-RFLP ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *HpaII* (Thermo Scientific) รูปที่ 11 โดยประกอบด้วย 2.5 μ L ของ 10x NE buffer, DNA จาก PCR product 2 μ L และเติม Milli-Q H₂O ในปริมาตรทั้งหมด 25 μ L และดูผลการตัดโดยเอนไซม์โดยใช้ 2% agarose gel โดยย้อมเจลด้วย ethidium bromide และหลังจากนั้นดูเจลผ่านเครื่อง UV transilluminator (ตารางที่ 4 และ 7)



รูปที่ 16 แสดงตัวอย่างตำแหน่งการออกเบบเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยโปรแกรม NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>)

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะและอุณหภูมิที่ใช้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)	ตำแหน่งตัด	อุณหภูมิ(°C)	เวลา
<i>HpaII</i>	5' C↓CGG 3' 3' GGCC↑ 5'	37	20 นาที

ตารางที่ 5 สภาวะในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อเพิ่มจำนวน DNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1) Pre-denaturation	94	3 นาที	} 40รอบ
2) Denaturation	95	30 วินาที	
3) Annealing	58-60	30วินาที	
4) Extension	72	45วินาที	
5) Final extension	72	7 นาที	

ตารางที่ 6 สารองค์ประกอบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

องค์ประกอบ	ปริมาณ (1 x/20 ไมโครลิตร)
1) Deionized water	7.5
2) TopTaq polymerase	10
3) Primers (forward or reverse) 50 ng/ μ L	0.4
4) DNA (50 ng/ μ L)	2
Total reaction	20

ตารางที่ 7 สารองค์ประกอบปฏิกิริยา RFLP

องค์ประกอบ	ปริมาณ (1 x/20 ไมโครลิตร)
1) Deionized water	11
2) 10X Fast digest buffer	1.33
3) <i>HpaII</i> enzyme	0.67
4) DNA (50 ng/ μ L)	7
Total reaction	20

ตารางที่ 8 สารองค์ประกอบปฏิกิริยา Real-Time PCR

องค์ประกอบ	ปริมาณ (1 x/20 ไมโครลิตร)
1) Deionized water	3
2) Probe (40X)	0.5
3) Master mix	10
4) DNA (50 ng/ μ L)	2
Total reaction	20

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

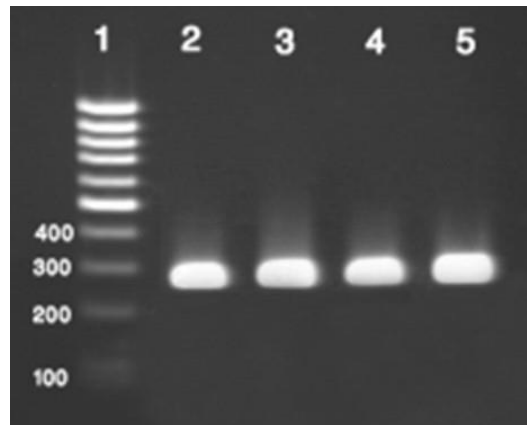
เป็นวิธีการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่อง โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนในหลอดทดลองที่มี deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ในส่วนประกอบของสารละลายที่เหมาะสม โดยแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาจะถูกควบคุมโดยเครื่อง Thermal cycler โดยปฏิกิริยา PCR จะทำการสังเคราะห์ DNA บริเวณที่อยู่ระหว่าง oligonucleotide primer 2 สาย คือ forward primer และ reverse primer ดังนั้นจำเป็นที่จะต้องทราบลำดับเบสบางส่วนของ DNA ที่อยู่ใกล้หรือ DNA ส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน เพื่อที่จะสามารถเพิ่มจำนวน DNA ส่วนนั้นได้ขั้นตอนการทำ PCR ประกอบไปด้วย

1. Denaturation ทำให้สาย double stranded DNA แยกตัวออกมาเป็น single stranded โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส

2. Annealing เป็นขั้นตอนการรวมตัวระหว่าง primer กับลำดับเบสที่ complementary กัน

3. Polymerization หรือ extension เป็นการต่อสาย primer ใช้เอนไซม์ DNA polymerase โดยในการนี้เราจะใช้ DNA polymerase ชนิดพิเศษที่เรียกว่า *Taq* polymerase เป็น DNA polymerase ที่สกัดมาจาก bacteria *Thermus aquaticus* ซึ่งมีคุณสมบัติทนต่อความร้อนได้

ทำซ้ำจากข้อ 1 ถึงข้อ 3 คือใช้อุณหภูมิสูงในการ denaturation, annealing ของ primers และ primer extension อีกหลายๆรอบโดยทั่วไปนิยมทำประมาณ 25-30 รอบโดยในแต่ละรอบจะได้จำนวน DNA ที่เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ (exponential) เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดลง จะทำการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR (PCR product) โดยการใช้ agarose gel electrophoresis และย้อมด้วยสารเรืองแสง ethidium bromide ซึ่ง ethidium bromide จะแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างคู่สาย DNA ดังนั้นเมื่อนำ agarose gel ที่มี DNA product ไปส่องด้วยแสง ultraviolet (UV) จากเครื่อง UV transilluminator จะสามารถมองเห็นแถบ DNA ภายในเจลได้ โดยเปรียบเทียบกับ DNA ที่ทราบขนาด (DNA marker) (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 แสดงภาพตัวอย่างแถบ DNA ของ PCR product ที่เห็นจาก gel electrophoresis เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide

ตารางที่ 9 แสดงสายไพรเมอร์ (primer) และสายโอลิโกนิวคลีโอไทป์ (Oligonucleotide sequence) ของสปีต่าง ๆ

SNP_ID	Name	Sequence (5' to 3')	Alleles	Method
rs139883	rs139883_F	ACTGGGGGCTGTTTCTCAG	C/T	PCR-RFLP
	rs139883_R	AATGACCCTCTATCCCAGGAC		
rs139884	rs139884_F	CATAGCCGGCTGCTGAGTAG	A/G	TaqMan
	rs139884_R	ACCTGCCGCCCAATGG		SNP genotyping
	rs139884_VIC	VIC-CTGCTCACATGGCCTG-TAMRA		
	rs139884_FAM	FAM-TGCTCACGTGGCCTG-TAMRA		
rs2435357	rs2435357_F	AGCCCTGCAGCCAAGG	C/T	TaqMan
	rs2435357_R	GGACTGGCCACCCAAGTG		SNP genotyping
	rs2435357_VIC	TGTGGATGACCATGTAAG-TAMRA		
	rs2435357_FAM	TGTGGATGACCGTGTAAAG-TAMRA		

การทำนายผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA ต่อสเนิปโดยเครื่องมือทาง

ชีวสารสนเทศ (Bioinformatics tools)

การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA โดยใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศของ RNAsnp Web Server เพื่อดูโครงสร้างที่เปลี่ยนไป เนื่องจากผลของตำแหน่งสเนิปบนสาย RNA จากเว็บไซต์ <http://rth.dk/resources/rnasnp/> โดยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศจะแบ่งออกเป็น 3 โหมด ได้แก่

โหมดที่ 1

เป็นการออกแบบเพื่อที่จะทำนายผลของสเนิปบนลำดับนิวคลีโอไทป์ของ RNA เพื่อความน่าจะเป็น (probability) ของ wild-type และ mutant บนสายนิวคลีโอไทป์ของ RNA เป็นการคำนวณโดยใช้ global folding method RNAfold โครงสร้างที่แตกต่างกันระหว่าง wild-type และ mutant ดูจากค่า Euclidean distance หรือ Pearson correlation

ป้อนลำดับนิวคลีโอไทป์ของ RNA ในรูปแบบของ Fasta ในกรอบที่กำหนด



RNAsnp Web Server: Predicting SNP effects on local RNA secondary structure

Please fill out the submission form and click the **Submit** button given below. Input fields marked with a * are required. ([Load Example Data](#))

Input sequence*

Enter your input sequence here in either fasta format or linear sequence (without gaps). [2]

```
TCCTACACCTACCTCTCTCTGGGCTTCTATTTCGACCGCGATGATGTGGCTCTGGAAAGGCGTGAGCCACT
TCTTCCGCGAATTGGCCGAGGAGAGCGCGAGGGCTACGAGCGTCTCCTGAAGATGCAAAAACCGCGTGG
CGGCCGCGCTCTCTCCAGGACATCAAGAAAGCCAGCTGAAGATGAGTGGGTAAAAACCCAGAGCCATG
AAAAGCTGCCATGGCCCTGGAGAAAAGCTGAACAGGCCCTTTGGATCTTCATGCCCCGGGTTCTGCC
GCACGGACCCCATCTCTGTGACTTCCCTGGAGACTCACTTCTAGATGAGGAAGTGAAGCTTATCAAGAA
GATGGGTGACCACTGACCAACCTCCACAGGCTGGGTGGCCCGGAGGCTGGGCTGGGGAGTATCTCTC
GAAAAGGCTCACTCAAGCACGACTAAGAGCCTTCTGAGCCAGCGACTCTGAAAGGGGCCCTTGCAAG
TAAATAGGGCTCTGCTAAGCCTCTCCCTCAGCCBATAGGCAGCTTCTTCTATCTCTAACAAGCCTT
```

(or) Upload sequence file:

(or) Select sequence from genome database

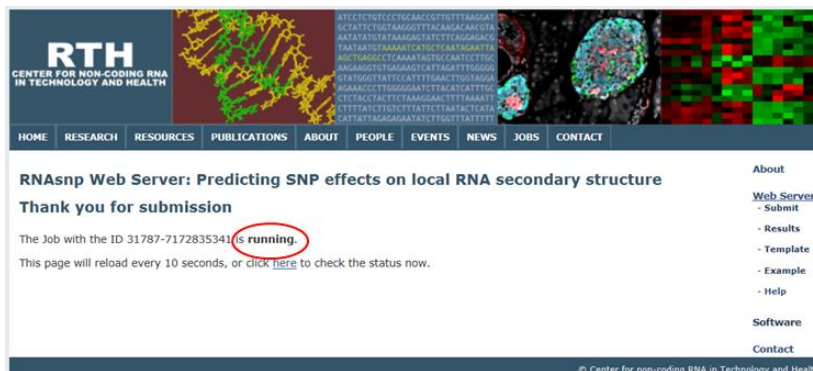
1. ป้อนลำดับนิวคลีโอไทป์

ต่อมาคือการกำหนดนิวคลีโอไทป์หรือตำแหน่งเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยนับตั้งแต่เบสตัวแรกจนถึงเบสตัวที่มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยกำหนดเบสที่เปลี่ยนไปจากเดิม เช่น ณ ตำแหน่งเบสที่ 22 มีการเปลี่ยนจากเบส T ไปเป็นเบส G กดเลือกโหมดที่ 1 และกำหนดค่าพารามิเตอร์ที่เครื่องมือทางชีวสารสนเทศตั้งไว้ให้ ใส่ชื่อและ E-mail เพื่อที่เครื่องมือทางชีวสารสนเทศจะส่งผลการวิเคราะห์ให้ เพื่อยืนยัน

The screenshot shows the 'SNP details*' section with a text input field containing 'T22G' and 'T22G-G17C'. A red box labeled '2. กำหนดตำแหน่งของนิวคลีโอไทป์ที่เปลี่ยนแปลง' points to this input. The 'Mode' section has 'Mode 1 - based on global folding (RNAfold)' selected, with a red box labeled '3. คลิก Mode ที่ 1' pointing to it. The 'Folding window' section has a dropdown set to '200'. The 'Additional options' section has 'Parameters associated with mode 1' with 'Minimum length of the sequence interval' set to '50' and 'Minimum cut-off for the base pair probabilities' set to '0.01'. A red box labeled '4. กำหนดค่าพารามิเตอร์' points to these values. The 'Job options' section has 'E-mail' and 'Job name' input fields, with a red box labeled '5. ใส่ชื่อและ E-mail' pointing to them. A red arrow points from the 'Submit' button in the next screenshot back to the 'Job options' section.

กด Submit แล้วรอประมวลผล

This close-up shows the 'Job options' section with 'E-mail' and 'Job name' input fields. To the right, the 'Minimum length of the sequence interval' is set to '50' and the 'Minimum cut-off for the base pair probabilities' is set to '0.01'. At the bottom, there are 'Submit' and 'Reset' buttons. A red box labeled '6. กด Submit' points to the 'Submit' button.



โหมดที่ 2

เป็นการคำนวณความน่าจะเป็นระยะห่างของเบส โดยใช้ local folding method RNAplfold

ป้อนลำดับนิวคลีโอไทป์ของ RNA ในรูปแบบของ FASTA ในกรอบที่กำหนด ทำเช่นเดียวกันกับ โหมดที่ 1 แต่กดเลือก โหมดที่ 2 กำหนดนิวคลีโอไทป์หรือตำแหน่งเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงไป โดยนับตั้งแต่เบสตัวแรกจนถึงเบสตัวที่มีการเปลี่ยนไปเช่นกันกับโหมดที่ 1 ใส่ค่าพารามิเตอร์ (โดยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศกำหนดมาให้) ใส่ชื่อ E-mail แล้วกด Submit รอประมวลผล

Input sequence*

Enter your input sequence here in either fasta format or linear sequence (without gaps). [?]

```
TCTTCCGCGAATTGGCCGAGGAGAAGCGGAGGGCTACGAGCGTCTCCTGAAGATGCAAACCAGCGTGG
CGGCCGCGCTCTTCCAGGACATCAAGAAGCCAGCTGAAGATGAGTGGGGTAAACCAGACGCCATG
AAAGCTGCCATGGCCCTGGAGAAAAGCTGAACCAGGCCCTTTGGATCTTCATGCCCTGGGTCTGCC
GCACGGACCCCATCTCTGTGACTTCTCTGGACTCACTTCTAGATGAGGAGTGAAGCTATCAAGAA
GATGGGTGACCACTGACCAACCTCCACAGGCTGGGTGGCCCGAGGCTGGGCTGGGCGATATCTTTC
GAAAGCTCACTCTCAAGCAGCTAAGGCTTCTGAGCCAGCAGCTTCTGAAGGGCCCTTGCAAAG
TAATAGGGCTCTGCCTAAGCCTCTCCCTCCAGCCAATAGGCAGCTTCTTAACATCTTAACAAGCCTT
GGACCAATGGAATAAAGCTTTTGTATGCA
```

(or) Upload sequence file:

(or) Select sequence from genome database

Mammal Human hg19 genome region chr19:49468565-494695

1. ใส่ลำดับนิวคลีโอไทป์

SNP details*

Enter your SNP details in the required format [?]

- XposY, X is the wild-type nt., Y is the mutant and pos is the position of nt. (pos=1 for first nucleotide in a sequence)
- In case of multiple SNPs, separate each SNP with hyphen "-"
- More than one SNP to test in a single run, provide them in separate lines

Mode

Select the mode of operation [?]

Mode 1 - based on global folding (RNAfold) [?]

Mode 2 - based on local folding (RNAplfold) [?]

Mode 3 - to screen putative structure-disruptive SNP [?]

Folding window

2. คลิกเลือก Mode 2

SNP details*

Enter your SNP details in the required format [?]

- XposY, X is the wild-type nt., Y is the mutant and pos position of nt. (pos=1 for first nucleotide in a sequence)
- In case of multiple SNPs, separate each SNP with hyphen "-"
- More than one SNP to test in a single run, provide them in separate lines

T22G
T22G-G17C

(or) Upload SNP file:

Mode

Select the mode of operation [?]

Mode 1 - based on global folding (RNAfold) [?]

Mode 2 - based on local folding (RNAplfold) [?]

Mode 3 - to screen putative structure-disruptive SNP [?]

Folding window

Select the size of flanking regions on either side of SNP [?]

200

Additional options

Parameters associated with mode 2 [?]

Average the pair probabilities over windows of size 200

Maximum allowed base pair span 120

Length over which the local structural changes should be evaluated 20

Length of the local structural we expect to have an effect 120

Job options

Enter your e-mail address if you want to receive a notification after the job has finished, and give your job any custom name.

E-mail

Job name

3. กำหนดตำแหน่งของนิวคลีโอไทป์ที่เปลี่ยนแปลง

4. ตั้งค่าพารามิเตอร์

5. ใส่ E-mail และชื่อ

6. กด Submit

โหมดที่ 3

เป็นการรวมเอาโหมดที่ 1 และ โหมดที่ 2 เพื่อจะออกแบความเป็นไปได้ของโครงสร้างโดยใช้ Brute-force

ป้อนลำดับนิวคลีโอไทป์ของ RNA ในรูปแบบของ FASTA กดเลือก โหมดที่สาม

RNAsnp Web Server: Predicting SNP effects on local RNA secondary structure

Please fill out the submission form and click the **Submit** button given below. Input fields: [\(Load Example Data\)](#)

Input sequence*

Enter your input sequence here in either fasta format or linear sequence (without gaps). [?]

TCTTCCGCGAATTGGCCGAGGAGAAGCGGAGGGCTACGAGCGTCTCCTGAAGTGC AAAA CCAGCGTGG
CGGCCGCGCTCTCTTCCAGGACATCAAGAGCCAGCTGAAGATGAGTGGGGTAAAAACCCAGACGCCATG
AAAGCTGCCATGGCCCTGGAGAAAAGCTGAACAGGCCCTTTGGATCTTCATGCCCTGGTTCTGGCC
GACCGGACCCCACTCTGTGACTTCTCGAGACTCACTTCTTAGATGAGGAGTGAAGCTATCAAGAA
GATGGGTGACCACTGACCAACCTCCACAGGCTGGGTGGCCGGAGGCTGGCTGGGAGTATCTCTTC
GAAGGCTCACTCTCAAGCAGACTAAGGCTTCTGAGCCACGCACTCTGAAGGGCCCTTGCAAAG
TAATAGGCTCTTGCCCTAAGCCTCTCCCTCCAGCCAATAGGCAGCTTCTTAAGTATCTTAACAGCCTT
GGACCAATGGAAATAAGCTTTTGTATGCA

(or) Upload sequence file:

(or) Select sequence from genome database

Mammal Human hg19 genome region chr19:49468565-4946951

Mode

Select the mode of operation [?]

Mode 1 - based on global folding (RNAfold) [?]

Mode 2 - based on local folding (RNAplfold) [?]

Mode 3 - to screen putative structure-disruptive SNP [?]

1. ใส่ลำดับนิวคลีโอไทป์

2. เลือก Mode ที่ 3

กำหนดค่าพารามิเตอร์ ใส่ชื่อและ E-mail แล้วกด Submit รอประมวลผลประมวลผล

SNP details*

Enter your SNP details in the required format [?]

- XposY, X is the wild-type nt., Y is the mutant and pos is the position of nt. (pos=1 for first nucleotide in a sequence)
- In case of multiple SNPs, separate each SNP with hyphen "-"
- More than one SNP to test in a single run, provide them in separate lines

Mode 3 is to screen putative structure disruptive SNPs, so SNP input is not required

(or) Upload SNP file:

Job options

Enter your e-mail address if you want to receive a notification after the job has finished, and give your job any custom name.

E-mail:

Job name:

Mode

Select the mode of operation [?]

Mode 1 - based on global folding (RNAfold) [?]

Mode 2 - based on local folding (RNAplfold) [?]

Mode 3 - to screen putative structure-disruptive SNP [?]

Folding window

Select the size of flanking regions on either side of SNP [?]:

Additional options

Parameters associated with mode 3 [?]

P-value threshold to filter SNPs that are predicted using Mode 2:

P-value threshold to filter SNPs that are predicted using Mode 1:

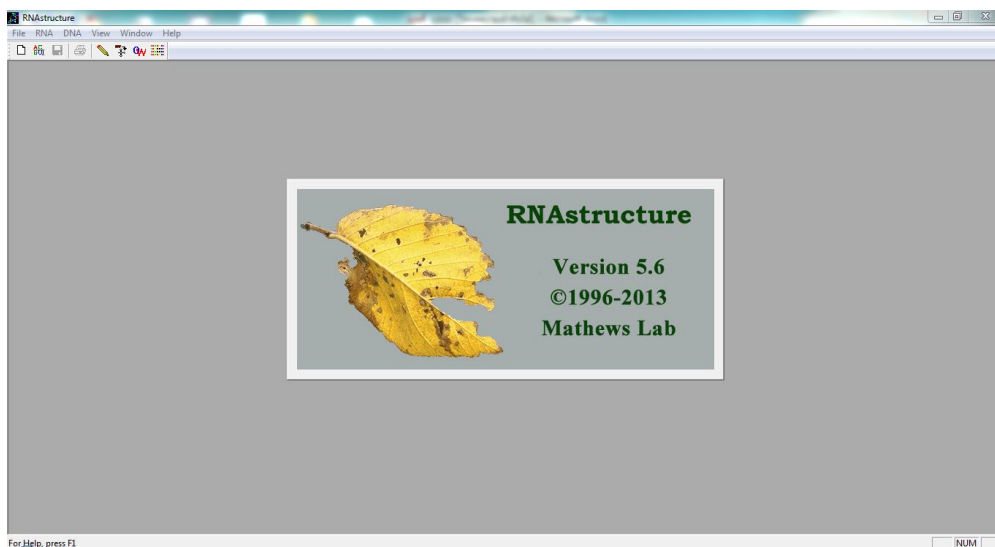
Minimum length of flanking regions on either of SNP:

4. ใส่ E-mail และ ชื่อ

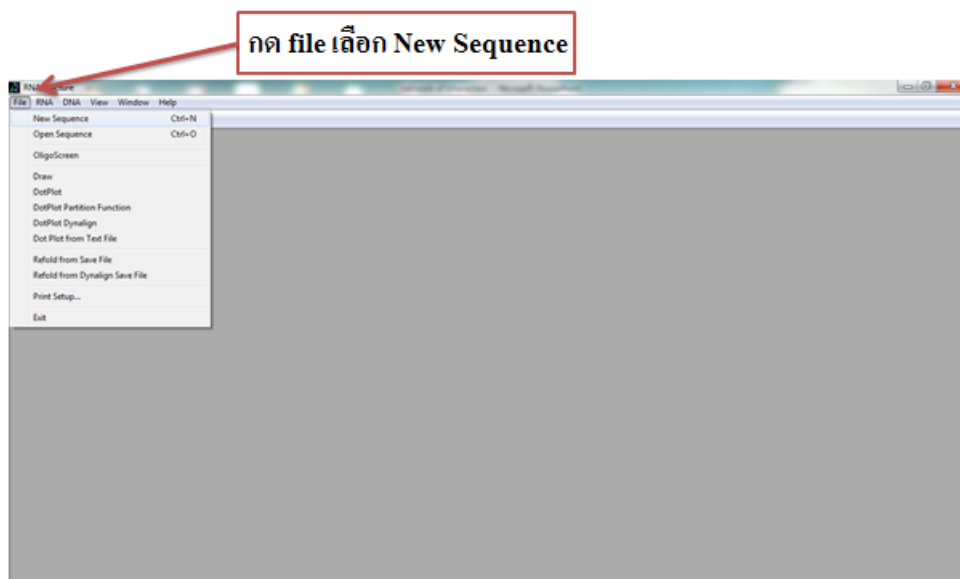
3. ตั้งค่าพารามิเตอร์

5. กด Submit

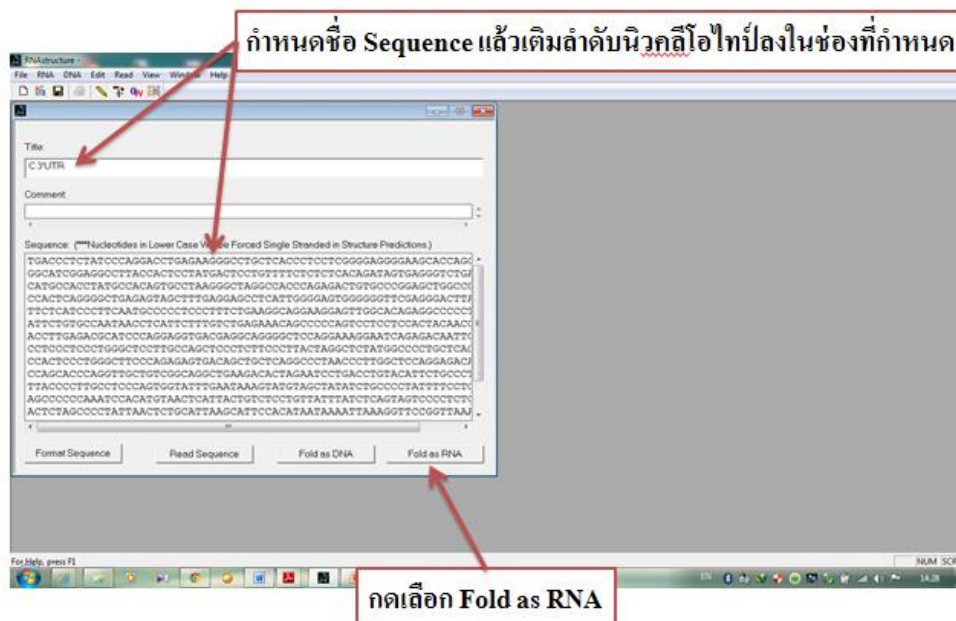
อีกหนึ่งเครื่องมือทางชีวสารสนเทศที่เลือกคือโปรแกรมที่มีชื่อว่า RNAstructure Version 5.6 ที่ออกแบบโดยทีมนักวิจัยของ Mathews Lab เป็นโปรแกรมการทำนายการ Fold โครงสร้างทุติยภูมิของ RNA



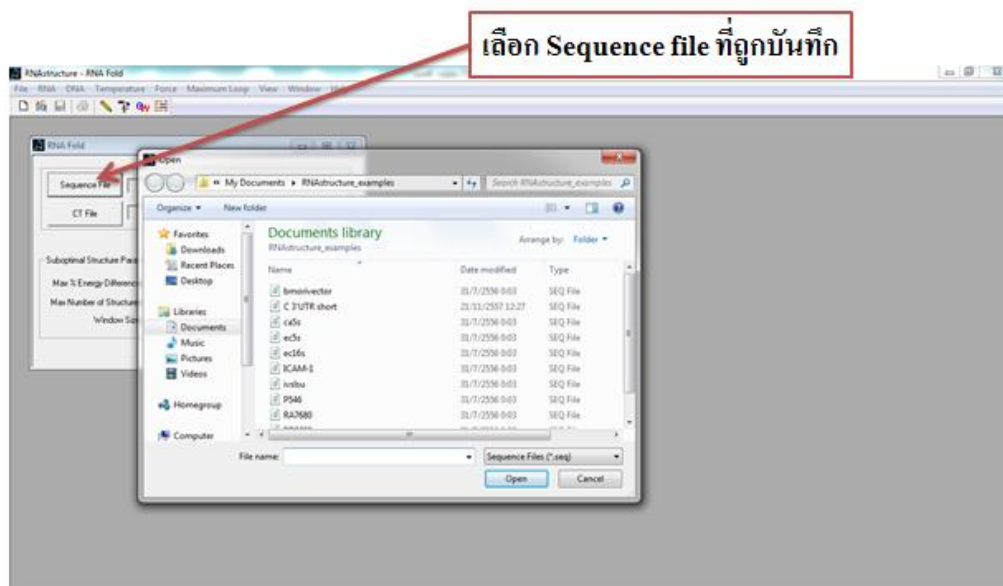
กดเลือก file แล้วกดเลือก New Sequence ในกรณีที่ไม่เคยใช้งานหรือมีการบันทึกข้อมูลของ Sequence



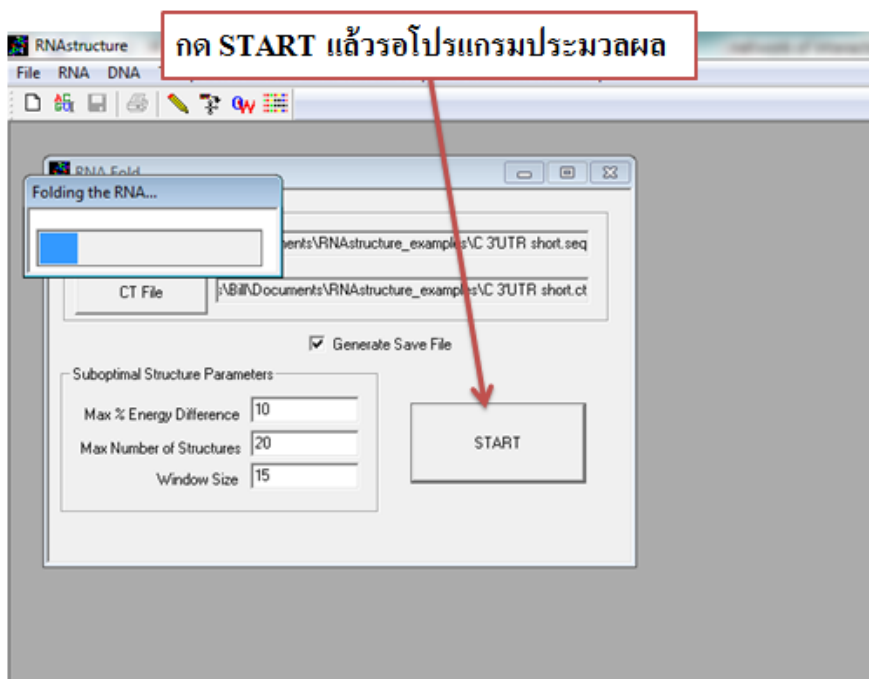
เครื่องมือทางชีวสารสนเทศจะขึ้นกรอบเพื่อให้เติม 1. ชื่อSequence ที่เราเป็นผู้กำหนด 2. ใต้ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ RNA ในกรณีที่มิสนิปให้เปลี่ยนเบสตัวใดตัวหนึ่ง เช่น เบส G เปลี่ยนเป็นเบส A โดยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศจะประมวลในแต่ละเบสไป กดเลือกปุ่ม Fold as a RNA แล้วจะบันทึกอัตโนมัติ



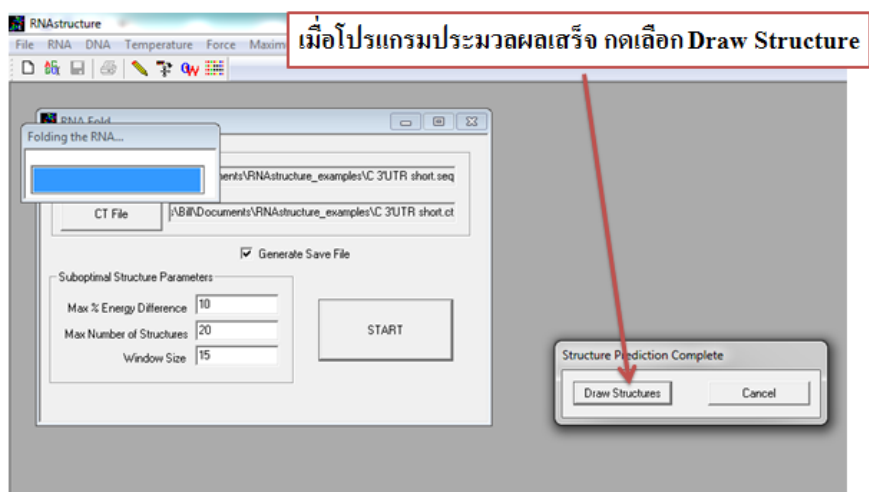
กดเลือกปุ่ม Sequence file แล้วเลือกรายการที่ถูกบันทึกก่อนหน้านี้



กด START แล้วรอประมวลผล สำหรับค่าพารามิเตอร์ที่กำหนด โดยเครื่องมือจะเลือกตามความเหมาะสมของ Sequence ที่ป้อนลงในโปรแกรม



เมื่อประมวลผลเสร็จสิ้น ให้เลือกกด Draw Structure แล้ว โปรแกรมจะแสดง โครงสร้างทุติยภูมิ (Mathews 2014)



เกณฑ์ในการเลือก โครงสร้างที่ได้จากเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ จะพิจารณาจาก โครงสร้างที่มีค่าพลังงานอิสระ หรือ เกล็ดน้ำจี้ (ΔG) ต่ำที่สุดในสภาวะจำลองพลศาสตร์ (dynamic)

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ศึกษา Association study และปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน *SOX10* กับยีน *RET-protooncogene*

การกระจายตัวของความถี่อัลลีล (allele distribution) ในแต่ละสปี Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) ทดสอบโดยใช้ Chi-square และการวิเคราะห์ Univariate เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความถี่อัลลีล (allele frequencies) และความถี่จีโนไทป์ (risk genotype frequencies) ระหว่างกลุ่มที่เป็นโรคและกลุ่มควบคุมโดยใช้ chi-square test โปรแกรมทางสถิติที่ใช้เป็น software Intercool Stata V 6.0 (Stata, TX, USA) โดยการรายงานคิดเป็นจำนวนและเปอร์เซ็นต์ (%) โดยค่า crude odds ratio และความเชื่อมั่นที่ 95% confidence interval (CI) ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ค่าถดถอยโลจิสติก และถือค่า $P\text{-value} < 0.05$ ในการแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสปี (SNP-SNP interaction analysis)

การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสปีหรือ SNP-SNP interaction จะทำระหว่างสองยีนเพื่อที่จะรวม allelotype ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคและเพื่อที่จะตรวจสอบตัวชี้วัด (marker) ที่รวมกัน (combination) ซึ่งเป็นกระบวนการคาดเดาที่ดีกว่าการตรวจสอบเพียงแค่ตัวชี้วัดเพียงตัวเดียว โดยมีพื้นฐานการตรวจสอบจากค่าพารามิเตอร์ (parameters) เช่น ระดับนัยสำคัญ ค่า OR และความถี่ของสปี allele โดยจะเลือกสปีตำแหน่ง rs2435357 (*RET-protooncogene*) rs139883 และ rs139884 (*SOX10*) สำหรับการวิเคราะห์ SNP-SNP interaction เมื่อทั้งสองยีนมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับโรค สำหรับปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน (gene-gene interaction) ซึ่งเป็นผลมาจากค่า multiplicative interaction ของ SNPs โดยใช้แบบจำลองค่าการถดถอยโลจิสติก (multiple logistic regression model) สำหรับในแต่ละคนเป็นตัวแปรที่สำคัญที่ถูกกำหนด binary variable ที่บ่งชี้ถึง

สถานะ case-control โดยตัวแปรสปีถูกกำหนดจาก 0-2 เป็นการบ่งชี้จำนวนของความถี่อัลลีล (risk alleles) ในแต่ละบุคคล ซึ่งเป็นวิธีที่อธิบายโดย Lewis (2002)

- Mathews, D. H. 2014. "RNA Secondary Structure Analysis Using RNAstructure." *Curr Protoc Bioinformatics* no. 46:12 6 1-12 6 25. doi: 10.1002/0471250953.bi1206s46.
- Phusantisampan, T., S. Sangkhathat, A. Phongdara, P. Chiengkriwate, S. Patrapinyokul, and S. Mahasirimongkol. 2012. "Association of genetic polymorphisms in the RET-protooncogene and NRG1 with Hirschsprung disease in Thai patients." *J Hum Genet* no. 57 (5):286-93. doi: 10.1038/jhg.2012.18.

บทที่ 3

ผลการวิจัย

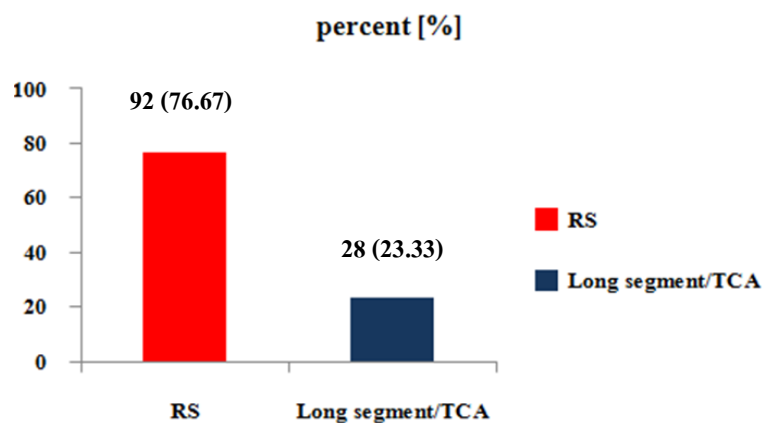
การศึกษากลุ่มประชากร (Characteristics of Study population)

การศึกษาในครั้งนี้ใช้รูปแบบ case-control study อัตราส่วนระหว่างเพศชายและหญิงของกลุ่มควบคุม (controls) และกลุ่มผู้ป่วย (cases) โดยมีอัตราส่วนร้อยละของเพศชายในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม คือ 87.67 และ 80.58 ส่วนอัตราส่วนร้อยละของเพศหญิง ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม คือ 18.33 และ 19.42 ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเพศชายและเพศหญิง ดังแสดงในตารางที่ 10

การศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วยผู้ป่วยกลุ่ม sporadic จำนวน 120 ราย แบ่งเป็นเพศชาย 98 คน และเพศหญิง 22 คน ลักษณะการเกิดพยาธิสภาพของโรคแตกต่างกันประกอบด้วย Short-Segment Hirschsprung disease หรือ S-HSCR จำนวน 92 ราย และกลุ่ม Long-Segment Hirschsprung disease หรือ L-HSCR/Total Colonic Aganglionosis หรือ TCA จำนวน 28 ราย (แผนภูมิที่ 1) และกลุ่มผู้มีสุขภาพดีไม่มีโรค และไม่มีประวัติทางครอบครัวที่เกี่ยวข้องกับการเป็นโรค ซึ่งข้อมูลได้จากแบบสอบถาม จำนวนทั้งหมด 242 คน แบ่งเป็นเพศชาย 195 คน และเพศหญิง 47 คน

ตารางที่10 แสดงการกระจายตัวระหว่างเพศชายและเพศหญิงในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม

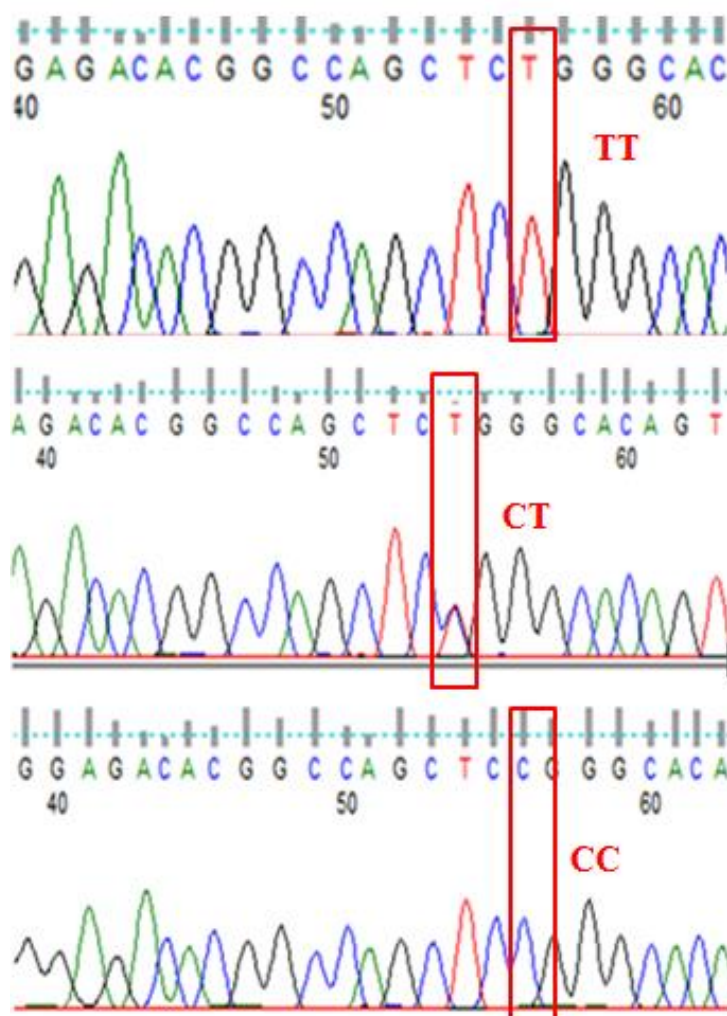
	cases	Percent[%]	controls	Percent[%]	<i>p-value</i>
All	120	100	242	100	0.80
Male	98	81.67	195	80.58	
Female	22	18.33	47	19.42	



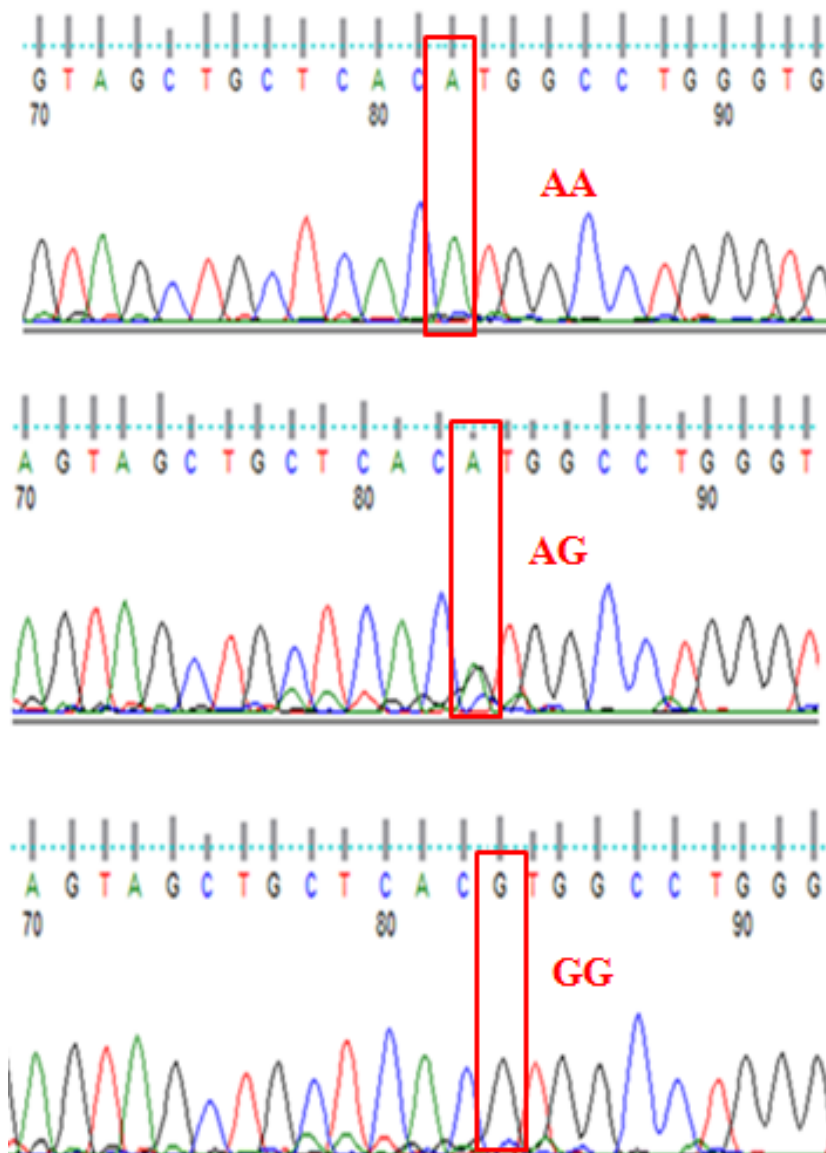
แผนภูมิที่1 แสดงการกระจายตัวของความยาวของ aganglionosis ในผู้ป่วย

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์ (Sequencing results)

การศึกษา polymorphisms ทั้งสามตำแหน่งได้แก่ ยีน *SOX10* rs139883 ที่มีจีโนไทป์ homozygous CC, heterozygous CT และ homozygous TT และอีกตำแหน่งบนยีนเดียวกันคือ rs139884 ที่มีจีโนไทป์ homozygous GG, heterozygous AG และ homozygous AA และยีน *RET* rs2435357 ที่มีจีโนไทป์ homozygous CC, heterozygous CT และ homozygous TT ในกลุ่ม sporadic HSCR และในกลุ่มควบคุม ได้ทำการค้นหาเบื้องต้นถึงตำแหน่งสลับที่ที่เกิดขึ้นโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทป์เพื่อนำผลที่ได้มาเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการอ้างอิง สำหรับการทดลองด้วยวิธีอื่นๆ แสดงในรูปที่ 18 และ 19



รูปที่ 18 แสดงโครมาโตแกรมผลซีควนซิง (Sequencing results) ของสลิปตำแหน่ง rs139883 บน ยีน *SOX10* แสดงจีโนไทป์ TT, CT และ CC (ภาพ A, B, C ตามลำดับ)



รูปที่ 19 แสดงโครมาโตแกรมผลซีควนซิง (Sequencing results) ของสลิปตำแหน่ง rs139884 บน ยีน *SOX10* แสดงจีโนไทป์ AA, AG และ GG (ภาพ A, B, C ตามลำดับ)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีปบนยีน *RET protooncogene* และ *SOX10* กับผู้ป่วยโรคลำไส้โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic

ผลการศึกษาความถี่จีโนไทป์และความถี่แอลลีล (Genotypes distribution and Alleles frequency) ทั้งสามสปีป

จากผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของความถี่จีโนไทป์สปีป rs2453537 บนยีน *RET protooncogene* และ rs139883, 139884 บนยีน *SOX10* โดยวิธี TaqMan SNP genotyping กับสปีปตำแหน่ง rs2453537 และ rs139884 (ภาพที่ 22 และ 23) และใช้วิธีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ Restriction Fragment Length Polymorphisms; RFLP เพื่อแยกขนาดของแบนบนเจลอะกาโรสที่ย้อมด้วยอะคริลาไมด์โดยส่องภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (ภาพที่ 20 และ 21) จากตารางที่ 11 แสดงการกระจายตัวของจีโนไทป์ในแต่ละสปีป ผลการศึกษาพบ rs2453537 มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ได้แก่ TT (62.50 %, 18.60%), CT (25.00 %, 53.72%) และ CC (12.50 %, 27.69%) และมีค่าความถี่ของ MAF ในกลุ่มผู้ป่วย (CC) และกลุ่มควบคุม (TT) ที่ 0.25 และ 0.45 ตามลำดับ rs139883 มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ได้แก่ TT (50.00 %, 56.20%), CT (34.17 %, 35.54%) และ CC (15.83 %, 8.26%) และมีค่าการกระจายของ MAF ในกลุ่มผู้ป่วย (CC) และกลุ่มควบคุม (CC) ที่ 0.33 และ 0.25 ตามลำดับและ rs139884 มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม ได้แก่ GG (58.33 %, 56.61%), AG (30.00 %, 35.54%) และ AA (11.67 %, 7.85%) และมีค่าการกระจายของ MAF ในกลุ่มผู้ป่วย (AA) และกลุ่มควบคุม (AA) ที่ 0.27 และ 0.24 ตามลำดับ

จากวิเคราะห์การกระจายของจีโนไทป์ในแต่ละสปีป พบว่า สปีป rs2453537 โดยมีจีโนไทป์ TT ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคที่ค่า *P-value* น้อยกว่า 0.01 และมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเป็น 7.44 เท่า (OR=7.44, 95% CI 3.80-14.56) เมื่อกำหนดให้ CC เป็นจีโนไทป์อ้างอิง (reference)

และการกระจายของจีโนไทป์ในแต่ละสปี พบว่า สปี rs139883 โดยมีจีโนไทป์ CC ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคที่ค่า *P-value* น้อยกว่า 0.01 และมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเป็น 3.74 เท่า (OR=7.44, 95% CI 1.53-9.08) เมื่อกำหนดให้ TT เป็นจีโนไทป์อ้างอิง (reference) แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 11 แสดงความถี่จีโนไทป์และความถี่แอลลีล (Genotypes distribution and Alleles frequency) ทั้งสามสไนป์ (rs2435357, rs139883 และ rs139884)

SNP	Genotype	Case (N=120)	Percent (%)	MAF	Control (N=242)	Percent (%)	MAF	HWE p-value
rs2435357	TT	75	62.50	0.25	45	18.60	0.45	0.10
	CT	30	25.00		129	53.72		
	CC	15	12.50		59	27.69		
rs139883	TT	60	50	0.33	132	56.20	0.25	0.14
	CT	41	34.17		81	35.54		
	CC	19	15.83		20	8.26		
rs139884	GG	70	58.33	0.27	133	56.61	0.24	0.20
	AG	36	30.00		81	35.54		
	AA	14	11.67		19	7.85		

MAF= Minor Allele Frequency

ค่า P -value < 0.05 ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์การกระจายของจีโนไทป์ในแต่ละสปีและความเสี่ยงต่อการเกิดโรค

SNPs	Cases	Controls	OR	P-value
rs2435357	(120)	(242)	95% CI	
CC	15 (12.50%)	67 (27.68%)	Reference	
CT	30 (25.00%)	130 (53.72%)	1.30 (0.51-2.04)	0.93
TT	75 (62.50%)	45 (18.59%)	7.44 (3.80-14.56)	<i><0.01</i>
rs139883	Cases (120)	Controls (242)	OR 95% CI	P-value
TT	60 (50.00%)	136 (56.20%)	Reference	
CT	41 (34.17%)	68 (28.10%)	1.12 (0.57-2.21)	0.74
CC	19 (15.83%)	20 (8.26%)	3.74 (1.53-9.08)	<i><0.01</i>
rs139884	Cases (120)	Controls (242)	OR 95% CI	P-value
GG	70 (58.33%)	137 (56.61%)	Reference	
AG	36 (30.00%)	86 (35.54%)	0.82 (0.50-1.33)	0.34
AA	14 (11.67%)	19 (7.85%)	1.44 (0.68-3.04)	0.42

ค่า $P\text{-value} < 0.05$ ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสลิปในรูปแบบ Dominant และ Recessive

การศึกษาเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในแต่ละสลิปโดยศึกษาทั้งแบบ Recessive model และ Dominant model จากผลการศึกษาในรูปแบบ Dominant เพื่อดูความสัมพันธ์ในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน *RET-protooncogene* rs2435357 (CT/TT) ที่ค่า *P-value* น้อยกว่า 0.01 (ตารางที่ 13) เมื่อทำการวิเคราะห์แบบ Recessive model พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสลิปตำแหน่ง *RET-prooncogene* rs2435357 (TT) และ *SOX10* rs139883 (CC) ที่ค่า *P-value* น้อยกว่า 0.01 และ 0.03 ตามลำดับ (ตารางที่ 14) การศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบความสัมพันธ์กับสลิป rs139884 (AA/AG/GG) บนยีน *SOX10* ทั้งในรูปแบบ Recessive model และ Dominant model

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับโรคแบบ Dominant model ทั้งสามสปี (rs2435357, rs139883 และ rs139884)

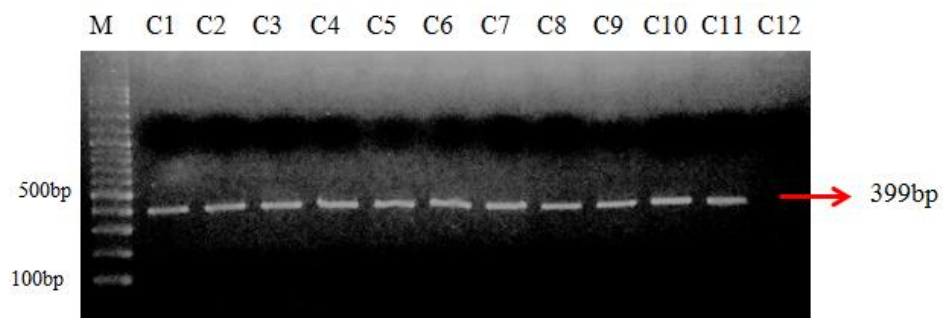
Group SNPs	Case N=120	Control N=242	P-value
rs2435357 CT/TT	105 (87.50%)	175 (72.31%)	<i><0.01</i>
CC	15 (12.50%)	67 (27.69%)	
rs139883 CT/CC	60 (50.00%)	106 (43.80%)	0.26
TT	60 (50.00%)	136 (56.20%)	
rs139884 AG/AA	50 (41.67%)	105 (43.39%)	0.75
GG	70 (58.33%)	137 (56.61%)	

ค่า $P\text{-value} < 0.05$ ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

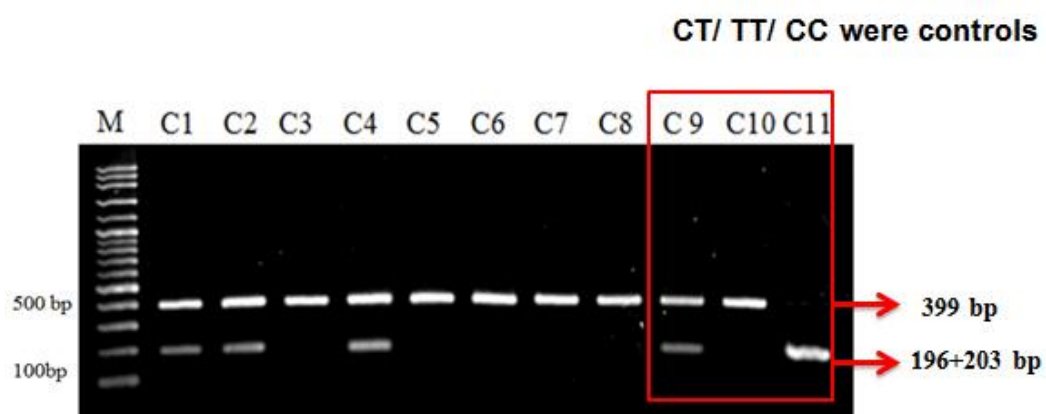
ตารางที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับโรคแบบ Recessive model ทั้งสามสปี (rs2435357, rs139883 และ rs139884)

Group SNPs	Case N=120	Control N=242	<i>P-value</i>
rs2435357			
TT	75 (62.50%)	45(18.60%)	<i><0.01</i>
CT/CC	45 (37.50%)	197(81.40%)	
rs139883			
CC	19 (15.83%)	20(8.26%)	<i>0.03</i>
CT/TT	101 (84.17%)	222 (91.74%)	
rs139884			
AA	14 (11.67%)	19 (57.58%)	0.23
AG/GG	106 (88.33%)	223 (67.78%)	

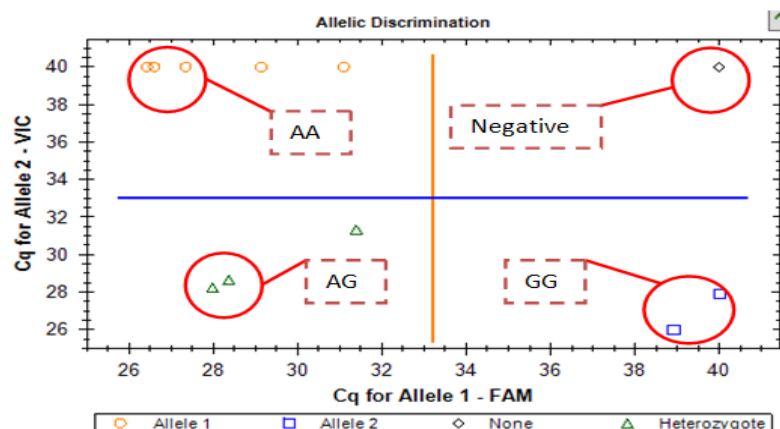
ค่า *P-value* < 0.05 ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ



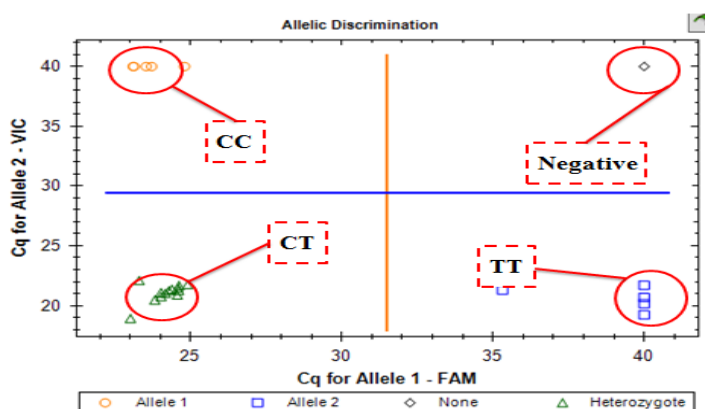
รูปที่ 20 แสดงผลผลิตกัมมันต์พีซีอาร์ของยีน *SOX10* โดย C1-C11 เป็นตัวอย่าง DNA ส่วน C12 เป็นตัวอย่างที่ไม่มี DNA (negative control)



รูปที่ 21 แสดงผลจากการทำ PCR-RFLP โดย C1-C8 เป็นตัวอย่างที่ไม่ทราบจีโนไทป์ ส่วน C9-C11 เป็นตัวอย่างที่ทราบจีโนไทป์ ได้แก่ CT, TT และ CC



รูปที่ 22 แสดง discrimination plot ของสนิป rs139884 โดยจุดสีที่แตกต่างกันเป็นตัวแทนของจีโนไทป์ที่ต่างกัน ได้แก่ สีฟ้า แทน GG, สีเขียว แทน AG, สีส้ม แทน AA และสีดำแทน negative control



รูปที่ 23 แสดง discrimination plot ของสนิป rs2435357 โดยจุดสีที่แตกต่างกันเป็นตัวแทนของจีโนไทป์ที่ต่างกัน ได้แก่ สีฟ้า แทน TT, สีเขียว แทน CT, สีส้ม แทน CC และสีดำแทน negative control

**การศึกษาความสัมพันธ์ของการกระจายของความยาว aganglionosis ในผู้ป่วย บนยีน
RET-protooncogene rs2435357 ยีน *SOX10* rs139883 และ rs139884**

การศึกษาการกระจายตัวของจีโนไทป์ในแต่ละสปีตามลักษณะพยาธิสภาพหรือความยาวของการขาดหายไปของปมประสาทในลำไส้ (aganglionosis length) พบความสัมพันธ์ของการกระจายตัวของจีโนไทป์ในผู้ป่วยกลุ่ม Long-HSCR/TCA ในสปีตำแหน่ง rs139883 บนยีน *SOX10* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า *P-value* เท่า 0.02 (ตารางที่ 15)

จากการศึกษาวิเคราะห์สมการถดถอย โดยค่าอัตราส่วนออกหรือ Odds Ratio (OR) และความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% confidence interval; CI) โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ aganglionosis length ในทุกรูปแบบ ได้แก่ Recessive model และ Dominant model ผลการศึกษาในรูปแบบ Recessive model พบว่า สปีตำแหน่ง rs139883 (CC) บนยีน *SOX10* มีจีโนไทป์ที่สัมพันธ์กับ aganglionosis length อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า *P-value* เท่ากับ 0.04 และมีค่าความเสี่ยง OR เท่ากับ 2.94 (ค่า 95% CI 1.05-8.28) เช่นเดียวกับการศึกษาในรูปแบบ Dominant model ที่พบความสัมพันธ์ของ rs139883 บนยีน *SOX10* (CC/CT) กับการกระจายตัวของ aganglionosis length ที่ค่า *P-value* เท่ากับ 0.01 และมีค่าอัตราส่วนออก เท่ากับ 3.25 (ค่า 95% CI 1.30-8.14) ดังแสดงในตารางที่ 16 และตารางที่ 17 การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์กับการกระจายตัวของ aganglionosis length กับสปีอีกสองตำแหน่งคือ *RET-protooncogene* rs2435357 และ *SOX10* rs139884

ตารางที่ 15 แสดงสัดส่วนของความยาว aganglionosis ทั้งสามชนิด (rs2435357, rs139883 และ rs139884)

SNPs	Short-HSCR	Long-HSCR/TCA	<i>P-value</i>
rs2435357			
TT	60 (65.22%)	15 (53.57%)	0.52
CT	21 (22.83%)	9 (32.14%)	
CC	11 (11.96%)	4 (14.29%)	
rs139883			
TT	52 (56.52%)	8 (28.57%)	0.02*
CT	29 (31.52%)	12 (42.86%)	
CC	11 (11.96%)	8 (28.57%)	
rs139884			
GG	57 (61.96%)	13 (4.43%)	0.29
AG	26 (28.26%)	10 (35.17%)	
AA	9 (9.78%)	14 (11.67%)	

ค่า *P-value* < 0.05 ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 16 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ตามความยาวของ aganglionosis แบบ Recessive

SNPs	Short-HSCR	Long-HSCR/TCA	OR 95% CI	<i>P-value</i>
rs2435357				
TT	60 (65.22%)	15 (53.57%)	0.61	0.27
CT/CC	32 (34.78%)	13 (46.43%)	(0.26-1.45)	
rs139883				
CC	11(11.96%)	8 (28.57%)	2.94	<i>0.04</i>
CT/TT	81(88.04%)	20 (71.43%)	(1.05-8.28)	
rs139884				
AA	9(9.78%)	5(17.86%)	2.00	0.25
AG/GG	83(90.22%)	23(82.14%)	(0.61-6.57)	

ค่า *P-value* < 0.05 ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 17 แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ตามความยาวของ aganglionosis แบบ Dominant

SNPs	Short-HSCR	Long-HSCR/TCA	OR 95% CI	<i>P-value</i>
rs2435357 TT/CT CC	81 (88.04%) 11 (11.96%)	24 (85.71%) 4 (14.29%)	0.81 (0.24-2.0)	0.74
rs139883 CC/CT TT	40(43.48%) 52(56.52%)	20 (71.43%) 8 (28.57%)	3.25 (1.30-8.14)	0.01
rs139884 AA/AG GG	35(38.04%) 57 (61.96%)	15(53.57%) 13(46.43%)	1.90 (0.80-4.41)	0.15

ค่า $P\text{-value} < 0.05$ ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาการกระจายตัวของจีโนไทป์ *RET-protooncogene* rs2435357, *SOX10* rs139883 และ rs139884 เมื่อวิเคราะห์แยกเพศ

การศึกษาความสัมพันธ์การกระจายตัวของจีโนไทป์ในแต่ละสปีชีส์เมื่อวิเคราะห์แยกเพศชายและเพศหญิงในกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม โดยทำการศึกษาในรูปแบบ Recessive model และ Dominant model

ผลการศึกษาในรูปแบบ Recessive model พบความสัมพันธ์ของ *RET-protooncogene* rs2435357 (TT) ในทั้งเพศชายและเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า *P-value* น้อยกว่า 0.01 และพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสปีชีส์ตำแหน่ง *SOX10* rs139883 (CC) เฉพาะในเพศหญิงเท่านั้นที่ค่า *P-value* เท่ากับ 0.04 ทั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติของสปีชีส์ตำแหน่ง *SOX10* rs139884 (AA) กับการกระจายตัวของทั้งเพศชายและหญิง (ตารางที่ 18) ส่วนการวิเคราะห์ในรูปแบบ Dominant model พบการกระจายตัวระหว่างสปีชีส์ตำแหน่ง *RET-protooncogene* rs2435357 (TT/CT) ที่มีสัมพันธ์กับเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า *P-value* น้อยกว่า 0.01 และยังพบความสัมพันธ์ของสปีชีส์ตำแหน่ง *SOX10* rs139883 (CC/CT) กับการกระจายตัวในหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า *P-value* เท่ากับ 0.02 และไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติกับการกระจายตัวของเพศชายและหญิงในสปีชีส์ตำแหน่ง *SOX10* rs139884 แสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์การกระจายตัวของจีโนไทป์และเพศ (Distribution between each SNPs and sex) แบบ Recessive

Sex group/SNPs	HSCR	Controls	<i>P-value</i>
Male			
rs2435357			
TT	66 (67.35%)	39 (20.00%)	
CT/CC	32 (17.02%)	156 (80.00%)	<i><0.01</i>
rs139883			
CC	14 (14.29%)	17 (8.72%)	
CT/TT	84 (85.71%)	178 (67.94%)	0.14
rs139884			
AA	12 (12.24%)	16 (8.21%)	
AG/GG	86 (87.76%)	179 (91.79%)	0.26
Female			
rs2435357			
TT	9 (40.91%)	6 (12.77%)	
CT/CC	13 (59.10%)	41 (87.23%)	<i><0.01</i>
rs139883			
CC	5 (22.73%)	3 (6.38%)	
CT/TT	17 (77.27%)	44 (93.62%)	<i>0.04</i>
rs139884			
AA	2 (9.10%)	3 (6.38%)	
AG/GG	20 (90.90%)	44 (93.62%)	0.68

ค่า *P-value* < 0.05 ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์การกระจายตัวของจีโนไทป์และเพศ (Distribution between each SNPs and sex) แบบ Dominant

Sex group/SNPs	HSCR	Controls	<i>P-value</i>
Male			
rs2435357			
TT/CT	88 (89.80%)	139 (71.28%)	<i><0.01</i>
CC	10 (10.20%)	56 (28.72%)	
rs139883			
CC/CT	45 (45.92%)	88 (45.13%)	0.89
TT	53 (54.08%)	107 (54.87%)	
rs139884			
AA/AG	40 (40.82%)	83 (42.56%)	0.77
GG	58 (59.18%)	112 (57.44%)	
Female			
rs2435357			
TT/CT	17 (77.27%)	36 (76.60%)	0.95
CC	5 (22.23%)	11 (23.40%)	
rs139883			
CC/CT	15 (68.20%)	18 (38.30%)	<i>0.02</i>
TT	7 (31.80%)	29 (61.70%)	
rs139884			
AA/AG	10 (45.45%)	22 (46.81%)	0.91
GG	12 (54.55%)	25 (53.19%)	

ค่า *P-value* < 0.05 ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ (SNP-SNP interaction) ระหว่างจีโนไทป์ในแต่ละสลิป

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาทำปฏิสัมพันธ์ (SNPs interaction or combination) ระหว่างจีโนไทป์ในแต่ละสลิปเพื่อดูอัตราเสี่ยงออกและความสัมพันธ์กับการเกิดโรค พบว่าสลิป rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene* เมื่อทำปฏิสัมพันธ์กับ rs139883 บนยีน *SOX10* โดยเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ที่ไม่มีความเสี่ยงคือ CC ของ rs2435357 (non-risk genotype) และ TT ของ rs139883 (non-risk genotype) เป็นตัวอ้างอิง (reference) พบว่าเมื่อจีโนไทป์ CC, CT ของสลิป rs2435357 ทำปฏิสัมพันธ์กับจีโนไทป์ที่มีความเสี่ยง CC (risk genotype) ของสลิป rs139883 พบว่า จะเพิ่มค่าอัตราส่วนออก จาก 0.67 (CI=0.13-3.35) เป็น 2.09 (CI=0.76-5.71) และเมื่อจีโนไทป์ที่มีความเสี่ยง TT ของสลิป rs2435357 ทำปฏิสัมพันธ์กับจีโนไทป์ที่มีความเสี่ยง CC ของสลิป rs139883 จะเพิ่มค่าอัตราส่วนออก เป็น 3.19 (CI=1.11-9.18) และมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่ค่า *P-value* เท่ากับ 0.03 และพบว่าเมื่อสลิปที่ประกอบด้วยแอลลีล C ของ rs139883 จะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่ค่า *P-value* น้อยกว่า 0.01 และ 0.03 ตามลำดับแสดงในตารางที่ 20

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสลิป rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene* และสลิป rs139884 บนยีน *SOX10* โดยเมื่อกำหนดให้จีโนไทป์ที่ไม่มีความเสี่ยงคือ CC ของสลิป rs2435357 (non-risk genotype) จีโนไทป์ GG ของสลิป rs139884 เป็นจีโนไทป์อ้างอิง (reference) เมื่อจีโนไทป์ของสลิป rs2435357 ได้แก่ CC และ CT ทำปฏิสัมพันธ์กับ heterozygous AG ของสลิป rs139884 พบว่าจะลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรค หรือค่าอัตราส่วนออก จาก 0.21 (CI=0.06-0.72) ไปเป็น 0.48 (CI=0.24-0.97) และมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่ค่า *P-value* เท่ากับ 0.01 และ 0.04 ตามลำดับ แต่กลับพบว่าเมื่อนำจีโนไทป์ที่มีความเสี่ยง คือ TT ของสลิป rs2435357 ทำปฏิสัมพันธ์กับ heterozygous AG ของ rs139884 กลับพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่ค่า *P-value* ที่น้อยกว่า 0.01 และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคโดยมีค่าอัตราส่วนออก เท่ากับ 2.77 (CI=1.43-5.044) ดังแสดงในตารางที่ 21 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสลิปภายในยีน *SOX10* คือ สลิป rs139883 และสลิป rs139884 โดยกำหนดให้จีโนไทป์ที่ไม่มีความเสี่ยงคือ TT ของสลิป rs139883 (non-risk genotype) กับจีโนไทป์ GG ของสลิป rs139884 (non-risk genotype) เป็นจีโนไทป์อ้างอิง

(reference) จากการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์กับการเกิดโรค และไม่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค
แสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 20 แสดงการศึกษาปฏิสัมพันธ์ (SNP-SNP interaction) ระหว่างสปีป rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene* และสปีป rs139883 บนยีน *SOX10*

SNP-SNP interaction	Combination Genotype-Genotype	Case	control	OR 95% CI	<i>P-value</i> *
rs2435357 rs139883	CC TT	8 (53.33%)	40 (59.70%)	Reference	
	CT	5 (33.33%)	21 (31.34%)	0.46 (0.17-1.24)	0.13
	CC	2 (13.33%)	6 (8.96%)	0.67 (0.13-3.35)	0.62
	CT TT	11 (36.67%)	78 (60.00%)	Reference	
	CT	11 (36.67%)	44 (33.85%)	0.45 (0.23-0.91)	0.03
	CC	8 (26.67%)	8 (6.15%)	2.09 (0.76-5.71)	0.15
	TT TT	41 (54.67%)	18 (40.00%)	Reference	
	CT	25 (33.33%)	21 (46.67%)	2.77 (1.48-5.20)	<0.01
	CC	9 (12.00%)	6 (13.33%)	3.19 (1.11-9.18)	0.03

ค่า *P-value* < 0.05 ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 21 แสดงการศึกษาปฏิสัมพันธ์ (SNP-SNP interaction) ระหว่างสปี rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene* และสปี rs139884 บนยีน *SOX10*

SNP-SNP interaction	Combination Genotype-Genotype	Case	control	OR 95% CI	<i>P-value</i> *
rs2435357 rs139884	CC GG	10 (66.67%)	38 (56.72%)	Reference	
	AG	3 (20.00%)	26 (38.80%)	0.21 (0.06-0.72)	<i>0.01</i>
	AA	2 (13.33%)	3 (4.48%)	1.35 (0.22-8.19)	0.74
	CT GG	14 (46.67%)	77 (59.23%)	Reference	
	AG	11 (36.67%)	42 (32.31%)	0.48 (0.24-0.97)	<i>0.04</i>
	AA	5 (31.25%)	11 (8.46%)	0.91 (0.31-2.69)	0.87
	TT GG	46 (61.33%)	22 (48.89%)	Reference	
	AG	22 (29.33%)	18 (40.00%)	2.79 (1.43-5.44)	<i><0.01</i>
	AA	7 (9.33%)	5 (11.11%)	2.94 (0.91-9.45)	0.07

ค่า *P-value* < 0.05 ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

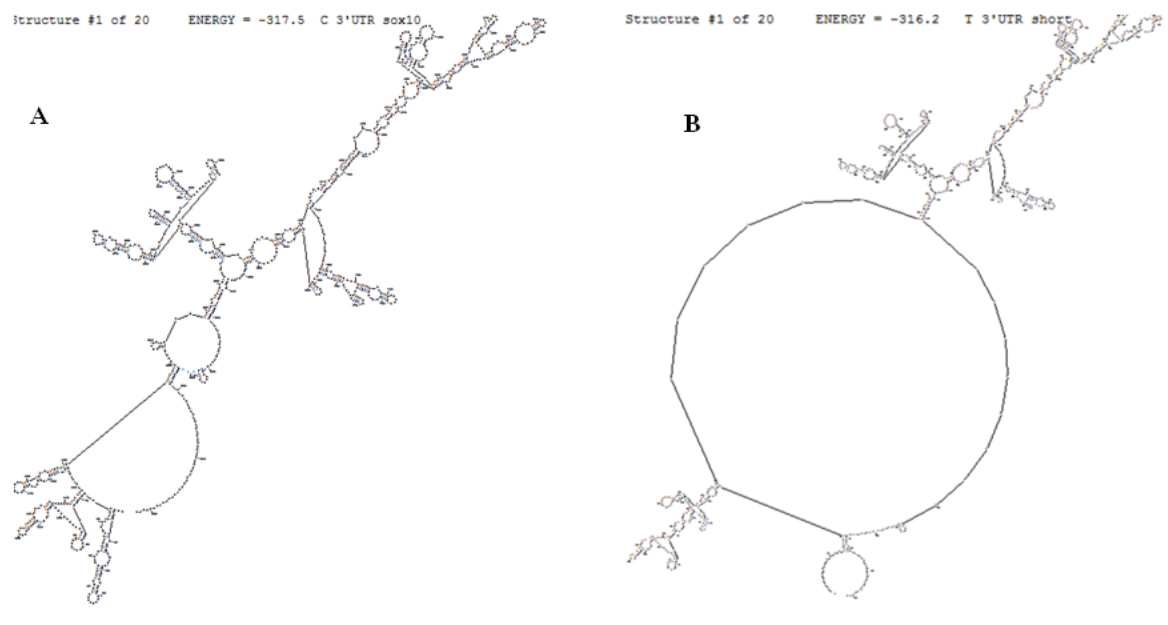
ตารางที่ 22 แสดงการศึกษาปฏิสัมพันธ์ (SNP-SNP interaction) ระหว่างสปี rs139883 และ rs139884 บนยีน *SOX10*

SNP-SNP interaction	Combination Genotype-Genotype	Case	control	OR 95% CI	<i>P-value</i> *
rs139883 rs139884	TT GG	51 (28.81%)	126 (71.19%)	Reference	
	AG	6 (40.00%)	9 (60.00%)	1.36 (0.47-3.92)	0.57
	AA	3 (75.00%)	1 (25.00%)	6.17 (0.63-60.04)	0.12
	CT GG	14 (58.33%)	10 (41.67%)	Reference	
	AG	27 (27.27%)	72 (72.73%)	0.68 (0.41-1.14)	0.15
	AA	0 (0.00%)	4 (100%)	N/A	
	CC GG	5 (83.33%)	1 (16.76%)	Reference	
	AG	3 (37.50%)	5 (62.50%)	1.21 (0.28-5.17)	0.79
	AA	11 (44.00%)	14 (56.00%)	1.64 (0.72-3.74)	0.24

ค่า *P-value* < 0.05 ถือเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA

ผลจากการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA โดยใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศชื่อว่า RNAstructure โดยกำหนดให้สลับ rs139883 ที่มีแอลลีลที่แตกต่างกันได้แก่ C และ T พบว่าโครงสร้างที่ได้จากการทำนายมีการม้วนพับ (folding) ที่แตกต่างกันของทั้งสองแอลลีล โดยที่ความน่าจะเป็น (probability) มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่าพลังงานหรือ energy ในโครงสร้างที่มีแอลลีล C คือ -317.5 และโครงสร้างที่มีแอลลีล T -316.2 ดังแสดงในรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA ภาพ A โครงสร้างทุติยภูมิที่มีแอลลีล C และ ภาพ B โครงสร้างทุติยภูมิที่มีแอลลีล T

บทที่ 4

บทวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาสองยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหาร ได้แก่ยีน *RET-protooncogene* (rs2435357) และยีน *SOX10* (rs239883 และ rs139884) โดยเลือกวิธีการที่ใช้ตรวจสอบจีโนมไทป์ คือ เทคนิค TaqMan SNP genotyping และใช้เทคนิคเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือ Restriction Fragment Length Polymorphisms หรือ RFLP และใช้การวิเคราะห์ในทุกๆรูปแบบ ได้แก่ Recessive และ Dominant เพื่อที่จะระบุความสัมพันธ์ของความแปรผัน (variability) ทางพันธุกรรมของยีน *RET-protooncogene* และยีน *SOX10* กับผู้ป่วยด้วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ชาวไทย

ยีน *RET-protooncogene* เป็นยีนที่ถอดรหัสมาเป็นโปรตีนตัวรับ tyrosine kinase ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 10 และประกอบไปด้วย 21 เอกซอน ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาและการเจริญของ enteric neuron (Kusafuka and Puri 1997) จากการติดตามผลการรายงานการศึกษาของ GWAS ที่มีการใช้สลิปตำแหน่ง rs2435357 เป็นตัวแทนของ LD region บนยีน *RET-protooncogene* สำหรับการตรวจสอบการติดตามการเกิดโรคการศึกษาไม่นานมานี้สามารถยืนยันถึงความเกี่ยวข้องของยีน *RET-protooncogene* ต่อการแสดงออกของโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Carrasquillo et al. 2002; Garcia-Barcelo et al. 2003; Garcia-Barcelo et al. 2004) และพบว่ามีการมี common variants และ rare variants บนยีน *RET-protooncogene* และยีน *NRG1* นั้นสามารถส่งผลต่อกระบวนการ neurogenesis และ gliogenesis ซึ่งทั้งสองกระบวนการล้วนแล้วแต่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของระบบประสาทภายในระบบประสาททางเดินอาหารซึ่งการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (Single Nucleotide Polymorphisms ; SNPs) บนยีน *RET-protooncogene* อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงภายในยีนเองและพบว่ากระจายตัวของสลิปบนยีน *RET-protooncogene* ที่ประกอบด้วยสลิปตำแหน่ง rs2435357 ที่อยู่บริเวณอินทรอน 1 ส่งผลต่อการลดการทำงานของยีนซึ่งนำไปสู่ความสัมพันธ์กับการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด (Garcia-Barcelo et al. 2009)

ยีน *RET-protooncogene* ถือเป็นยีนหลักต่อการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหาร แต่กระนั้น การทำงานของยีนก็ต้องถูกควบคุมโดยกลุ่มของ transcription factor อื่นๆ เช่น *SOX10*, *PAX3*, *EDNRB* เป็นต้น (Taraviras *et al.* 1999; Lang and Epstein 2003; Zhu *et al.* 2004) และการศึกษาครั้งนี้ยังยืนยันความสัมพันธ์อย่างมากกับสลิปตำแหน่ง rs2435357 (TT) ในผู้ป่วยโรคค้ำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ชาวคนไทยทั้งในรูปแบบ Recessive และ Dominant และผลการศึกษายังพบความสัมพันธ์ในทั้งเพศชายและเพศหญิงเมื่อวิเคราะห์แบบ Recessive และพบความสัมพันธ์กับเพศชายเมื่อวิเคราะห์แบบ Dominant การศึกษาทำให้ทราบถึงรูปแบบที่หลากหลายในการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ทั้งนี้มีปัจจัยเรื่องเพศมาเกี่ยวข้อง เช่นเดียวกันกับการศึกษาที่พบความสัมพันธ์ของสลิป rs2435357 ในกลุ่มประชากรจีน (Chinese population) และประชากรผิวขาว (Caucasians population) (Borrego *et al.* 2000; Phusantisampan *et al.* 2012; Gui *et al.* 2013; Sancandi *et al.* 2003; Burzynski *et al.* 2004; Fitze *et al.* 1999).

ยีน *SOX10* เป็นยีนที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 22 และแปรรหัสไปเป็นโปรตีน SOX10 ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม transcriptional regulator มีความสำคัญต่อการพัฒนาของระบบประสาทในสาย neural crest cell lineage. (Paul K.H. Tam 2004) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้ระบุสลิปของยีน *SOX10* และยีน *EDNRB* ในผู้ป่วย Waardenburg syndrome (WS4) ชาวจีน พบสลิปตำแหน่ง rs12720105, rs2070591, rs5349, rs5351, rs139884 และพบการกลายพันธุ์แบบ heterozygous ตำแหน่งใหม่ที่ไม่เคยรายงานมาก่อนบนยีน (Jiang *et al.* 2011) และเป็นที่น่าสนใจว่า การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *SOX10* ในผู้ป่วยด้วยโรคค้ำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดชาวจีนฮั่น (Han Chinese population) ไม่พบความสัมพันธ์ของทั้ง 4 สลิป ได้แก่ เอกซอน 2; c.18C >T and c.122G >T, intron 3; IVS3+10C >G, เอกซอน 4; rs139884 (Pan *et al.* 2011) ขณะเดียวกันยังไม่มีการรายงานความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *SOX10* ด้วยโรคค้ำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ชาวคนไทย

จากรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ถึงพบความสัมพันธ์ของสลิปตำแหน่ง rs139887 บนยีน *SOX10* กับคนไข้โรคจิตเภท (Schizophrenia) ในประชากรชาวญี่ปุ่น (Maeno *et al.* 2007) และได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในโรคนี้อีกเช่นเดียวกันในประชากรชาวจีนฮั่นกับสลิป

ตำแหน่ง rs139883 พบว่า แอลลีล C มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดโรคในอายุน้อยในผู้ป่วยทั้งหมดและโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยชาย (Yuan *et al.* 2013) การศึกษาครั้งนี้พบความสัมพันธ์ของสลิปตำแหน่ง rs139883 กับการเป็นโรคกล้ามเนื้อใหญ่โป่งพองแบบ sporadic อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์แบบ recessive (CC) และพบความสัมพันธ์กับการกระจายตัวที่สูงในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคในกลุ่ม long-segment HSCR และเพศหญิงเมื่อพิจารณาทั้งการกระจายตัวของจีโนไทป์ และวิเคราะห์ในรูปแบบของ recessive model พบการกระจายของ risk allele (C) ในเพศหญิงจากการศึกษาครั้งนี้อีกด้วย การวิเคราะห์ไม่พบความสัมพันธ์ของสลิป rs139884 ในผู้ป่วยโรคกล้ามเนื้อใหญ่โป่งพองแบบ sporadic ชาวไทย เช่นกันกับการศึกษาในประชากรจีนที่ไม่พบความสัมพันธ์กับสลิปดังกล่าวกับการเกิดโรค ซึ่งอาจจะบ่งบอกถึงการเกิดสลิป rs139884 บนยีน *SOX10* ไม่มีผลต่อการเกิดโรคกล้ามเนื้อใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดในประชากรชาวเอเชีย

การศึกษาในครั้งนี้นำไปสู่ความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ของสลิปตำแหน่ง rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene* และสลิปตำแหน่ง rs139883 บนยีน *SOX10* ซึ่งการศึกษาพบว่าการมีแอลลีล T ในสลิป rs2435357 ร่วมกับการมีแอลลีล C ใน rs139883 จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกล้ามเนื้อใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด สมมุติฐานอาจเป็นไปได้ถึงการมีสองแอลลีลร่วมกันต่อการหยุดการพัฒนาของระบบประสาททางเดินอาหารในระหว่างการเจริญเติบโตของตัวอ่อนเช่นเดียวกับการรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ การมี T-variant ของยีน *RET-protooncogene* สามารถไปขัดขวางการจับกันของตำแหน่ง binding site ของยีน *SOX10* ส่งผลให้เกิดการลดการทำงานและการแสดงออกของ RET ตามมา (Emison *et al.* 2005; Garcia-Barcelo *et al.* 2005).

สลิปตำแหน่ง rs139883 ตั้งอยู่บริเวณ 3' UTR และพบมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค สลิปในตำแหน่งนี้อาจทำให้การม้วนพับ (folding) ของสาย RNA เปลี่ยนไปได้และอาจจะส่งผลต่อความเสถียร (stability) ของ RNA ด้วยดังที่เคยมีการศึกษาพบว่าการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม rs27770 (A/G) บริเวณ 3' UTR ของยีน *Polo-like Kinase1 (PLK1)* ที่พบการแสดงออกที่สูงขึ้นในหลายๆมะเร็ง และมีผลต่อความเสถียรของ RNA พบว่าแอลลีลแตกต่างกันจากการทำนายโดยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศพบว่าส่งผลให้โครงสร้างของ RNA มีการเปลี่ยนแปลงไป และพบว่าแอลลีล A ยังส่งผลต่อเสถียรภาพของ RNA มากกว่าแอลลีล G ถึง 25% ดังนั้นการศึกษา

polymorphism ของยีน *PLKI* มีความน่าสนใจต่อความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง (Akdeli *et al.* 2014) และจากงานวิจัยเพื่อดูความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Histamine N-methyltransferase (HNMT)* ที่ตำแหน่ง 939A>G บริเวณ 3'UTR ที่ส่งผลต่อความเสถียรของ mRNA โดยการโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิด GFP และนำเข้าสู่เซลล์ HMC-1 พบว่า แอลลีล A จะมีความเสถียรที่น้อยกว่าแอลลีล G (Kim *et al.* 2009) จึงนำไปสู่ข้อสมมุติฐานที่ว่า การมีสปีปตำแหน่งดังกล่าว ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของ RNA จึงได้ทำนายโครงสร้างทุติยภูมิโดยใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศ คือ RNA structure พบว่าโครงสร้างของ RNA มีการม้วนพับเปลี่ยนไปจริง และได้ทำการทำนายผลโดยเครื่องมือที่แตกต่างกันก็ให้ผลโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปเช่นกัน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ RNA อาจจะมีผลต่อการทำงานและการแสดงออกของยีน *SOX10* การศึกษาครั้งนี้จะนำไปสู่ความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ด้านหน้าที่การทำงานของยีน *SOX10* ที่ส่งผลต่อการดำเนินโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาในแง่ของการทำงานร่วมกันกับยีน *RET-protooncogene* ต่อไป ดังที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ถึงการทำงานของ *SOX10* ที่จะกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (Transcription) ของยีน *RET-protooncogene* (Leon *et al.* 2009)

บทที่ 5

บทสรุป

การศึกษาครั้งนี้เพื่อดูความสัมพันธ์ของสลิปบนยีน *RET-protooncogene* สลิป rs2435357 และ ยีน *SOX10* สลิป rs139883 และ rs139884 กับผู้ป่วยด้วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ชาวไทย การศึกษายืนยันความสัมพันธ์ระหว่างสลิปตำแหน่ง rs2435357 (TT) ในฐานะปัจจัยเสี่ยงของโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิดแบบ sporadic ทั้งในรูปแบบ Recessive และ Dominant และผลการศึกษาที่ยืนยันความสัมพันธ์ในทั้งเพศชายและเพศหญิงเมื่อวิเคราะห์แบบ Recessive การศึกษาครั้งนี้ยังพบความสัมพันธ์ของสลิปตำแหน่ง rs139883 (CC) กับการเป็นโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองแบบ sporadic โดยความสัมพันธ์กับโรครดังกล่าวปรากฏชัดในเพศหญิง การกระจายตัวของจีโนไทป์บน rs139883 ยังสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรค อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ของสลิป rs139884 ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองแบบ sporadic ชาวไทย

นอกจากความสัมพันธ์เชิงเดี่ยวระหว่าง rs2435357 และ rs139883 กับการเกิดโรคแล้ว การศึกษายังพบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างสลิปทั้งสอง มีผลต่อการเพิ่มระดับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคลำไส้ใหญ่โป่งพองโดยกำเนิด

การศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อดูความสัมพันธ์ของทั้งสามสลิปกับการเกิดโรคและวิเคราะห์แยกเพศตลอดจนความยาวของการเกิดพยาธิสภาพ การศึกษายืนยันผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีต่อการแสดงออกและหน้าที่การทำงานของยีนเป็นสิ่งซึ่งจะต้องทำต่อไป

รายการเอกสารอ้างอิง

- Akdeli, N., K. Riemann, J. Westphal, J. Hess, W. Siffert, and H. S. Bachmann. 2014. "A 3'UTR polymorphism modulates mRNA stability of the oncogene and drug target Polo-like Kinase 1." *Mol Cancer* no. 13:87. doi: 10.1186/1476-4598-13-87.
- Amiel, J., Y. Espinosa-Parrilla, J. Steffann, P. Gosset, A. Pelet, M. Prieur, O. Boute, A. Choiset, D. Lacombe, N. Philip, M. Le Merrer, H. Tanaka, M. Till, R. Touraine, A. Toutain, M. Vekemans, A. Munnich, and S. Lyonnet. 2001. "Large-scale deletions and SMADIP1 truncating mutations in syndromic Hirschsprung disease with involvement of midline structures." *Am J Hum Genet* no. 69 (6):1370-7. doi: 10.1086/324342.
- Amiel, J., B. Laudier, T. Attie-Bitach, H. Trang, L. de Pontual, B. Gener, D. Trochet, H. Etchevers, P. Ray, M. Simonneau, M. Vekemans, A. Munnich, C. Gaultier, and S. Lyonnet. 2003. "Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome." *Nat Genet* no. 33 (4):459-61. doi: 10.1038/ng1130.
- Amiel, J., and S. Lyonnet. 2001. "Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review." *J Med Genet* no. 38 (11):729-39.
- Amiel, J., E. Sproat-Emison, M. Garcia-Barcelo, F. Lantieri, G. Burzynski, S. Borrego, A. Pelet, S. Arnold, X. Miao, P. Griseri, A. S. Brooks, G. Antinolo, L. de Pontual, M. Clement-Ziza, A. Munnich, C. Kashuk, K. West, K. K. Wong, S. Lyonnet, A. Chakravarti, P. K. Tam, I. Ceccherini, R. M. Hofstra, R. Fernandez, and Consortium Hirschsprung Disease. 2008. "Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review." *J Med Genet* no. 45 (1):1-14. doi: 10.1136/jmg.2007.053959.
- Attie, T., A. Pelet, P. Edery, C. Eng, L. M. Mulligan, J. Amiel, L. Boutrand, C. Beldjord, C. Nihoul-Fekete, A. Munnich, and et al. 1995. "Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease." *Hum Mol Genet* no. 4 (8):1381-6.
- Badner, J. A., W. K. Sieber, K. L. Garver, and A. Chakravarti. 1990. "A genetic study of Hirschsprung disease." *Am J Hum Genet* no. 46 (3):568-80.

- Baynash, A. G., K. Hosoda, A. Giaid, J. A. Richardson, N. Emoto, R. E. Hammer, and M. Yanagisawa. 1994. "Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons." *Cell* no. 79 (7):1277-85.
- Benailly, H. K., J. M. Lapierre, B. Laudier, J. Amiel, T. Attie, M. C. De Blois, M. Vekemans, and S. P. Romana. 2003. "PMX2B, a new candidate gene for Hirschsprung's disease." *Clin Genet* no. 64 (3):204-9.
- Bondurand, N., F. Dastot-Le Moal, L. Stanchina, N. Collot, V. Baral, S. Marlin, T. Attie-Bitach, I. Giurgea, L. Skopinski, W. Reardon, A. Toutain, P. Sarda, A. Echaieb, M. Lackmy-Port-Lis, R. Touraine, J. Amiel, M. Goossens, and V. Pingault. 2007. "Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4." *Am J Hum Genet* no. 81 (6):1169-85. doi: 10.1086/522090.
- Bondurand, N., K. Kuhlbrodt, V. Pingault, J. Enderich, M. Sajus, N. Tommerup, M. Warburg, R. C. Hennekam, A. P. Read, M. Wegner, and M. Goossens. 1999. "A molecular analysis of the yemenite deaf-blind hypopigmentation syndrome: SOX10 dysfunction causes different neurocristopathies." *Hum Mol Genet* no. 8 (9):1785-9.
- Borrego, S., A. Ruiz, M. E. Saez, O. Gimm, X. Gao, M. Lopez-Alonso, A. Hernandez, F. A. Wright, G. Antinolo, and C. Eng. 2000. "RET genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease." *J Med Genet* no. 37 (8):572-8.
- Borrego, S., F. A. Wright, R. M. Fernandez, N. Williams, M. Lopez-Alonso, R. Davuluri, G. Antinolo, and C. Eng. 2003. "A founding locus within the RET proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma." *Am J Hum Genet* no. 72 (1):88-100. doi: 10.1086/345466.
- Brunet, J. F., and A. Pattyn. 2002. "Phox2 genes - from patterning to connectivity." *Curr Opin Genet Dev* no. 12 (4):435-40.
- Burzynski, G. M., I. M. Nolte, J. Osinga, I. Ceccherini, B. Twigt, S. Maas, A. Brooks, J. Verheij, I. Plaza Menacho, C. H. Buys, and R. M. Hofstra. 2004. "Localizing a putative mutation as the major contributor to the development of sporadic Hirschsprung disease to the RET

- genomic sequence between the promoter region and exon 2." *Eur J Hum Genet* no. 12 (8):604-12. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201199.
- Carrasquillo, M. M., A. S. McCallion, E. G. Puffenberger, C. S. Kashuk, N. Nouri, and A. Chakravarti. 2002. "Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease." *Nat Genet* no. 32 (2):237-44. doi: 10.1038/ng998.
- Donis-Keller, H., S. Dou, D. Chi, K. M. Carlson, K. Toshima, T. C. Lairmore, J. R. Howe, J. F. Moley, P. Goodfellow, and S. A. Wells, Jr. 1993. "Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC." *Hum Mol Genet* no. 2 (7):851-6.
- Dubreuil, V., M. R. Hirsch, A. Pattyn, J. F. Brunet, and C. Goridis. 2000. "The Phox2b transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity." *Development* no. 127 (23):5191-201.
- Edery, P., S. Lyonnet, L. M. Mulligan, A. Pelet, E. Dow, L. Abel, S. Holder, C. Nihoul-Fekete, B. A. Ponder, and A. Munnich. 1994. "Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease." *Nature* no. 367 (6461):378-80. doi: 10.1038/367378a0.
- Emison, E. S., M. Garcia-Barcelo, E. A. Grice, F. Lantieri, J. Amiel, G. Burzynski, R. M. Fernandez, L. Hao, C. Kashuk, K. West, X. Miao, P. K. Tam, P. Griseri, I. Ceccherini, A. Pelet, A. S. Jannot, L. de Pontual, A. Henrion-Caude, S. Lyonnet, J. B. Verheij, R. M. Hofstra, G. Antinolo, S. Borrego, A. S. McCallion, and A. Chakravarti. 2010. "Differential contributions of rare and common, coding and noncoding Ret mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability." *Am J Hum Genet* no. 87 (1):60-74. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.06.007.
- Emison, E. S., A. S. McCallion, C. S. Kashuk, R. T. Bush, E. Grice, S. Lin, M. E. Portnoy, D. J. Cutler, E. D. Green, and A. Chakravarti. 2005. "A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk." *Nature* no. 434 (7035):857-63. doi: 10.1038/nature03467.
- Enomoto, A., H. Kimura, A. Chairoungdua, Y. Shigeta, P. Jutabha, S. H. Cha, M. Hosoyamada, M. Takeda, T. Sekine, T. Igarashi, H. Matsuo, Y. Kikuchi, T. Oda, K. Ichida, T. Hosoya, K. Shimokata, T. Niwa, Y. Kanai, and H. Endou. 2002. "Molecular identification of a

- renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels." *Nature* no. 417 (6887):447-52. doi: 10.1038/nature742.
- Fernandez, R. M., G. Boru, A. Pecina, K. Jones, M. Lopez-Alonso, G. Antinolo, S. Borrego, and C. Eng. 2005. "Ancestral RET haplotype associated with Hirschsprung's disease shows linkage disequilibrium breakpoint at -1249." *J Med Genet* no. 42 (4):322-7. doi: 10.1136/jmg.2004.023960.
- Fitze, G., H. Appelt, I. R. König, H. Gorgens, U. Stein, W. Walther, M. Gossen, M. Schreiber, A. Ziegler, D. Roesner, and H. K. Schackert. 2003. "Functional haplotypes of the RET proto-oncogene promoter are associated with Hirschsprung disease (HSCR)." *Hum Mol Genet* no. 12 (24):3207-14. doi: 10.1093/hmg/ddg354.
- Fitze, G., M. Schreiber, E. Kuhlisch, H. K. Schackert, and D. Roesner. 1999. "Association of RET protooncogene codon 45 polymorphism with Hirschsprung disease." *Am J Hum Genet* no. 65 (5):1469-73. doi: 10.1086/302618.
- Gabriel, S. B., R. Salomon, A. Pelet, M. Angrist, J. Amiel, M. Fornage, T. Attie-Bitach, J. M. Olson, R. Hofstra, C. Buys, J. Steffann, A. Munnich, S. Lyonnet, and A. Chakravarti. 2002. "Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease." *Nat Genet* no. 31 (1):89-93. doi: 10.1038/ng868.
- Garcia-Barcelo, M., R. W. Ganster, V. C. Lui, T. Y. Leon, M. T. So, A. M. Lau, M. Fu, M. H. Sham, J. Knight, M. S. Zannini, P. C. Sham, and P. K. Tam. 2005. "TTF-1 and RET promoter SNPs: regulation of RET transcription in Hirschsprung's disease." *Hum Mol Genet* no. 14 (2):191-204. doi: 10.1093/hmg/ddi015.
- Garcia-Barcelo, M. M., M. H. Sham, V. C. Lui, B. L. Chen, Y. Q. Song, W. S. Lee, S. K. Yung, G. Romeo, and P. K. Tam. 2003. "Chinese patients with sporadic Hirschsprung's disease are predominantly represented by a single RET haplotype." *J Med Genet* no. 40 (11):e122.
- Garcia-Barcelo, M. M., C. S. Tang, E. S. Ngan, V. C. Lui, Y. Chen, M. T. So, T. Y. Leon, X. P. Miao, C. K. Shum, F. Q. Liu, M. Y. Yeung, Z. W. Yuan, W. H. Guo, L. Liu, X. B. Sun, L. M. Huang, J. F. Tou, Y. Q. Song, D. Chan, K. M. Cheung, K. K. Wong, S. S. Cherny, P. C. Sham, and P. K. Tam. 2009. "Genome-wide association study identifies NRG1 as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* no. 106 (8):2694-9. doi: 10.1073/pnas.0809630105.

- Garcia-Barcelo, M., M. H. Sham, W. S. Lee, V. C. Lui, B. L. Chen, K. K. Wong, J. S. Wong, and P. K. Tam. 2004. "Highly recurrent RET mutations and novel mutations in genes of the receptor tyrosine kinase and endothelin receptor B pathways in Chinese patients with sporadic Hirschsprung disease." *Clin Chem* no. 50 (1):93-100. doi: 10.1373/clinchem.2003.022061.
- Gui, H., W. K. Tang, M. T. So, P. Proitsi, P. C. Sham, P. K. Tam, E. Sau-Wai Ngan, S. S. Cherny, and M. M. Garcia-Barcelo. 2013. "RET and NRG1 interplay in Hirschsprung disease." *Hum Genet* no. 132 (5):591-600. doi: 10.1007/s00439-013-1272-9.
- Hennekam, R. C., and R. J. Gorlin. 1996. "Confirmation of the Yemenite (Warburg) deaf-blind hypopigmentation syndrome." *Am J Med Genet* no. 65 (2):146-8. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19961016)65:2<146::AID-AJMG13>3.0.CO;2-Q.
- Holschneider, A. M., W. Meier-Ruge, and B. M. Ure. 1994. "Hirschsprung's disease and allied disorders--a review." *Eur J Pediatr Surg* no. 4 (5):260-6. doi: 10.1055/s-2008-1066115.
- Hosoda, K., R. E. Hammer, J. A. Richardson, A. G. Baynash, J. C. Cheung, A. Giaid, and M. Yanagisawa. 1994. "Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice." *Cell* no. 79 (7):1267-76.
- Ishimitsu, T., H. Ono, J. Minami, and H. Matsuoka. 2006. "Pathophysiologic and therapeutic implications of adrenomedullin in cardiovascular disorders." *Pharmacol Ther* no. 111 (3):909-27. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.02.004.
- J.Russell, Peter. 2000. *Fundamentals of Genetics*. 2 ed.
- Jiang, L., H. Chen, W. Jiang, Z. Hu, L. Mei, J. Xue, C. He, Y. Liu, K. Xia, and Y. Feng. 2011. "Novel mutations in the SOX10 gene in the first two Chinese cases of type IV Waardenburg syndrome." *Biochem Biophys Res Commun* no. 408 (4):620-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.072.
- Jing, S., D. Wen, Y. Yu, P. L. Holst, Y. Luo, M. Fang, R. Tamir, L. Antonio, Z. Hu, R. Cupples, J. C. Louis, S. Hu, B. W. Altmann, and G. M. Fox. 1996. "GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF." *Cell* no. 85 (7):1113-24.

- Julies, M. G., S. W. Moore, M. J. Kotze, and L. du Plessis. 2001. "Novel RET mutations in Hirschsprung's disease patients from the diverse South African population." *Eur J Hum Genet* no. 9 (6):419-23. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200650.
- Kanai, M., C. Numakura, A. Sasaki, E. Shirahata, K. Akaba, M. Hashimoto, H. Hasegawa, S. Shirasawa, and K. Hayasaka. 2002. "Congenital central hypoventilation syndrome: a novel mutation of the RET gene in an isolated case." *Tohoku J Exp Med* no. 196 (4):241-6.
- Kim, S. H., Y. M. Kang, S. H. Kim, B. Y. Cho, Y. M. Ye, G. Y. Hur, and H. S. Park. 2009. "Histamine N-methyltransferase 939A>G polymorphism affects mRNA stability in patients with acetylsalicylic acid-intolerant chronic urticaria." *Allergy* no. 64 (2):213-21. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01795.x.
- Kusafuka, T., and P. Puri. 1997. "The RET proto-oncogene: a challenge to our understanding of disease pathogenesis." *Pediatr Surg Int* no. 12 (1):11-8.
- Lane, P. W., and H. M. Liu. 1984. "Association of megacolon with a new dominant spotting gene (Dom) in the mouse." *J Hered* no. 75 (6):435-9.
- Lang, D, chen F, Milewski R, et al.: 2000. "Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with SOX10 to modulate expression of c-ret." *J Clin Invest* no. 106:963-971.
- Lang, D., and J. A. Epstein. 2003. "Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer." *Hum Mol Genet* no. 12 (8):937-45.
- Leon, T. Y., E. S. Ngan, H. C. Poon, M. T. So, V. C. Lui, P. K. Tam, and M. M. Garcia-Barcelo. 2009. "Transcriptional regulation of RET by Nkx2-1, Phox2b, Sox10, and Pax3." *J Pediatr Surg* no. 44 (10):1904-12. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.11.055.
- Luzon-Toro, B., A. Torroglosa, R. Nunez-Torres, M. V. Enguix-Riego, R. M. Fernandez, J. C. de Agustin, G. Antinolo, and S. Borrego. 2012. "Comprehensive analysis of NRG1 common and rare variants in Hirschsprung patients." *PLoS One* no. 7 (5):e36524. doi: 10.1371/journal.pone.0036524.
- Maeno, N., N. Takahashi, S. Saito, X. Ji, R. Ishihara, N. Aoyama, A. Branko, H. Miura, M. Ikeda, T. Suzuki, T. Kitajima, Y. Yamanouchi, Y. Kinoshita, N. Iwata, T. Inada, and N. Ozaki. 2007. "Association of SOX10 with schizophrenia in the Japanese population." *Psychiatr Genet* no. 17 (4):227-31. doi: 10.1097/YPG.0b013e3280ae6cd8.

- Masumoto, K., T. Arima, T. Izaki, Y. Takahashi, N. Honda, S. Toyoshima, and T. Shimotake. 2002. "Ondine's curse associated with Hirschsprung disease and ganglioneuroblastoma." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* no. 34 (1):83-6.
- Mathews, D. H. 2014. "RNA Secondary Structure Analysis Using RNAstructure." *Curr Protoc Bioinformatics* no. 46:12 6 1-12 6 25. doi: 10.1002/0471250953.bi1206s46.
- Miao, X., T. Y. Leon, E. S. Ngan, M. T. So, Z. W. Yuan, V. C. Lui, Y. Chen, K. K. Wong, P. K. Tam, and M. Garcia-Barcelo. 2010. "Reduced RET expression in gut tissue of individuals carrying risk alleles of Hirschsprung's disease." *Hum Mol Genet* no. 19 (8):1461-7. doi: 10.1093/hmg/ddq020.
- Mosse, Y. P., M. Laudenslager, D. Khazi, A. J. Carlisle, C. L. Winter, E. Rappaport, and J. M. Maris. 2004. "Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma." *Am J Hum Genet* no. 75 (4):727-30. doi: 10.1086/424530.
- Mulligan, L. M., J. B. Kwok, C. S. Healey, M. J. Elsdon, C. Eng, E. Gardner, D. R. Love, S. E. Mole, J. K. Moore, L. Papi, and et al. 1993. "Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A." *Nature* no. 363 (6428):458-60. doi: 10.1038/363458a0.
- Nagaya, M., J. Kato, N. Niimi, S. Tanaka, and N. Wakamatsu. 2002. "Clinical features of a form of Hirschsprung's disease caused by a novel genetic abnormality." *J Pediatr Surg* no. 37 (8):1117-22.
- Pachnis, V., B. Mankoo, and F. Costantini. 1993. "Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis." *Development* no. 119 (4):1005-17.
- Pan, Z. W., J. Lou, C. Luo, L. Yu, and J. C. Li. 2011. "Association analysis of the SOX10 polymorphism with Hirschsprung disease in the Han Chinese population." *J Pediatr Surg* no. 46 (10):1930-4. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2011.05.017.
- Pattyn, A., X. Morin, H. Cremer, C. Goriadis, and J. F. Brunet. 1999. "The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives." *Nature* no. 399 (6734):366-70. doi: 10.1038/20700.
- Paul K.H. Tam, Merce`Garcia-Barcelo. 2004. "Molecular genetics of Hirschsprung disease." *Seminars in Pediatric Surgery* no. 13:236-248

- Phusantisampan, T., S. Sangkhathat, A. Phongdara, P. Chiengkriwate, S. Patrapinyokul, and S. Mahasirimongkol. 2012. "Association of genetic polymorphisms in the RET-protooncogene and NRG1 with Hirschsprung disease in Thai patients." *J Hum Genet* no. 57 (5):286-93. doi: 10.1038/jhg.2012.18.
- Pingault, V., V. Bodereau, V. Baral, S. Marcos, Y. Watanabe, A. Chaoui, C. Fouveaut, C. Leroy, O. Verier-Mine, C. Francannet, D. Dupin-Deguine, F. Archambeaud, F. J. Kurtz, J. Young, J. Bertherat, S. Marlin, M. Goossens, J. P. Hardelin, C. Dode, and N. Bondurand. 2013. "Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness." *Am J Hum Genet* no. 92 (5):707-24. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.03.024.
- Pingault, V., N. Bondurand, K. Kuhlbrodt, D. E. Goerich, M. O. Prehu, A. Puliti, B. Herbarth, I. Hermans-Borgmeyer, E. Legius, G. Matthijs, J. Amiel, S. Lyonnet, I. Ceccherini, G. Romeo, J. C. Smith, A. P. Read, M. Wegner, and M. Goossens. 1998. "SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease." *Nat Genet* no. 18 (2):171-3. doi: 10.1038/ng0298-171.
- Pingault, V., M. Girard, N. Bondurand, H. Dorkins, L. Van Maldergem, D. Mowat, T. Shimotake, I. Verma, C. Baumann, and M. Goossens. 2002. "SOX10 mutations in chronic intestinal pseudo-obstruction suggest a complex physiopathological mechanism." *Hum Genet* no. 111 (2):198-206. doi: 10.1007/s00439-002-0765-8.
- Rohrer, T., D. Trachsel, G. Engelcke, and J. Hammer. 2002. "Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies." *Pediatr Pulmonol* no. 33 (1):71-6.
- Romeo, G., P. Ronchetto, Y. Luo, V. Barone, M. Seri, I. Ceccherini, B. Pasini, R. Bocciardi, M. Lerone, H. Kaariainen, and et al. 1994. "Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease." *Nature* no. 367 (6461):377-8. doi: 10.1038/367377a0.
- Ruiz-Ferrer, M., R. M. Fernandez, G. Antinolo, M. Lopez-Alonso, and S. Borrego. 2008. "NTF-3, a gene involved in the enteric nervous system development, as a candidate gene for Hirschsprung disease." *J Pediatr Surg* no. 43 (7):1308-11. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.02.076.

- Ruiz-Ferrer, M., R. M. Fernandez, G. Antinolo, M. Lopez-Alonso, C. Eng, and S. Borrego. 2006. "A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by both RET mutations and predisposing RET haplotypes." *Genet Med* no. 8 (11):704-10. doi: 10.109701.gim.0000245632.06064.f1.
- Ruiz-Ferrer, M., A. Torroglosa, R. Nunez-Torres, J. C. de Agustin, G. Antinolo, and S. Borrego. 2011. "Expression of PROKR1 and PROKR2 in human enteric neural precursor cells and identification of sequence variants suggest a role in HSCR." *PLoS One* no. 6 (8):e23475. doi: 10.1371/journal.pone.0023475.
- Ryan, E. T., J. L. Ecker, N. A. Christakis, and J. Folkman. 1992. "Hirschsprung's disease: associated abnormalities and demography." *J Pediatr Surg* no. 27 (1):76-81.
- Sakai, T., A. Wakizaka, H. Matsuda, Y. Nirasawa, and Y. Itoh. 1998. "Point mutation in exon 12 of the receptor tyrosine kinase proto-oncogene RET in Ondine-Hirschsprung syndrome." *Pediatrics* no. 101 (5):924-6.
- Sancandi, M., P. Griseri, B. Pesce, G. Patrone, F. Puppo, M. Lerone, G. Martucciello, G. Romeo, R. Ravazzolo, M. Devoto, and I. Ceccherini. 2003. "Single nucleotide polymorphic alleles in the 5' region of the RET proto-oncogene define a risk haplotype in Hirschsprung's disease." *J Med Genet* no. 40 (9):714-8.
- Sangkhathat, S., T. Kusafuka, P. Chengkriwate, S. Patrapinyokul, B. Sangthong, and M. Fukuzawa. 2006. "Mutations and polymorphisms of Hirschsprung disease candidate genes in Thai patients." *J Hum Genet* no. 51 (12):1126-32. doi: 10.1007/s10038-006-0064-7.
- Seri, M., I. Celli, N. Betsos, F. Claudiani, G. Camera, and G. Romeo. 1997. "A Cys634Gly substitution of the RET proto-oncogene in a family with recurrence of multiple endocrine neoplasia type 2A and cutaneous lichen amyloidosis." *Clin Genet* no. 51 (2):86-90.
- Seri, M., L. Yin, V. Barone, A. Bolino, I. Celli, R. Bocciardi, B. Pasini, I. Ceccherini, M. Lerone, U. Kristoffersson, L. T. Larsson, J. M. Casasa, D. T. Cass, M. J. Abramowicz, J. M. Vanderwinden, I. Kravcenkiene, I. Baric, M. Silengo, G. Martucciello, and G. Romeo. 1997. "Frequency of RET mutations in long- and short-segment Hirschsprung disease." *Hum Mutat* no. 9 (3):243-9. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:3<243::AID-HUMU5>3.0.CO;2-8.

- Sham, M. H., V. C. Lui, M. Fu, B. Chen, and P. K. Tam. 2001. "SOX10 is abnormally expressed in aganglionic bowel of Hirschsprung's disease infants." *Gut* no. 49 (2):220-6.
- Shima, Y., K. Teruya, and H. Ohta. 2006. "Association between intronic SNP in urate-anion exchanger gene, SLC22A12, and serum uric acid levels in Japanese." *Life Sci* no. 79 (23):2234-7. doi: 10.1016/j.lfs.2006.07.030.
- Simpson, N. E., K. K. Kidd, P. J. Goodfellow, H. McDermid, S. Myers, J. R. Kidd, C. E. Jackson, A. M. Duncan, L. A. Farrer, K. Brasch, and et al. 1987. "Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage." *Nature* no. 328 (6130):528-30. doi: 10.1038/328528a0.
- Skinner, M. A. 1996. "Hirschsprung's disease." *Curr Probl Surg* no. 33 (5):389-460.
- Southard-Smith, E. M., M. Angrist, J. S. Ellison, R. Agarwala, A. D. Baxevanis, A. Chakravarti, and W. J. Pavan. 1999. "The Sox10(Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome." *Genome Res* no. 9 (3):215-25.
- Tang, C. S., W. K. Tang, M. T. So, X. P. Miao, B. M. Leung, B. H. Yip, T. Y. Leon, E. S. Ngan, V. C. Lui, Y. Chen, I. H. Chan, P. H. Chung, X. L. Liu, X. Z. Wu, K. K. Wong, P. C. Sham, S. S. Cherny, P. K. Tam, and M. M. Garcia-Barcelo. 2011. "Fine mapping of the NRG1 Hirschsprung's disease locus." *PLoS One* no. 6 (1):e16181. doi: 10.1371/journal.pone.0016181.
- Taraviras, S., C. V. Marcos-Gutierrez, P. Durbec, H. Jani, M. Grigoriou, M. Sukumaran, L. C. Wang, M. Hynes, G. Raisman, and V. Pachnis. 1999. "Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system." *Development* no. 126 (12):2785-97.
- Torfs, C. P., and R. E. Christianson. 1998. "Anomalies in Down syndrome individuals in a large population-based registry." *Am J Med Genet* no. 77 (5):431-8.
- Touraine, R. L., T. Attie-Bitach, E. Manceau, E. Korsch, P. Sarda, V. Pingault, F. Encha-Razavi, A. Pelet, J. Auge, A. Nivelon-Chevallier, A. M. Holschneider, M. Munnes, W. Doerfler, M. Goossens, A. Munnich, M. Vekemans, and S. Lyonnet. 2000. "Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain." *Am J Hum Genet* no. 66 (5):496-503. doi: 10.1086/302895.

- Trochet, D., F. Bourdeaut, I. Janoueix-Lerosey, A. Deville, L. de Pontual, G. Schleiermacher, C. Coze, N. Philip, T. Frebourg, A. Munnich, S. Lyonnet, O. Delattre, and J. Amiel. 2004. "Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma." *Am J Hum Genet* no. 74 (4):761-4. doi: 10.1086/383253.
- Weese-Mayer, D. E., S. Bolk, J. M. Silvestri, and A. Chakravarti. 2002. "Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: evaluation of brain-derived neurotrophic factor genomic DNA sequence variation." *Am J Med Genet* no. 107 (4):306-10.
- Yamada, K., Y. Yamada, N. Nomura, K. Miura, R. Wakako, C. Hayakawa, A. Matsumoto, T. Kumagai, I. Yoshimura, S. Miyazaki, K. Kato, S. Sonta, H. Ono, T. Yamanaka, M. Nagaya, and N. Wakamatsu. 2001. "Nonsense and frameshift mutations in ZFH1B, encoding Smad-interacting protein 1, cause a complex developmental disorder with a great variety of clinical features." *Am J Hum Genet* no. 69 (6):1178-85.
- Yuan, A., W. Li, T. Yu, C. Zhang, D. Wang, D. Liu, Y. Xu, H. Li, and S. Yu. 2013. "SOX10 rs139883 polymorphism is associated with the age of onset in schizophrenia." *J Mol Neurosci* no. 50 (2):333-8. doi: 10.1007/s12031-013-9982-y.
- Zhu, L., H. O. Lee, C. S. Jordan, V. A. Cantrell, E. M. Southard-Smith, and M. K. Shin. 2004. "Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors." *Nat Genet* no. 36 (7):732-7. doi: 10.1038/ng1371.
- กนกวรรณ จารุกัจฉา, วรรณา จตุพรประเสริฐ. 2007. "สนิป:ความรู้พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้ (SNP: Basic Knowledge to Applications)." *Thai Pharm Health Sci J.* no. 2 (2):166-174.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นายการุณ เอียดยาว		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5510320021		
วุฒิการศึกษา			
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา	
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)	มหาวิทยาลัยรังสิต	2554	

ทุนการศึกษา

1. ทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากหน่วยส่งเสริม พัฒนาวิชาการ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ผลงานวิชาการ

1. ฤทธิ์ลดไขมันในเลือดและปกป้องอวัยวะสำคัญของเมทิลยูจีนอล ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (Hypolipidemic Effect of Methyl Eugenol in Hypercholesterolemic Rats), 2011[unpublished]

ผลงานตีพิมพ์/การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ

- Eadyow, K., Phusantisampan, T., Maneechay, W., Sangkhathat, S., P.2014. Single Nucleotide Polymorphisms of *SOX10* in Thai Patients with Sporadic Hirschsprung Disease. The 2nd ASIAN Plus Three Graduate Research Congress (AGRC2014), February 5-7, 2014. pp. 335-341
- Eadyow, K., Phusantisampan, T., Maneechay, W., Sangkhathat, S., P.2014. Single Nucleotide Polymorphisms of *SOX10* gene and their interaction with the *RET-protooncogene* SNP rs2435357 in Thai Patients with Sporadic Hirschsprung Disease. 30th Faculty of Medicine Research Conference “Tracks and Trends in healthcare” August 6-8, 2014. at. 135
- Eadyow, K., Phusantisampan, T., Maneechay, W., Sangkhathat, S., P.2014. Single Nucleotide Polymorphisms of *SOX10* gene and their interaction with the *RET-protooncogene* SNP rs2435357 in Thai Patients with Sporadic Hirschsprung Disease. The 26th annual meeting

of the Thai Society for Biotechnology and international conference (TSB2014), November 26-29. at. 130