NRU-PSU-Report (1.2)

รูปแบบรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ แบบที่ 1 (สำหรับโครงการวิจัยเดี่ยวหรือโครงการวิจัยย่อย)

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรค progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) ในทารกที่เป็นดีซ่านแบบ cholestasis

Mutation analysis of genes associated with progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) in infants with cholestatic jaundice

คณะนักวิจัย

รศ.นพ. เสกสิต โอสถากุล ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ปรึกษาโครงการ

รศ.นพ. สุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หัวหน้าโครงการ

รศ.พญ.ปิยวรรณ เชียงไกรเวช ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ร่วมโครงการ

รศ.นพ.ศักดา ภัทรภิญโญกุลภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ร่วมโครงการ

พญ.สมรมาศ กันเงิน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ร่วมโครงการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการมหาวิทยาลัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2550

1. ชื่อชุดโครงการ (ระบุกรณีเป็นโครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ)

ชื่อโครงการ

ภาษาไทย: การตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรค progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) ในทารกที่เป็นดีซ่านแบบ cholestasis

ภาษาอังกฤษ: Mutation analysis of genes associated with progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) in infants with cholestatic jaundice

คณะนักวิจัยและคณะ/หน่วยงานต้นสังกัด

1. รศ.นพ. เสกสิต โอสถากุล
   ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ปรึกษาโครงการ
2. รศ.นพ. สุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา
   ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หัวหน้าโครงการ
3. รศ.พญ.ปิยวรรณ เชียงไกรเวช
   ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ร่วมโครงการ
4. รศ.นพ.ศักดา ภัทรภิญโญกุล
   ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ร่วมโครงการ
5. พญ.สมรมาศ กันเงิน
   ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ร่วมโครงการ

สารบัญ รายการตารางและรายการภาพประกอบ

หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อ	4
บทนำ	5
วัตถุประสงค์	6
การตรวจเอกสาร	6
ผลการศึกษา	10
เอกสารอ้างอิง	15

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เสร็จสิ้นลงได้ด้วยความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยและเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่อนุญาตให้เข้าใช้บริการ nucleotide sequencing ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่อำนวยความสะดวกในการเข้าใช้สถานที่

บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

ภาวะท่อน้ำดีตีบในทารก (biliary atresia) เป็นโรคซึ่งพบน้อย แต่สามารถรักษาได้หากวินิจฉัยได้เร็ว ลักษณะพยาธิวิทยาของโรคเป็นการอักเสบของทางเดินน้ำดีบริเวณขั้วตับ (porta hepatis) พยาธิกำเนิดของโรคดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบชัด หลักฐานชี้นำไปว่าพันธุกรรมอาจมีส่วนในการเกิดโรคดังกล่าวนี้ผ่านทางระบบภูมิคุ้มกันต้านตนเอง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน FIC1(ATP8B1), BSEP(ABCB11) และ MDR3 (ABCB4) ในตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยโรคดังกล่าว การศึกษาใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยทารก 5 รายซึ่งมีผลทางพยาธิวิทยายืนยันว่าป่วยเป็นโรค biliary atresia และได้รับการผ่าตัดในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ผู้ป่วยเป็นเพศหญิงทั้ง 5 รายและมีมัธยฐานอายุ 2 เดือน การศึกษาการกลายพันธุ์ใช้วิธี PCR และ direct nucleotide sequencing ผลการศึกษาในผู้ป่วย 5 ราย ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีนทั้ง 3 การศึกษาให้ข้อสรุปคือสามารถพัฒนากระบวนการตรวจยีนที่เกี่ยวข้องโดยวิธีการหาลำดับเบส อย่างไรก็ตาม ยีนทั้งสามไม่น่าจะเป็น candidate ที่มี high penetrance ในกลุ่มผู้ป่วยโรคนี้ การศึกษาต่อไปน่าจะต้องใช้จำนวนผู้ป่วยที่มากขึ้นและเลือกใช้วิธีที่มี coverage กว้างขึ้นเช่น next-generation sequencing

Although biliary atresia is a rare disease in human, it is the most common cause of surgically correctable exytahepatic cholestasis in infants. Pathology of the disease is destructive inflammation of the bile duct at the porta hepatis. Pathogenesis of the disease remains unclear but evidences have suggested that genetically mediated autoimmune condition may play role. This study aimed to study 3 candidate genes, FIC1(ATP8B1), BSEP(ABCB11) และ MDR3 (ABCB4), in infants with this disease. DNA samples were taken from 5 infants with histologically confirmed biliary atresia and were operated on in Songklanagarind Hospital. All were females. Median age was 2 months. Mutation study used polymerase chain reaction and direct sequencing method. The study found no mutations in all 3 candidate gene study. The study suggested that in order to identify genetic factors related to biliary atresia, more cases need to be included in the study. More coverage of the genetic read, i.e. using the next-generation sequencing, should also be considered.

บทนำ

ภาวะดีซ่าน (cholestatic jaundice) ในทารกเป็นปัญหาทางคลินิกที่พบบ่อยประการหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถาบันซึ่งเป็นศูนย์รับส่งต่อระดับตติยภูมิเช่นโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ สาเหตุของภาวะดีซ่านแบบ cholestasis มีหลากหลายและสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มหลักได้แก่การอุดกั้นนอกตับ (extrahepatic obstruction) และสาเหตุจากภายในตับ (hepatocellular causes) ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มหลังมีสาเหตุส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม idiopathic neonatal hepatitis กล่าวคือไม่สามารถตรวจพบเหตุจำเพาะของ cholestasis ได้ การศึกษาของเสกสิต โอสถากุล และคณะพบ idiopathic hepatitis ถึงร้อยละ 25 ของทารกที่ประสบภาวะ neonatal cholestasis ซึ่งเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ (Osatakul 1989)

ในระยะที่ผ่านมาไม่นาน มีการค้นพบว่าสาเหตุของภาวะดีซ่านในทารกที่เคยเชื่อว่าเป็น idiopathic hepatitis ส่วนหนึ่งเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมซึ่งมีผลต่อการขนส่งน้ำดีในระดับท่อน้ำดีฝอย (intrahepatic canalicular transportation) กลุ่มความผิดปกติดังกล่าวนี้รู้จักกันในชื่อ progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) PFIC แบ่งออกตามยีนซึ่งเกี่ยวข้องออกเป็น 3 ชนิด ซึ่งสัมพันธ์กับยีน FIC1 (ATP8B1), BSEP (ABCB11) และ MDR3 (ABCB4) ตามลำดับ เนื่องด้วยข้อจำกัดในการวินิจฉัย อุบัติการณ์ที่แท้จริงของ PFIC ยังไม่เป็นที่ทราบชัด แม้ PFIC ทั้งสามชนิดมีรายละเอียดของลักษณะทางคลินิกและลักษณะทางพยาธิวิทยาที่แตกต่างแต่ก็มีลักษณะร่วมหลายประการ ได้แก่ ภาวะตัวเหลืองแบบ conjugated hyperbilirubinemia ที่ปรากฏอาการในวัยทารกและจะเป็นมากขึ้นเรื่อย ๆ กระทั่งมีภาวะตับแข็งในที่สุด โรค PFIC แต่ละชนิดมีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่คาบเกี่ยวกันเอง กล่าวคือ bile duct proliferation, giant cell hepatitis และ periportal fibrosis ลักษณะดังกล่าวบางประการคล้ายคลึงกับพยาธิสภาพในตับของโรค biliary atresia ด้วยเหตุที่ทั้งลักษณะทางคลินิกและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของตับใน PFIC ทั้งสามชนิดไม่สามารถแยกจากกันได้ ทั้งไม่สามารถแยกจากโรค cholestasis อื่นได้อย่างเด็ดขาด การวินิจฉัยจะต้องลงเอยด้วยการทำ genetic study เสมอ การวินิจฉัยที่ถูกต้องจะช่วยในการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยได้

การศึกษานี้เป็นโครงการศึกษานำร่องเพื่อเตรียมเทคนิคทางพันธุกรรมในการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน FIC1, BSEP และ MDR3 ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการบริการตรวจวินิจฉัยโรค PFIC ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

วัตถุประสงค์

พัฒนาวิธีการศึกษา genotype ของยีน FIC1(ATP8B1), BSEP(ABCB11) และ MDR3 (ABCB4) ภายใต้ research facility ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อเป็นการศึกษานำร่องสำหรับการบริการวินิจฉัยโรค PFIC ในทารกดีซ่านแบบ cholestasis และการวินิจฉัยที่เกี่ยวข้องกับโรค PFIC ต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. โรคและภาวะที่เกี่ยวข้อง

ภาวะ progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC)

ความก้าวหน้าทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลในระยะที่ผ่านมามีส่วนสำคัญในการวินิจฉัยแยกกลุ่มอาการที่เรียกว่า progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) การศึกษาการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวเนื่องกับ PFIC (FIC1, BSEP และ MDR3) ได้รับการรายงานประปราย ทั้งในผู้ป่วย cholestasis ที่มีประวัติครอบครัวชัดเจน และ sporadic cases ซึ่งไม่สามารถให้วินิจฉัยสาเหตุอื่น (Bull LN 1997, Deleuze 1996) FIC1 และ BSEP สัมพันธ์กับโรค PFIC ชนิดที่ 1 และ 2 ซึ่งมีลักษณะทางคลินิกเหมือนกัน ตลอดจนมีระดับของ serum GGT ปกติหรือต่ำกว่าปกติเช่นเดียวกัน ยีนทั้งสองเกี่ยวข้องกับการขนส่ง เกลือน้ำดีผ่าน apical membranes ของเซลล์ตับไปยังท่อน้ำดีฝอย (bile canaliculi) การกลายพันธุ์ก่อให้เกิดการคั่งน้ำดีในเซลล์ตับ ในขณะที่ MDR3 มีหน้าที่ในการขนส่ง phosphatidyl choline ที่ basolateral membranes การกลายพันธุ์ของ MDR3 ก่อให้เกิดภาวะคั่งน้ำดี periportal fibrosis และ bile duct proliferation (ในบททบทวน Jansen 2003, deVree 1998, Suchy JF 2006) Chen และคณะ (Chen 2002) ศึกษาการกลายพันธุ์ของ FIC1 และ BSEP ในผู้ป่วยเด็กชาวไต้หวันซึ่งมีภาวะ infantile onset chronic intrahepatic cholestasis 7 ราย โดยกำหนดเกณฑ์นำเข้าศึกษา (inclusion criteria) คือ เริ่มเหลืองก่อนอายุขวบปี มีระดับ serum Gamma glutamyl transpeptidase (GGT) ไม่สูง และไม่พบสาเหตุอื่นที่สามารถอธิบายภาวะเหลือง การศึกษาดังกล่าวนี้พบการกลายพันธุ์ของ FIC1 หรือ BSEP มากถึง 6 ใน 7 ราย การศึกษาเดียวกันยังแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง genotype และ phenotype กล่าวคือ การกลายพันธุ์ของ BSEP มีแนวโน้มที่จะมีความสัมพันธ์กับการพบ multifocal multigiant cell formation ในลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา แม้การศึกษานี้ไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ในเชิงสถิติเนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีจำนวนไม่มากพอ แต่ก็เป็นข้อมูลสำคัญที่แสดงถึงความเกี่ยวข้องของยีนทั้งสองในฐานะสมุฏฐานของภาวะ cholestasis ในทารก นอกจากนี้ การศึกษานี้ยังอาจยึดเป็นแม่แบบในทางเทคนิคการศึกษา genotype ของยีน FIC1 และ BSEP โดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากตับ และศึกษาในระดับ cDNA

โรค biliary atresia

Biliary atresia เป็นภาวะอักเสบ อุดกั้นของทางเดินน้ำดีบริเวณขั้วตับและนอกตับซึ่งไม่ทราบเหตุ (บททบทวนวิชาการของ Kobayashi และ Stringer 2003, Bezerra 2005) แม้ไม่มีหลักฐานของการถ่ายทอดทางพันธุกรรมโดยตรง แต่ก็มีรายงานของโรคในคู่แฝด (Cunningham และ Sybert 1988) ทั้งพบรูปแบบของความพิการร่วมบางประการในผู้ป่วย biliary atresia เช่น polysplenia และ pre-duodenal portal vein นอกจากนี้

ผู้ป่วยส่วนหนึ่งที่มีพยาธิสภาพของทางเดินน้ำดีคล้ายคลึงกับ biliary atresia มีกลุ่มอาการร่วมจำเพาะ เช่น Alagille's syndrome ซึ่งสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน JAG-1 Jacquemin และคณะ (Jacquemin 2002) รายงานการกลายพันธุ์ของยีน CFC1 ในพี่น้องสองคนซึ่งมี biliary atresia ร่วมกับภาวะ laterality defects ในโครงการศึกษานี้ จะใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัย biliary atresia ซึ่งวินิจฉัยโดยการตรวจท่อน้ำดี (exploratory laparotomy) ร่วมกับลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของตับในการทดสอบเทคนิกการตรวจวินิจฉัยทางพันธุศาสตร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ PFIC ทั้งสาม (FIC1, BSEP และ MDR3) การใช้เนื่อเยื่อตับของผู้ป่วย biliary atresia จะเป็น negative control ที่ดีเพราะที่ผ่านมา ยังไม่มีรายงานกล่าวถึงความผิดปกติของ PFIC genes ในผู้ป่วยเหล่านี้

2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

FIC1 (ATP8B1) (ATPase class I type 8B member 1) [ENST00000283684]

FIC1 เป็นยีนขนาด 3.9 กิโลเบส บนโครโมโซม 18q21 ประกอบด้วย 27 exons ซึ่ง encode protein ขนาดกรดอมิโน 1,254 ตัว ความผิดปกติของ FIC1 สัมพันธ์กับภาวะ PFIC type 1 (MIM:211600)

BSEP (ABCB11) (Bile salt export pump (ATP-binding cassette sub-family B member 11) [ENSG00000073734]

BSEP เป็นยีนขนาด 4.8 กิโลเบส บนโครโมโซม 2q24 ประกอบด้วย 29 exons ซึ่ง encode protein ขนาดกรดอมิโน 1,324 ตัว ความผิดปกติของ BSEP สัมพันธ์กับภาวะ PFIC type 2 (MIM: 601847)

MDR3 (ABCB4) (ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member [ENST00000265723]

MDR3 เป็นยีนขนาด 4 กิโลเบส บนโครโมโซม 7q21เป็นสมาชิกของ ABC transporter family ประกอบด้วย 23 exons ซึ่ง encode protein ขนาดกรดอมิโน 1,286 ตัว ความผิดปกติของ MDR3 สัมพันธ์กับภาวะ PFIC type 3 (MIM: 602347) อาการเหลืองในหญิงตั้งครรภ์ (intrahepatic cholestasis of pregnancy, MIM: 147480) และนิ่วน้ำดี (cholelithiasis)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อพัฒนาเทคนิกในการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน FIC1 BSEP และ MDR3
2. สามารถนำเทคนิกวิธีที่ได้ไปใช้เพื่อการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนกลุ่มดังกล่าว ในภาวะดีซ่านแบบ cholestasis ในทารกไทย
3. พัฒนาวิธีการวินิจฉัยทางอณูพันธุศาสตร์ ซึ่งมีศักยภาพที่จะเป็นประโยชน์ต่อการวินิจฉัยโรคกลุ่ม progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) ให้กับโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ซึ่งเป็นศูนย์ส่งต่อผู้ป่วยในระดับตติยภูมิของภาคใต้ตอนล่าง
4. การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนเหล่านี้ ในประเทศไทยยังไม่มีผู้รายงานมาก่อน จึงเป็นโอกาสที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์จะบุกเบิกการศึกษาวิจัยและการบริการในเรื่องนี้ หากประสบความสำเร็จจะมีโอกาสที่จะรับวิเคราะห์ตัวอย่างจากสถาบันอื่น

วิธีการทดลอง

ก. ตัวอย่างและการถนอมตัวอย่าง

ตัวอย่างควบคุม

ใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อตับหรือท่อน้ำดีของทารกซึ่งได้รับการวินิจฉัยทางคลินิก extrahepatic biliary atresis จำนวน 5 รายซึ่งได้รับการเก็บถนอมอุณหภูมิต่ำ (deep freezing) ในธนาคารเนื้อเยื่อของหน่วยกุมารศัลยศาสตร์ เนื้อเยื่อดังกล่าวจะได้รับการนำมาใช้โดย code จากชื่อโรคและไม่มีการระบุชื่อผู้ป่วย เพื่อให้ได้รายป่วยซึ่งการวินิจฉัยชัดเจนว่าเป็น biliary atresia จะเลือกเฉพาะรายซึ่งได้รับการผ่าตัดก่อนอายุ 60 วัน การผ่าตัดส่งผลให้มีการลดลงของภาวะดีซ่าน และผลการตรวจทางพยาธิวิทยาเข้าได้กับ biliary atresia

ตัวอย่างทดลอง

ประมาณการตัวอย่างกลุ่มทดลองไว้ 10 ตัวอย่างโดยจะใช้ เนื้อเยื่อที่ได้จากการเจาะตรวจตับซึ่งเก็บไว้ใน liquid nitrogen ของภาควิชากุมารเวชศาสตร์ การศึกษาส่วนนี้จะทำภายหลังจากที่สามารถ optimize สภาวะศึกษาโดยใช้ตัวอย่างควบคุมจนได้ผลแล้ว และแบ่งศึกษาครั้งละ 5 ตัวอย่าง
เกณฑ์นำเข้า ของตัวอย่างเหล่านี้คือ เป็นตัวอย่างซึ่งได้จากผู้ป่วยซึ่ง;
1. มี onset ของ chronic liver disease เกิดขึ้นก่อนอายุ 12 เดือน
2. ตรวจไม่พบเหตุอื่นซึ่งสามารถอธิบายสาเหตุของภาวะ cholestatic jaundice อาทิเช่น viral hepatitis B และ C, การติดเชื้อในครรภ์, การได้รับอาหารทางหลอดเลือดดำ, inborn errors of metabolism, ภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด
3. มารับการตรวจติดตามการรักษาเป็นเวลานานพอที่จะได้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของโรค

ข. การสกัด RNA และการสร้าง cDNA

การสกัด RNA และการสร้าง cDNA ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป ตรวจสอบปริมาณ RNA โดยใช้ spectrophotometer และตรวจสอบคุณภาพโดยการทำ RT-PCR ของ house keeping gene ในที่นี้ใช้ GAPDH (ใช้ primer ร่วมกับโครงการวิจัยอื่นของกลุ่มวิจัยเดียวกัน)

ค. การทำตรวจหาการกลายพันธุ์โดยวิธี RT-PCR เพื่อสร้าง cDNA และทำ direct sequencing

การขยายสารพันธุกรรมแบบ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ cDNA เป็น template ใช้ชุดปฏิกิริยาซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, MgCl2 6 mM, primers 2 pM (each), dNTP 0.2 mM, และ Taq polymerase (heat activated) 0.25 U/50ul การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในปฏิกิริยา preheat ด้วย 50 oC x 2 นาที 95 oC x 10 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาของ (95 oC x 15วินาที, 60-63 oC [เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิคลี่สาย] x 1นาที) 40 รอบ, 72 oC x 15 นาที ไพรเมอร์ที่เกี่ยวข้องได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

การแสดงแถบของ PCR product กระทำบน 1% agarose gel แล้วอาบด้วย etidium bromide จากนั้นแสดงผลและบันทึกผลภายใต้รังสีเหนือม่วง (ultraviolet light)

ง. การหาลำดับเบสโดยวิธีทางตรง (direct sequencing)

การวิเคราะห์ลำดับเบสกระทำโดยทำบริสุทธิ์ PCR product และส่งให้ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พร้อมไพรเมอร์ ซึ่งจะวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง ABI Prism 377 และวิเคราะห์แถบโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

จ. การตรวจการกลายพันธุ์จาก genomic DNA ในรายซึ่ง RT-PCR ไม่ได้ผล

การกลายพันธุ์ประเภท large deletion อาจทำให้การทำ RT-PCR ไม่ได้ผล ในกรณีซึ่งพิสูจน์ได้ว่าความล้มเหลวของ RT-PCR มิได้เกิดจากคุณภาพของ RNA และสงสัยกรณีกลายพันธุ์ดังกล่าว จะได้ออกแบบ primer บน genomic DNA เพื่อพิสูจน์กรณีดังกล่าว

ฉ.การตรวจยืนยันการกลายพันธุ์และการตรวจหาที่มาของการกลายพันธุ์เพิ่มเติมจากบิดาและมารดาตามสายเลือด

sequence variation ที่ตรวจพบจากการตรวจกรองการกลายพันธุ์ในระดับ cDNA จะได้รับการตรวจยืนยันในระดับ genomic DNA และตรวจเพิ่มเติมเพื่อยืนยันภาวะ germline mutation จาก blood DNA ภายใต้ความสมัครใจของผู้ป่วย (informed consent) จากนั้นจะขอตรวจเพื่อสืบที่มาของการกลายพันธุ์จากบิดา มารดา ภายใต้ความสมัครใจ

ผลการศึกษา

ตัวอย่างทางคลินิก

ได้เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยโรค biliary atresia ซึ่งได้รับการยืนยันการวินิจฉัยจากลักษณะทางคลินิกและการตรวจทางพยาธิวิทยาจำนวน 5 ราย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างทางคลินิกซึ่งได้รับจากผู้ป่วยซึ่งมีความผิดรูปของท่อน้ำดีแต่กำเนิดโรคท่อน้ำดีตีบหรือท่อน้ำดีโป่ง และการติดตามการดำเนินโรคในระยะหลังผ่าตัด

รายที่	เพศ	อายุขณะผ่าตัด	ลักษณะทางพยาธิวิทยา	การดำเนินโรคระยะหลังผ่าตัด
B39	หญิง	2 เดือน	Biliary atresia with biliary cirrhosis	Jaundice free
B41	หญิง	2 เดือน	Choledochal cyst	Jaundice free
B43	หญิง	1 เดือน	Biliary atresia	Dear, 2 months post-op
B44	หญิง	3 เดือน	Choledochal cyst with biliary cirrhosis	Jaundice free
B45	หญิง	2 เดือน	Biliary atresia with biliary cirrhosis	Mild jaundice

การสกัดสารพันธุกรรม

ได้พยายามสกัด ribonucleic acid (RNA) จากตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้ง 5 ตัวอย่าง ผลการสกัดได้ RNA ในความเข้มข้นตั้งแต่ 15-25 ng/ul อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากทำ reverse transcription เพื่อเปลี่ยน RNA เป็น cDNA และ ขยายสารพันธุกรรม ไม่สามารถ optimize ปฏิกิริยาซึ่งให้ PCR product ซึ่งมีความบริสุทธิ์ พอสำหรับการทำ sequencing ในบางปฏิกิริยาไม่สามารถขยายสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR ได้ จึงเปลี่ยนแผนงานวิจัยเพื่อตรวจการกลายพันธุ์จาก deoxyribonucleic acid แทน โดยออกแบบ primers ใหม่ดังแสดงในตารางที่ 2

จากไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบ สามารถ ขยายส่วนของสารพันธุกรรมของจีน BSEP ได้ดังตัวอย่างซึ่งแสดงในภาพที่ 1 และ 2

ภาพที่ 1-2 แสดงตัวอย่าง electropherogram ที่ได้จากการทำ PCR-direct sequencing ของจีน BSEP exon 4-5 โดยใช้ DNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อเป็นแม่แบบ

วิจารณ์ผล

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเพื่อ optimize วิธีตรวจการกลายพันธุ์ของจีนอันอาจสัมพันธุ์กับกลุ่มอาการ progressive familial intrahepatic cholestasis จำนวน 3 จีน การศึกษาพบว่าการตรวจการกลายพันธุ์โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบเพื่อเปลี่ยนให้เป็น cDNA ก่อนแล้วจึงขยายส่วนของสารพันธุกรรมมีข้อจำกัดในทางเทคนิค จึงได้เปลี่ยนวิธีการศึกษามาเป็นวิธีการศึกษาโดยใช้ DNA เป็นแม่แบบแทน

เมื่อใช้ DNA เป็นแม่แบบและใช้ PCR-direct sequencing เป็นวิธีการวินิจฉัย การขยายส่วนของสารพันธุกรรมกระทำได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตามยังมีบางส่วนของ open reading frame ของจีนซึ่งไม่สามารถขยายส่วนของสารพันธุกรรมได้ การศึกษาทั้งหมดในครั้งนี้จึงครอบคลุมประมาณร้อยละ 75 ของ coding sequence และการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการตำแหน่งที่มีการผิดแผกของลำดับสารพันธุกรรมเมื่อเทียบกับต้นแบบลำดับสารพันธุกรรมของ NCBI

6. การศึกษาเพิ่มเติมตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

ในปี พ.ศ. 2557 ผู้ทรงคุณวุฒิได้ชี้ให้เห็นถึงข้อจำกัดของการใช้วิธี PCR-direct sequencing และแนะนำให้เปลี่ยนวิธีการศึกษาเป็นการใช้ Next Generation Sequencing (NGS) คณะผู้วิจัยจึงได้พยายามหาทุนวิจัยเพื่อศึกษาเพิ่มเติมโดยเทคนิคดังกล่าว โดยได้ส่งตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วย biliary atresia จำนวน 20 รายเพื่อศึกษาโดยวิธี Whole Exome Sequencing (Illumina) และได้วิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบข้อมูลทางพันธุกรรมของประชากรอ้างอิง (ข้อมูลทางพันธุกรรมของชาวเอชียตะวันออก ในฐานข้อมูลสาธารณะ Genome 1000) และใช้เกณฑ์ Variants ที่มีความถี่อัลลีลด้อยน้อยกว่า 0.01 และมีการซ้ำของจีนในละแวกเดียวกันในจำนวนตัวอย่างสูงสุด ผลการศึกษาวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) เป็นดังตารางด้านล่าง

ตารางแสดงผลการศึกษาหา candidate variants ด้วยวิธี Whole Exome Sequencing

Position	Variant code	No. of cases with variant
Chromosome 1		
1:117142869	rs78806598	18
1:169510139	rs13306334	14

	1:206665052	rs12059562	13
	1:232539219	rs2275303	12
	1:228452032	rs55706639	10
	1:9188876	rs61785839	10
Chromosome 2			
		rs3827760	14
		rs1112542	13
		rs3905317	13
		rs2302054	11
Chromosome 3			
		rs2269432	13
		rs2071203	12
		rs3774787	12
		rs4688725	12
		rs9836111	12
		rs140693;rs386530826	10
		rs35455589	10
Chromosome 5			
		rs2278329	11
		rs41469;rs386591382	11
Chromosome 6			
		rs114101076;rs2308912	14
		rs115020570	14
		rs61758102	10
Chromosome 7			
		rs56727079	12
		rs77213198	12
		rs1916830	11
Chromosome 8			
		rs75155858	12
Chromosome 9			
		rs72619327	14
		rs2297002	11
Chromosome 10			
		rs77038916	12

	rs3810948	11
Chromosome 11		
	rs112886536	18
	rs113964902	15
	rs3753058	14
	rs201440145	12
	rs72643380	11
Chromosome 12		
	rs12231744	11
Chromosome 14		
	rs78204285	13
Chromosome 15		
	rs1426654	17
	rs936212	10
Chromosome 16		
	rs116954456	11
	rs117555004	11
	rs3995818	11
	rs113527563	10
Chromosome 19		
	rs1047781	14
	rs2191432	12
	rs2074888	11
	rs45438992	10
	rs56958500;rs385750	10
	rs78089801;rs428549	10
	rs11673178	10
Chromosome 20		
	rs2296129	10
Chromosome 22		
	rs2240424	10
Chromosome 23		
	rs61745026	10
	rs61745030	10

7. Research output

ได้รวบรวมข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยและเสนอในงานประชุมวิชาการทางกุมารศัลยศาสตร์ 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Pediatric Surgery, จัดเมื่อวันที่ 8 พฤษภาคม 2551 ที่ประเทศญี่ปุ่น ในหัวข้อ Cystic dilatation of bile duct in infants: an entity closer to biliary atresia than choledochal cyst in older children

การศึกษาเพิ่มเติมโดยวิธี NGS ในต้นปี 2560 ทำให้ได้ผลเพิ่มเติมซึ่งเมื่อสามารถ validate น่าจะปิดโครงการและตีพิมพ์ได้ภายในเดือนตุลาคม 2560

Program of the 45th Annual Meeting of Japanese Society of Pediatric Surgeons

First Day（May 28, Wednesday）

Room 1

11：20～12：00

International Session III

Chairpersons: Osamu Segawa（Tokyo Women's Medical University）
Hisayoshi Kawahara（Osaka Medical Center for Maternal and Child Health）

IS-009 Development of haptic forceps and haptic database of vital organ
Department of Pediatric Surgery, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan
Yasuhide Morikawa

IS-010 A preliminary study assessing the clinical potential of engineered trachea in augmenting a stenotic tracheal segment
The Department of Pediatric Surgery, University of Tokyo, Tokyo, Japan Makoto Komura

IS-011 B cell tolerance to blood group antigens following ABO-incompatible liver transplantation- infant vs adult
Keio University School of Medicine Yohei Yamada

IS-012 Cystic dilatation of bile duct in infants: an entity closer to biliary atresia than choledochal cyst in older children
Pediatric Surgery Unit, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand Surasak Sangkhathat

เอกสารอ้างอิง

1. Jansen PLM, Sturm E. Genetic cholestasis, causes and consequences for hepatobiliary transport. Liver Int 2003;23:315-322
2. deVree JML, Jacquemin E, Sturm E, et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:282-287
3. Chen H, Chang P, Hsu H, et al. Fic1 and BSEP defects in Taiwanese patients with chronic intrahepatic cholestasis with low gamma-glutamyl transpeptidase levels. J Pediatr 2002;140:119-124
4. Deleuze J, Jacquemin E, Dubuisson C, et al. Defects of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. Hepatology 1996;23:904-908
5. Bull LN, Carlton VEH, Stricker NL, et al. Genetic and morphological findings in progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease [PFIC-1] and Byler syndrome): Evidence for heterogeneity. Hepatology 1997;26:155-164
6. Kobayashi H, Stringer MD. Biliary atresia. Semin Neonatol 2003;8:383-391
7. Bezerra JA. Potential etiologies of biliary atresia. Pediatr Transplant 2005;9:646-651
8. Cunningham ML, Sybert VP. Idiopathic extrahepatic biliary atresia: recurrence in sibs in two families. Am J Med Genet 1988;31:421-426
9. Suchy FJ, Ananthanarayanan M. Bile salt excretory pump: Biology and pathology. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2006;43:S10-S16

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

เนื่องจากการศึกษาเบื้องต้นไม่พบการกลายพันธุ์ในส่วนของจีนที่ศึกษา (FIC1 BSEP และ MDR3) จึงหยุดการศึกษาเพียง 5 ราย ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะทำวิจัยเรื่องนี้ต่อไปโดยใช้เทคนิค Next Generation Sequencing เพื่อขยายส่วน coverage ของการศึกษาให้กว้างขึ้น

คณะผู้วิจัยได้หาทุนเพิ่มและใช้ทุนวิจัยส่วนตัวส่วนหนึ่งเพื่อทำงานเพิ่มในส่วน Next Generation Sequencing แล้ว

ภาคผนวก ประกอบด้วย

1.1 สำเนาบทความที่ตีพิมพ์แล้ว (reprint)

1.2 นิพนธ์ต้นฉบับที่พร้อมส่งตีพิมพ์ (manuscript) กรณีที่นักวิจัยเกรงว่าจะถูกลอกเลียนแบบผลงานขอให้จัดส่งเป็นนิพนธ์ต้นฉบับที่ได้ส่งตีพิมพ์แล้ว

1.3 บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ (proceeding)

1.4 ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะในส่วนที่ไม่สามารถดำเนินการวิจัยได้ตามวัตถุประสงค์

ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการกลายพันธุ์ในโรคนี้จากกลุ่มวิจัยอื่นและเนื่องจากเป็นโรคที่พบได้น้อย คณะผู้วิจัยจึงยังเห็นโอกาสในการศึกษา และกำลังเปลี่ยนเทคนิคการศึกษาเป็นการใช้ Next Generation Sequencing เพื่อศึกษาผู้ป่วยกลุ่มเดียวกัน

การศึกษา NGS ได้มีโอกาสทำในช่วงปลายปี พ.ศ. 2559 – ต้นปี พ.ศ. 2560 คาดว่าจะสามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยจากผลการศึกษาในส่วนนี้ได้ภายในเดือนตุลาคม 2560

NRU-PSU-Report/KPI

ตารางตัวชี้วัดศักยภาพและผลลัพธ์ของโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัยการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับโรค progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) ในทารกที่เป็นดีซ่านแบบ cholestasis

ตัวชี้วัด	แผนและผลลัพธ์							
	2010		2011		2012		รวม	
	แผน	ผล	แผน	ผล	แผน	ผล	แผน	ผล

1)จำนวนบทความวิจัยในฐาน Scopus								
2)บทความที่เป็นผู้วิจัยหลัก								
3)Impact factorรวมต่อจำนวนบทความใน1								
4)ทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก								
5)ทุนจากภาคอุตสาหกรรม								
6)สิทธิบัตรในประเทศ								
7)สิทธิบัตรต่างประเทศ								
8)จำนวนอาจารย์ที่ทำวิจัยในกลุ่ม	3	3	3	3				
9)จำนวนนิสิต/นักศึกษาระดับปริญญาโท								
10)จำนวนนิสิต/นักศึกษาระดับปริญญาเอก								
11)จำนวนนักวิจัยหลังปริญญาเอก								
12)ผลิตภัณฑ์								
13)ผลงานเชิงประจักษ์								
14)dารนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ	1	1	-	-				

หมายเหตุ

1. ทุกโครงการจะต้องมีตัวชี้วัดอย่างน้อย 2 ตัวชี้วัดคือ
    1.2 ตัวชี้วัดที่ 1 จำนวนบทความวิจัยในฐาน Scopus หรือ
    1.3 ตัวชี้วัดที่ 6 สิทธิบัตรในประเทศอย่างน้อย 1 ชิ้น
2. ตัวชี้วัดที่ 9 จำนวนนิสิต/นักศึกษาระดับปริญญาโทหรือตัวชี้วัดที่ 10 จำนวนนิสิต/นักศึกษาระดับปริญญาเอก (โครงการที่มีงบประมาณ 1 ล้านบาทขึ้นไปจะต้องมีนักศึกษาปริญญาเอกอย่างน้อย 1 คนหรือชดเชยโดยนักศึกษาปริญญาโทในอัตราปริญญาเอก:ปริญญาโท = 1:2)
3. ให้แสดงเฉพาะผลงานตัวชี้วัดที่ตรงกับผลผลิตและผลงานของโครงการวิจัยนี้เท่านั้น
4. สามารถเพิ่มเติมตัวชี้วัดอื่นที่แสดงถึงศักยภาพของการสร้างผลผลิตเป้าหมายอีกกี่ตัวก็ได้