



โพลิมอร์ฟิสมของยีน *UGT1A1* ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเด็กที่มีและไม่มีนิวในถุงน้ำดี ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์

อนันต์ กลางประพันธ์¹, อัฐวุฒิ ไชยบุญเรือง^{2*}, อรุณี เจตศรีสุภาพ³, กุลนภา พู่เจริญ², สุพรรณ พู่เจริญ²

Received: May 7, 2019

Revised: June 22, 2019

Accepted: July 21, 2019

บทคัดย่อ

ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยมีการรายงานความชุกของโรคนี้ในถุงน้ำดีสูงถึงร้อยละ 20 ซึ่งมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น อายุ เพศ ความบกพร่องของเอนไซม์บางชนิด รวมถึงผู้ป่วยที่มีการทำลายของเม็ดเลือดแดงสูงผิดปกติ เช่น ธาลัสซีเมีย ส่งผลให้ปริมาณบิลิรูบินในกระแสเลือดสูงขึ้น ทำให้มีโอกาสตกตะกอนเป็นก้อนนิ่ว และหากพบร่วมกับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* จะทำให้มีความเสี่ยงสูงขึ้นได้ การศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจหา *UGT1A1* polymorphisms ชนิด G71R ด้วยเทคนิค allele specific PCR และชนิด TATA box [A(TA)_nTAA] ด้วยเทคนิค direct DNA sequencing และ high resolution melting analysis (HRM) ศึกษาในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเด็กที่มีและไม่มีนิวในถุงน้ำดี ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผลการศึกษาพบว่า จากตัวอย่างทั้งหมด 113 ราย อายุเฉลี่ย 14.7 ± 5.1 ปี เป็นเพศชาย 48 ราย (ร้อยละ 42.5) เพศหญิง 65 ราย (ร้อยละ 57.5) มีผู้ป่วยที่มีนิวในถุงน้ำดี 21 ราย (ร้อยละ 18.6) ตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G71R จำนวน 7 ราย (ร้อยละ 6.2) ส่วนการกลายพันธุ์ที่โปรโมเตอร์แบบ (TA)₆/(TA)₇ นั้น จากการตรวจในตัวอย่างจำนวน 36 ราย ตรวจพบ 4 ราย (ร้อยละ 11.1) โดยการกลายพันธุ์ดังกล่าวพบในผู้ป่วยที่มีและไม่มีนิวในถุงน้ำดี 2 ราย และ 8 ราย ตามลำดับ และพบว่าผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E ตรวจพบนิวในถุงน้ำดีมากกว่ากลุ่มอื่น ได้แก่ Hb H disease Hb H-CS disease EABart's disease และ CS EABart's disease และผลการตรวจ heterozygosity พบว่าผู้ป่วยทุกรายที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G71R เป็นแบบ heterozygote ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการตรวจพบ G71R และ (TA)₆/(TA)₇ ของยีน *UGT1A1* อาจไม่มีส่วนสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดนิ่วในถุงน้ำดีของผู้ป่วยเด็ก อาจเป็นเพราะกลุ่มตัวอย่างมีอายุน้อยและการเกิดนิ่วนั้นต้องอาศัยเวลาในการก่อตัวของนิ่ว การตรวจกรองหาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ในกลุ่มผู้ป่วยนี้จึงอาจไม่มีความจำเป็น

คำสำคัญ: นิวในถุงน้ำดี, *UGT1A1*, โพลิมอร์ฟิสม, ธาลัสซีเมีย

¹นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

³ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

*ผู้รับผิดชอบบทความ



Polymorphisms in *UGT1A1* gene in thalassemic children with or without gallstone at Srinagarind Hospital

Anun Klangprapun¹, Attawut Chaibunruang^{2*}, Arunee Jetsrisuparb³,
Goonnapa Fucharoen², Supan Fucharoen²

Abstract

The prevalence of gallstone in Northeast Thailand has been reported to be 20.0%. There are many factors involved in gallstone formation including sex, age, enzyme deficiency and increased hemolysis condition such as thalassemia which resulted in hyperbilirubinemia. Mutations in the *UGT1A1* gene would lead to a high risk of gallstone formation. This study aimed to investigate two *UGT1A1* polymorphisms; the (G71R) using allele specific PCR and the TATA box [A(TA)_nTAA] at promoter using direct DNA sequencing and high-resolution melting analysis (HRM) in thalassemic children with and without gallstone at Srinagarind Hospital, Khon Kaen University. Study was done on 113 patients with average age of 14.7 ± 5.1 year including 48 males (42.5%) and 65 females (57.5%). Gallstone was found in 21 patients (18.6%). The G71R polymorphism was detected in 7 subjects (6.2%). For the polymorphism in promoter, the (TA)₆/(TA)₇ were detected in 4 of the 36 patients examined (11.1%). These polymorphisms were observed in patients with (n=2) and without (n=8) gallstone. It was found that gallstone was mostly found in β -thalassemia/Hb E patients followed by patients with Hb H disease, Hb H-CS disease, EABart's disease and CS EABart's diseases. All the 7 patients with G71R polymorphism are heterozygotes. This result indicates likely that both G71R and (TA)₆/(TA)₇ polymorphisms of *UGT1A1* gene may not be related to gallstone formation in northeast Thai patients. This may be due to the young age of the patients since gallstone formation takes time. Nonetheless, our result indicates that screening for *UGT1A1* polymorphisms in the patients may not be necessary.

Key words: Gallstone, *UGT1A1*, Polymorphism, Thalassemia

¹Medical Science Program, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

³Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

*Corresponding author: (e-mail: attach@kku.ac.th)

บทนำ

โรคนิวในถุงน้ำดี (gallstone) เป็นโรคที่พบบ่อยทั่วโลกและเป็นปัญหาสุขภาพสำคัญในประเทศที่พัฒนาแล้วหลายประเทศ จากการศึกษาความชุกของโรคนิวในถุงน้ำดีในกลุ่มประชากรประเทศอเมริกาและประเทศแถบยุโรปในปี พ.ศ. 2533-2543 พบความชุกร้อยละ 13.3-28.5 และ 5.9-21.9⁽¹⁾ ตามลำดับ มีรายงานในกลุ่มประชากรภาคตะวันออกเฉียงเหนือในประเทศไทยพบความชุกร้อยละ 20⁽²⁾ ปัจจัยที่ทำให้เกิดนิ่วในถุงน้ำดีมีหลายปัจจัยประกอบด้วย เชื้อชาติ ประวัติครอบครัวและพันธุกรรม อายุ เพศ ความอ้วน และภาวะอื่นๆ ของร่างกาย⁽³⁾ และในผู้ป่วยที่มีภาวะการทำลายของเม็ดเลือดแดงสูงผิดปกติ เช่น โรคธาลัสซีเมีย ซึ่งเม็ดเลือดแดงที่ถูกสร้างขึ้นมีความไม่เสถียร มีรูปร่างผิดปกติ แตกง่าย และถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ทำให้ปริมาณบิลิรูบินในกระแสเลือดสูงขึ้น มีโอกาสเสี่ยงต่อการตกตะกอนเป็น pigment stones ได้⁽⁴⁾ มีการศึกษาที่พบว่า การเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* มีส่วนในการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนิวในถุงน้ำดีในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย⁽⁵⁾ ซึ่งการกลายพันธุ์ในยีน *UGT1A1* จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ uridine diphosphate glucosyltransferase (UDP-glucuronosyl transferase หรือ UGTs) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในเฟส 2 ของกระบวนการ detoxification ที่ตับ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา glucuronidation ให้บิลิรูบินในกระแสเลือด (unconjugated bilirubin) ที่เกิดจากการสลายตัวของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงจับกับ glucuronic acid เพื่อทำให้บิลิรูบินในกระแสเลือดอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ดีขึ้น (conjugated bilirubin หรือ bilirubin diglucuronide) และถูกกำจัดออกมาทางน้ำดี⁽⁶⁾ โดยชนิดของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่รายงานในประเทศไทยได้แก่ การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง TATA box ที่อยู่บริเวณโปรโมเตอร์ [(TA)₇TAA] พบร้อยละ 15 และการเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 211; G>A ของ exon 1 โดยเปลี่ยนจากกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) เป็นอาร์จินีน (arginine) ในตำแหน่งโคดอน 71 (G71R) [211G>A, G71R] พบร้อยละ 10⁽⁷⁾ ดังนั้นในคนที่มีภาวะการทำลายเม็ดเลือดแดงสูงผิดปกติ เช่น thalassemia หรือ G-6-PD

deficiency จะส่งผลให้ปริมาณบิลิรูบินในร่างกายสูงขึ้น ทำให้มีโอกาสดตกตะกอนเป็น pigment stone ได้⁽⁴⁾ และหากพบร่วมกับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* แล้วจะทำให้ความเสี่ยงต่อการเกิดนิ่วในถุงน้ำดีสูงขึ้นได้⁽⁵⁾

ในส่วนข้อมูลของยีน *UGT1A1* นั้น ในไทยมีการรายงานค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะรายงานความชุกและผลของ polymorphism และผลเมื่อเกิดร่วมกับโรคธาลัสซีเมีย ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาอัตราการตรวจพบ polymorphism ชนิด G71R และ TATA box [A(TA)_nTAA] ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเด็กที่มีและไม่มีนิ่วในถุงน้ำดี ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

เป็นตัวอย่างเลือดที่เหลือจากงานบริการประจำวันจากหน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเดือนกรกฎาคม 2558 – กุมภาพันธ์ 2560 (เป็นการศึกษาแบบ cross sectional study) จำนวน 113 ราย ที่มีผลการตรวจยีนธาลัสซีเมียและผลการตรวจอัลตราซาวด์เพื่อวินิจฉัยนิ่วในถุงน้ำดีโดยแพทย์แล้ว และเก็บข้อมูลย้อนหลังของผู้ป่วย ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลพื้นฐาน ได้แก่ อายุ เพศ ข้อมูลทางโลหิตวิทยา ได้แก่ Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC ผลการตรวจ จีโนไทป์ ผลการทำ ultrasonography ของผู้ป่วยแต่ละรายเลือดทุกรายนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Phenol-Chloroform⁽⁸⁾ การตรวจ G71R polymorphism ในยีน *UGT1A1* ทำการตรวจในตัวอย่างทั้ง 113 ราย และตรวจ [A(TA)_nTAA] polymorphism ในตัวอย่างจำนวน 36 ราย ซึ่งเป็นการเลือกตัวอย่างแบบสุ่ม (จากความชุกของการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบมากกว่า) การศึกษาวิจัยครั้งนี้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE 591278)

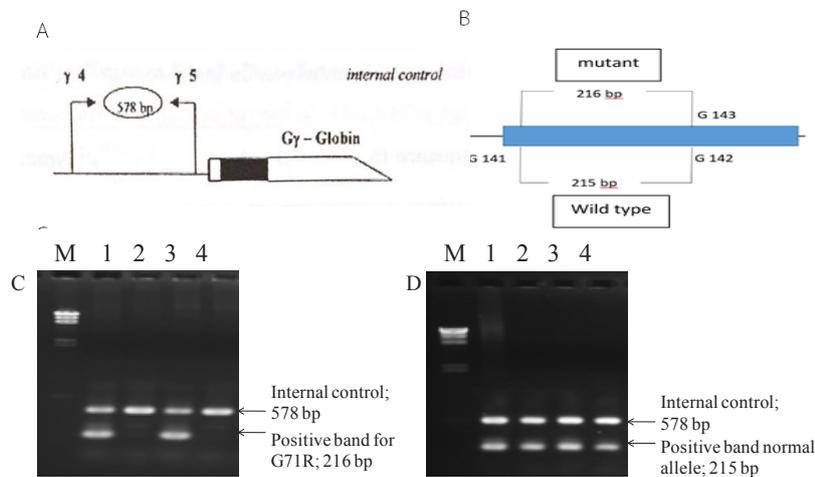
การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

Polymorphism G71R ในยีน *UGT1A1* ตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค allele specific PCR (ASPCR) โดยใช้ primer G141 (5'-TAAGTAGGAGAGGGCGAACC-3') และ G143 (5'-GCTCTTCAAGGTGTAAATGCTCT-3')

(mutant specific primer) ได้ PCR product ขนาด 216 bp โดยมี primer $\gamma 4$ (5'-GGCCTAAAACACAGAGAGT-3') และ $\gamma 5$ (5'-CCAGAAAGCGAGTGTGTGGGA-3') เป็น internal control ขนาด 578 bp ทำ PCR ในปริมาตร 50 μ L ประกอบด้วย ASPCR buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.01% gelatin and 3 mM MgCl₂), 200 mM deoxynucleotide triphosphates, primer G141 ความเข้มข้น 0.3 pmol และ G143 ความเข้มข้น 0.15 pmol, primer $\gamma 4$ และ $\gamma 5$ ความเข้มข้นอย่างละ 0.09 pmol, 1U *Taq* DNA polymerase (New England Biolab, Inc.) และดีเอ็นเอ 100 ng นำส่วนผสมที่ได้ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Biometra T-Personal thermal cycler โดยมีขั้นตอนดังนี้ preheating 94 °C 3 นาที, PCR cycling: 94 °C 1 นาที ตามด้วย 67 °C 1 นาที 30 วินาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบบน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยย้อมด้วย ethidium bromide และดูภายใต้แสง UV หากให้ผลบวก นำมาตรวจหา heterozygosity ของ codon 71 mutation ต่อ ด้วยวิธี ASPCR ดังข้างต้น แต่เปลี่ยน reverse primer

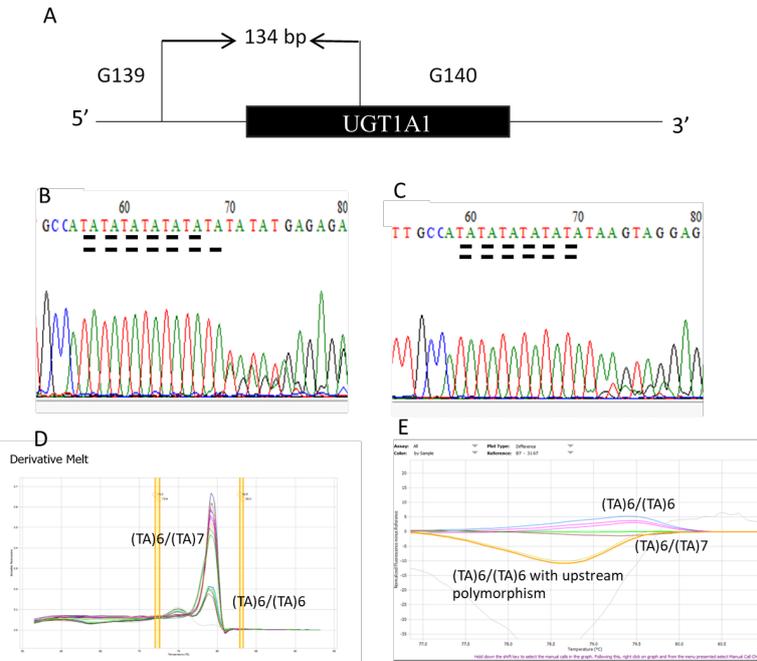
G143 เป็น G142 (5'-CTCTTCAAGGTGTAAAAT-GCTCC-3') ซึ่งจะได้ PCR product ขนาด 215 bp หากให้ผลบวกเป็นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G71R ในบริเวณ exon 1 ของยีน *UGT1A1* แบบ heterozygote และผลลบคือ แบบ homozygote (รูปที่ 1)

Polymorphism ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ที่ TATA box [A(TA)_nTAA] ตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค direct DNA sequencing และ high resolution melting analysis (HRM) โดยใช้ primer G139 (5'-TCCCTGCTACCTTTGTGGAC-3') และ G140 (5'-CTTTGCTCCTGCCAGAGGT-3') ซึ่งจะได้ PCR product ขนาดประมาณ 134 bp โดย PCR reaction ปริมาตร 20 μ L ประกอบด้วย 2x SensiFAST™ Real-Time PCR Kits (Bioline, London UK) ปริมาตร 10 μ L, primer G139 และ G140 ความเข้มข้นอย่างละ 0.3 pmol, และดีเอ็นเอ (50 ng) โดยมีขั้นตอน PCR ดังนี้ preheating 94 °C 3 นาที, PCR cycling condition; 94 °C 30 วินาที, 64 °C 15 วินาที และ 72 °C



รูปที่ 1 การตรวจหา G71R polymorphism ของยีน *UGT1A1*

A: ตำแหน่งและทิศทางของ primer $\gamma 4$ และ $\gamma 5$ (internal control) ซึ่งให้ PCR product ขนาด 578 bp B: ตำแหน่งและทิศทางของ primer G141 & G142 (wild type) และ G141 & G143 (mutant) ให้ PCR product ขนาด 215 และ 216 bp ตามลำดับ C: ผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis ของ G71R polymorphism Lane 1 และ 3 ให้ผลบวกต่อ G71R polymorphism ส่วน Lane 2 และ 4 ให้ผลลบต่อ G71R polymorphism (M คือ the λ /HindIII size marker) D: ผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis ของ wild type allele Lane 1 – 4 ให้ผลบวกต่อ normal allele (เป็น heterozygous G71R) (M คือ the λ /HindIII size marker)



รูปที่ 2 การตรวจหา polymorphism ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ที่ TATA box [A(TA)nTAA] ของยีน *UGT1A1*

A: ตำแหน่งและทิศทางของ primer G139 และ G140 ให้ PCR product ขนาด 134 bp B, C: ผลการทำ DNA sequencing, B; TA(6)/TA(7) และ C; TA(6)/TA(6) D, E: ลักษณะของ HRM ของ [A(TA)nTAA] polymorphism, D; Derivative melt แสดงค่า T_m ของ melting curve ที่ 89 °C, E; Difference melt แสดงลักษณะของ HRM แบบ TA(6)/TA(7), TA(6)/TA(6) และ TA(6)/TA(6) ที่มี upstream polymorphism

15 วินาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นนำ PCR product จะถูก denatured ที่ 95 °C 15 วินาที และ re-annealed ที่ 55 °C 15 วินาที ตามด้วยการ melting จาก 45 °C ถึง 95 °C ด้วย temp rate 0.1 °C/วินาที วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Eco™ software package (Eco™ Real-Time PCR System, Illumina, USA) (รูปที่ 2) โดยการหา polymorphism ในตำแหน่งโปรโมเตอร์นี้ จะสุ่มตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างจำนวน 36 ราย

ผลการศึกษา

จากการศึกษาในผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 113 ราย ที่ได้รับการตรวจอัลตราซาวด์จากแพทย์ มีตัวอย่างจำนวน 21 จาก 113 ราย (ร้อยละ 18.6) ที่ตรวจพบนิวไคลด์ แบ่งเป็นหญิง 16 ราย และชาย 5 ราย อายุเฉลี่ยของผู้ป่วยที่ตรวจพบและตรวจไม่พบนิวไคลด์เท่ากับ 14.1±5.0 ปี (ช่วงอายุ 3-21 ปี) และ 12.1±4.7 ปี (ช่วงอายุ 2-20 ปี) ตามลำดับ ข้อมูลทางโลหิตวิทยาระหว่างผู้ป่วยที่ตรวจพบและตรวจไม่พบนิวไคลด์ไม่มีความ

แตกต่างกันในทุกๆ พารามิเตอร์ ในกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบนิวไคลด์จำนวน 21 ราย มี genotype ของธาลัสซีเมีย ดังนี้ β -thalassemia/ Hb E 15 ราย (ร้อยละ 71.4) Hb H disease 2 ราย (ร้อยละ 9.5) Hb H-CS disease 2 ราย (ร้อยละ 9.5) EABart's disease 1 ราย (ร้อยละ 4.8) และ CSEABart's disease 1 ราย (ร้อยละ 4.8) ดังแสดงใน ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2

การศึกษานี้ตรวจพบ G71R polymorphism ในยีน *UGT1A1* ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 7 จาก 113 ราย (ร้อยละ 6.2) โดยทั้ง 7 รายพบเป็น heterozygote pattern (G/A) โดยในผู้ป่วย 7 รายนี้ ประกอบด้วย β -thalassemia/ Hb E 4 ราย Hb H-CS disease 2 ราย และ CSEABart's disease 1 ราย ดังแสดงใน ตารางที่ 3 สำหรับ [A(TA)nTAA] polymorphism ได้ทำการตรวจในตัวอย่างจำนวน 36 ราย โดยพบ HRM pattern 3 ลักษณะจากการทำ melting curve analysis ดังแสดงใน รูปที่ 2 และเพื่อยืนยันชนิดของ polymorphism ในแต่ละลักษณะ ตัวอย่างจำนวน 15 รายถูกนำไปตรวจ

วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DNA sequencing ซึ่งผลก็ตรงกันกับแต่ละลักษณะ pattern ที่ตรวจพบ ได้แก่ TA(6)/TA(6), TA(6)/TA(6) with other polymorphism upstream TATA box และ TA(6)/TA(7) (ดังแสดงในรูปที่ 2) จากผลการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างจำนวน 36 รายนี้ พบว่ามีผู้ป่วย 4 ราย (ร้อยละ 11.1) ที่พบเป็น TA(6)/TA(7)

(β -thalassemia/Hb E 3 ราย และ Hb H-CS disease 1 ราย) และทุกรายตรวจไม่พบนิวในถุงน้ำดี นอกจากนี้ในตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด มี 7 ตัวอย่างที่พบนิวในถุงน้ำดีแต่ทุกรายตรวจไม่พบ promoter polymorphism [A(TA)_nTAA] นี้

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไป ข้อมูลทางโลหิตวิทยา ชนิดของธาลัสซีเมีย และโพลิมอร์ฟิสมของยีน *UGT1A1* ของตัวอย่างผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 113 ราย แสดงเป็นค่า mean \pm SD หรือ จำนวน (ร้อยละ)

	Total (n=113) (%)
Sex	
Male	48 (42.5)
Female	65 (57.5)
Age (year)	14.7 \pm 5.1
Hematological parameters	
Rbc ($\times 10^{12}$ /uL)	4.86 \pm 1.74
Hb (g/dL)	8.3 \pm 1.3
Hct (%)	28.7 \pm 4.2
MCV (fL)	67.5 \pm 9.0
MCH (pg)	19.8 \pm 3.1
MCHC (g/dL)	29.4 \pm 2.2
RDW (%)	25.8 \pm 5.8
Thalassemia type	
β -thalassemia/Hb E	51 (45.1)
Hb H disease	16 (14.2)
Hb H-CS disease	23 (20.3)
EABart's disease	8 (7.1)
CSEABart's disease	14 (12.4)
CSEFBart's disease	1 (0.9)
<i>UGT1A1</i> polymorphism (codon 71 [G71R]; glycine > arginine)	
Positive (G/A)	7 (6.2)
Negative (G/G)	106 (93.8)
<i>UGT1A1</i> polymorphism (TATA box [(TA)_xTAA]) (n=36)*	
Positive (6/7)	4 (11.1)
Negative (6/6)	32 (88.9)

* ข้อมูล *UGT1A1* polymorphism (TATA box [(TA)_xTAA]) ในตัวอย่างจำนวน 36 ราย

ตารางที่ 2 ข้อมูลโพลิมอร์ฟิสมของยีน *UGT1A1* และชนิดของธาลัสซีเมีย จำแนกตามการตรวจพบนิ่วในถุงน้ำดีของตัวอย่างผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 113 ราย แสดงเป็นค่า mean±SD หรือ จำนวน (ร้อยละ)

	Gallstone		Total n (%)
	Positive (n=21) (18.6%)	Negative (n=92) (81.4%)	
<i>UGT1A1</i> polymorphism (codon 71 [G71R]; glycine > arginine)			
Positive (G/A)	2 (28.6)	5 (71.4)	7 (100)
Negative (G/G)	19 (17.9)	87 (82.1)	106 (100)
<i>UGT1A1</i> polymorphism (TATA box [(TA)xTAA]) (n=36)*			
Positive (6/7)	-	4 (100)	4 (100)
Negative (6/6)	7 (21.9)	25 (78.1)	32 (100)
Thalassemia			
β-thalassemia/Hb E	15 (29.4)	36 (70.6)	51 (100)
Hb H disease	2 (12.5)	14 (87.5)	16 (100)
Hb H-CS disease	2 (8.7)	21 (91.3)	23 (100)
EABart's disease	1 (12.5)	7 (87.5)	8 (100)
CSEABart's disease	1 (7.1)	13 (92.9)	14 (100)
CSEFBart's disease	-	1 (100)	1 (100)

* ข้อมูล *UGT1A1* polymorphism (TATA box [(TA)xTAA]) ในตัวอย่างจำนวน 36 ราย

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

นิ่วในถุงน้ำดีเป็นโรคแทรกซ้อนของหลายๆโรค^(1-5, 7, 9) ในการศึกษาครั้งนี้พบนิ่วในน้ำดีในผู้ป่วยธาลัสซีเมียจำนวน 21 จาก 113 ราย (ร้อยละ 18.6) ซึ่งอัตราการตรวจพบนิ่วในถุงน้ำดีจากการศึกษาครั้งนี้มีสัดส่วนคล้ายกับที่มีรายงานในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเด็กก่อนหน้าที่มีรายงานมาก่อน^(2, 9) แต่น้อยกว่าที่มีรายงานไว้ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ (ร้อยละ 20)⁽⁷⁾ แต่สิ่งที่น่าสนใจคือ แม้ว่าอายุของผู้ป่วยกลุ่มนี้อยู่ในช่วงเด็ก (14.7 ± 5.1 ปี) แต่อัตราการตรวจพบนิ่วในถุงน้ำดียังสูงพอๆ กับผู้ใหญ่ ซึ่งอาจมาจากสาเหตุอื่นๆ ของประชากรในกลุ่มนี้เอง นอกจากนี้ในนิ่วในถุงน้ำดีพบในผู้ป่วย β-thalassemia/Hb E (ร้อยละ 71.4) มากกว่า Hb H disease และ EABart's disease (ร้อยละ 28.6) โดยชนิดของธาลัสซีเมียเองน่าจะเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การสร้างนิ่วในถุงน้ำดีมีมากกว่า เนื่องด้วยความรุนแรง

ของการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วย β-thalassemia/Hb E มีมากกว่าใน Hb H disease และ EABart's disease ส่งผลให้ระดับของบิลิรูบินสูงขึ้น โดยเฉพาะ unconjugated บิลิรูบิน โดยที่ระดับบิลิรูบินที่สูงนี้ (เป็นส่วนประกอบของเกลือน้ำดี (bile salt)) ส่งผลให้เกลือน้ำดีและแคลเซียมไอออนสามารถจับกันได้และสร้างเป็นนิ่วในถุงน้ำดีในอัตราที่สูงขึ้นได้⁽⁵⁾

มีการรายงาน polymorphism ในยีน *UGT1A1* ว่าเกี่ยวข้องกับนิ่วในถุงน้ำดีในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ประกอบด้วยตำแหน่ง promoter [A(TA)nTAA] และ coding region (G71R)^(5-7, 10) จากการศึกษาครั้งนี้พบผู้ป่วยเพียง 7 จาก 113 ราย (ร้อยละ 6.2) ที่มี heterozygous G71R polymorphism (glycine > arginine) และในกลุ่มนี้มีผู้ป่วยเพียง 2 รายเท่านั้นที่เป็นนิ่วในถุงน้ำดี ซึ่งอัตราการตรวจพบ G71R polymorphism นี้ต่ำกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีรายงานไว้ที่ร้อยละ 10⁽⁷⁾

การตรวจวิเคราะห์ [A(TA)nTAA] polymorphisms ใน promoter ของยีน *UGT1A1* พบว่ามีผู้ป่วยเพียง 4 จาก 36 ราย (ร้อยละ 11.1) ที่เป็น TA(6)/TA(7)

ซึ่งอัตราการตรวจพบ [A(TA)nTAA] polymorphism นี้ต่ำกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานไว้ที่ร้อยละ 15 เช่นกัน⁽⁷⁾

ตารางที่ 3 ข้อมูลผู้ป่วยชาตีสี่เมียที่ตรวจพบ "UGT1A1" polymorphisms

No	G71R (G-A)	(TA)n	Sex/age (year)	Gallstone	U/S @age (year)	Thalassemia type	Rbc (x10 ¹² /uL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RDW (%)
1	G/A	6/6	M/19	Positive	15	β -thalassemia/Hb E	4.79	7.8	28.0	58.5	16.3	27.9	35.0
2	G/A	na	M/22	Negative	17	β -thalassemia/Hb E	2.27	5.3	18.5	81.6	23.5	28.8	26.4
3	G/A	na	F/10	Negative	9	β -thalassemia/Hb E	4.11	9.4	28.4	69.1	22.8	33.0	19.4
4	G/A	6/7	F/12	Negative	11	β -thalassemia/Hb E	3.45	8.7	26.3	76.4	25.2	33.0	14.8
5	G/G	6/7	M/10	Negative	5	β -thalassemia/Hb E	2.99	7.7	24.2	80.9	25.8	31.8	16.6
6	G/G	6/7	M/22	Negative	20	β -thalassemia/Hb E	3.64	7.2	24.8	67.9	19.8	29.2	36.9
7	G/A	na	F/18	Negative	17	Hb H-CS	3.51	7.3	26.5	75.3	20.8	27.6	20.8
8	G/A	na	M/12	Negative	11	Hb H-CS	3.56	7.8	27.2	76.4	21.9	28.7	21.8
9	G/G	6/7	M/13	Negative	12	Hb H-CS	3.95	8.3	27.7	70.0	20.9	29.9	31.7
10	G/A	na	M/20	Positive	16	CSEABart's	4.71	8.8	27.5	58.4	18.7	32.0	33.4

- U/S : Ultrasonography

จากผลการศึกษา ไม่พบว่ามีข้อมูลที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่าง polymorphisms ในยีน *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง promoter [A(TA)_nTAA] และ coding region (G71R) กับการเกิดนิ่วในถุงน้ำดี ดังเช่นที่เคยรายงานในการศึกษาที่ผ่านมา^(5-7, 10) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าในตัวอย่างกลุ่มมีนิ่วมีอัตราส่วนการพบ G71R polymorphism 2/21 (ร้อยละ 9.5) ส่วนในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่มีนิ่วมีอัตราส่วนการพบ G71R polymorphism 5/92 (ร้อยละ 5.4) ซึ่งแนวโน้มจะเห็นว่าค่อนข้างแตกต่างกันระหว่าง 2 กลุ่ม (ตารางที่ 2)

ในผู้ป่วยที่มี polymorphism ในยีน *UGT1A1* พบมีเพียง 2 รายเท่านั้นที่มีนิ่วในถุงน้ำดี (วินิจฉัยโดยการทำ ultrasonography) (ดังแสดงในตารางที่ 3) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาข้อมูลผู้ป่วยที่มีทั้ง TA(6)/TA(7) และ (G71R) polymorphisms พบว่าเป็นผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E เด็กหญิงอายุ 12 ปี ได้รับการวินิจฉัยตอนอายุ 7 ปี และยังคงตรวจไม่พบนิ่ว อย่งไรก็ตาม เนื่องจากการเกิดนิ่วต้องอาศัยระยะเวลา การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ cross-sectional ระยะเวลาที่ทำการศึกษาอาจยังไม่มากเพียงพอ ซึ่งอาจจะเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ยังตรวจไม่พบนิ่วในตัวอย่างแม้ว่าจะตรวจพบมี polymorphism ก็ตาม การออกแบบศึกษาแบบ longitudinal น่าจะทำให้พบข้อมูลความสัมพันธ์กันระหว่าง polymorphism และนิ่วในถุงน้ำดีในตัวอย่างได้ดีขึ้น

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าอายุ น่าจะเป็นปัจจัยที่สำคัญในการสร้างนิ่ว⁽³⁾ ในการศึกษาครั้งนี้ก็พบความสัมพันธ์ดังกล่าวเช่นเดียวกัน กล่าวคือ อายุเฉลี่ยในผู้ป่วยที่ตรวจพบนิ่วเท่ากับ 17.5 ± 5.0 ปี ส่วนในกลุ่มที่ไม่พบนิ่วเท่ากับ 14.1 ± 5.0 ปี สอดคล้องกับข้อสรุปในการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่เสนอไว้ว่า ช่วงอายุที่พบโรคแทรกซ้อนได้มากที่สุดในกลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมียคือช่วง 30 - 40 ปี⁽⁷⁾ ในกรณีผู้ป่วยอายุน้อยบางรายที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นนิ่วในถุงน้ำดี แต่ตรวจไม่พบ polymorphism ในยีน *UGT1A1* อาจมีปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง เช่นการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ หรือปัจจัยทางพันธุกรรมอื่นๆ^(11, 12)

ชนิดของธาลัสซีเมียเป็นอีกปัจจัยในการเกิดนิ่วจากการศึกษานี้ พบว่าชนิดของธาลัสซีเมียมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดนิ่ว ชนิดที่พบมากที่สุดคือ β -thalassemia/Hb E ซึ่งพบเป็นนิ่วในถึงน้ำดีสูงถึงร้อยละ 29.4 มากกว่าธาลัสซีเมียชนิดอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Teawtrakul N. (2017) ที่พบว่า ในผู้ป่วย transfusion dependent thalassemia (TDT) มีความชุกของนิ่วในถุงน้ำดีมากกว่าผู้ป่วยกลุ่ม non-transfusion dependent thalassemia (NTDT)⁽⁷⁾

โดยสรุปแล้ว ยังมีผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตรวจพบนิ่วในถุงน้ำดี แต่ไม่พบ polymorphism ในยีน *UGT1A1* และในทางกลับกัน มีผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตรวจไม่พบนิ่วในถุงน้ำดี แต่พบมี polymorphism ในยีน *UGT1A1* การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า การตรวจพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G71R และที่โปรโมเตอร์ (TA)₆/(TA)₇ ของยีน *UGT1A1* อาจมีส่วนสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดนิ่วในถุงน้ำดีของผู้ป่วยเด็ก ซึ่งแนวทางในการศึกษาไปข้างหน้าควรจะศึกษาในตัวอย่างผู้ป่วยธาลัสซีเมียกลุ่มผู้ใหญ่ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

1. Acalovschi M. Cholesterol gallstones: from epidemiology to prevention. Postgrad Med J 2001; 77: 221-9.
2. Teawtrakul N, Jetsrisuparb A, Pongudom S, Sirijerachai C, Chansung K, Wanitpongpun C, et al. Epidemiologic study of major complications in adolescent and adult patients with thalassemia in Northeastern Thailand: the E-SAN study phase I. Hematology 2018; 23: 55-60.

3. Njeze GE. Gallstones. *Niger J Surg* 2013; 19: 49-55.
4. Vitek L, Carey MC. New pathophysiological concepts underlying pathogenesis of pigment gallstones. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36: 122-9.
5. AlFadhli S, Al-Jafer H, Hadi M, Al-Mutairi M, Nizam R. The effect of *UGT1A1* promoter polymorphism in the development of hyperbilirubinemia and cholelithiasis in hemoglobinopathy patients. *PLoS One* 2013; 8: 1-7.
6. Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, Sharma G, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (*UGT1A1*) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2000; 16: 297-306.
7. Tankanilt J, Morales NP, Fucharoen P, Fucharoen S, Chantharaksri U. Association between promoter and coding region mutations of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and β -thalassemia/Hb E with cholelithiasis. *Eur J Haematol* 2008; 80: 351-5.
8. Fucharoen S, Fucharoen G, Sriroongrueng W, Laosombat V, Jetsrisuparb A, Prasatkaew S, et al. Molecular basis of β -thalassemia in Thailand: analysis of β -thalassemia mutations using the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1989; 84: 41-6.
9. Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Extreme bilirubin levels as a causal risk factor for symptomatic gallstone disease. *JAMA Intern Med* 2013; 173: 1222-8.
10. Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, Verma IC, de Silva S, Arambepola M, et al. The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (*UGT1A1*): hematologic and evolutionary implications. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 31: 98-101.
11. Gurusamy KS, Davidson BR. Gallstones. *BMJ* 2014; 348: g2669.
12. Sripa B, Kanla P, Sinawat P, Haswell-Elkins MR. Opisthorchiasis-associated biliary stones: light and scanning electron microscopic study. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3318-21.