

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC ASSOCIATION AND PREDICTION MODEL OF KNEE OSTEOARTHRITIS IN THAI  
POPULATION



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

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย
โดย	น.ส.จุฑามาศ สิทธิกรไพบูลย์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยี่ทอง)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สุรัสวดี อิศวรรตน์)	

จุฬามาศ ลิทธิกรไพบุลย์ : ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมใน  
ประชากรไทย. ( GENETIC ASSOCIATION AND PREDICTION MODEL OF KNEE OSTEOARTHRITIS IN  
THAI POPULATION) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ

ข้อเสื่อมเป็นโรคที่ข้อต่อเสื่อมสภาพบริเวณของกระดูกอ่อนข้อต่อ โรคนี้สามารถพบได้ทั่วไปในประชากร  
ผู้สูงอายุ ซึ่งส่งผลต่อการเกิดภาวะทางเศรษฐกิจและสังคม โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคข้อเข่าเสื่อมที่เป็นสาเหตุของความ  
เจ็บปวด และความทุพพลภาพในผู้สูงอายุ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม  
กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมและพัฒนาแบบจำลองทำนายโรคที่เหมาะสมกับประชากรไทย โดยใช้วิธีทางชีวสารสนเทศ  
ศาสตร์ในการคัดเลือกยีนที่ใช้ศึกษา ดีเอ็นเอและข้อมูลทางคลินิกได้รับจากกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมคนไทยจำนวน 233  
ราย (การเสื่อมระดับเกรด 3 ถึง 4) และกลุ่มควบคุมที่คัดเลือกให้เพศและเชื้อชาติสัมพันธ์กับกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม  
จำนวน 177 ราย การระบุจีโนไทป์ของดีเอ็นเอถูกทำด้วยวิธี high-resolution melting (HRM) analysis และวิธี  
polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ข้อมูลอายุ เพศ และค่า  
ดัชนีมวลกายของอาสาสมัครถูกบันทึกเป็นข้อมูลทางคลินิก ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมถูก  
วิเคราะห์โดย odds ratio แบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมถูกสร้างจากการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก และ  
ทำการประเมินความสามารถในการทำนายของแบบจำลองทำนายด้วยการวิเคราะห์กราฟ receiver operating  
characteristic (ROC) เครื่องหมายพันธุกรรมจากยีน *ADAM metallopeptidase domain 12 (ADAM12)* ยีน  
*Estrogen receptor-alpha (ESR1)* ยีน *Fat mass and obesity-associated (FTO)* ยีน *Growth differentiation  
factor 5 (GDF5)* และยีน *SMAD family member 3 (SMAD3)* ได้รับคัดเลือกสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับการ  
เกิดโรคข้อเข่าเสื่อม จากผลการวิเคราะห์ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายของจีโนไทป์และความถี่แอลลีลของ  
เครื่องหมายพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ยกเว้นเครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *ESR1* ทั้งสองตำแหน่ง  
(rs2234693 และ rs9340799) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบว่า เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน  
*ADAM12* ทั้งสองตำแหน่ง (จีโนไทป์ CT ของ rs1871054 และ จีโนไทป์ CC กับแอลลีล C ของ rs3740199) และจีโนไทป์  
CT ของยีน *FTO* สัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรม  
และข้อมูลทางคลินิกจัดได้ว่าแบบจำลองทำนายนี้มีความสามารถในการทำนายระดับดีมาก ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า  
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอาจแปรผันระหว่างประชากรที่แตกต่างกัน การศึกษาต่อไปในอนาคต ควรเพิ่มขนาด  
ประชากรในการศึกษาให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่า  
เสื่อม และเพื่อพิสูจน์ความสามารถในการทำนายของแบบจำลองที่ถูกสร้างขึ้น

สาขาวิชา พันธุศาสตร์  
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 5971925423 : MAJOR GENETICS

KEYWORD: KNEE OSTEOARTHRITIS, THAI POPULATION, GENETIC MARKER, PREDICTION MODEL

Juthamas Sitthikornpaiboon : GENETIC ASSOCIATION AND PREDICTION MODEL OF KNEE OSTEOARTHRITIS IN THAI POPULATION. Advisor: Asst. Prof. Rachaneekorn Tammachote, Ph.D.

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative disorder characterized by the loss of articular cartilage of the synovial joint. It is a common disorder that creates social and economic burdens as it is a source of pain and disability in the elderly, especially for OA at the knee. This study aimed to investigate the genetic association and to develop the prediction model of knee OA in Thai population. Bioinformatics was employed for gene selection. Genomic DNA was obtained from 233 Thai knee OA patients (grades three to four) and 177 controls. Genotyping was performed by high-resolution melting (HRM) analysis and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Each participant was recorded for age, gender and BMI. Odds ratio was used to test knee OA association. Logistic regression was employed to construct prediction models. The models were evaluated via the receiver operating characteristic (ROC) curve. As for gene selection, *ADAM metalloproteinase domain 12 (ADAM12)*, *Estrogen receptor-alpha (ESR1)*, *Fat mass and obesity-associated (FTO)*, *Growth differentiation factor 5 (GDF5)* and *SMAD family member 3 (SMAD3)* were selected. No significant difference in the genotype distributions and allele frequencies were observed between two groups in any loci except two loci in *ESR1* (rs2234693 and rs9340799). When stratified by gender, two loci in *ADAM12* (the CT genotype of rs1871054, the CC genotype and the C allele of rs3740199) and the CT genotype of *FTO* were significantly associated with knee OA. The prediction model based on genetic and clinical data had excellent predictability. The present study suggests that there might be variability in association among different populations. Further studies with larger populations should be investigated in order to confirm the association between genetic markers and knee OA and to prove the predictive ability of the prediction model.

Field of Study: Genetics

Student's Signature .....

Academic Year: 2018

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คอยช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ รวมไปถึงการให้แนวคิดในการดำเนินชีวิต และกำลังใจตลอดการดำเนินงานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ โดยมีรองศาสตราจารย์ ดร.วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรารายีทอง อาจารย์ผู้เป็นกรรมการภายใน และอาจารย์ ดร.สุรัสวดี อัครรัตน์ จากภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล อาจารย์ผู้เป็นกรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็น รวมทั้งกรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ณัฐพล ธรรมโชติ จากภาควิชาออร์โธปิดิกส์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แอนนา วงษ์กุลจากภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเพื่อการรวบรวมตัวอย่างเลือดและข้อมูลทางคลินิกของประชากรที่ใช้ศึกษาในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทางสถิติ และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือตลอดการดำเนินงานวิจัย รวมถึงขอขอบพระคุณ นายอชิวัฒน์ ติละพรพัฒน์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยในทุก ๆ เรื่องด้วยความยินดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา (สำหรับนิสิตโครงการทุนการศึกษาสมเด็จพระบรมโอรสาธิราชฯ สยามมกุฎราชกุมาร) และทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย และขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ นิสิตทุกคนในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยทางพันธุศาสตร์มนุษย์และการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดการดำเนินงานวิจัย รวมไปถึงขอขอบคุณทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือให้คำแนะนำ และเสริมสร้างกำลังใจให้แก่ผู้วิจัย สุดท้ายนี้คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

จุฑามาศ สิทธิกรไพบูลย์

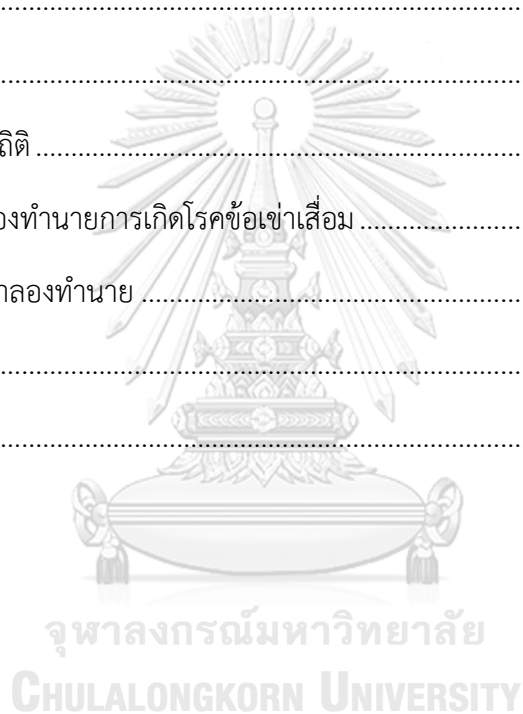
## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
โรคข้อเข่าเสื่อม.....	3
ยีน <i>ADAM metalloproteinase domain 12 (ADAM12)</i> .....	4
ยีน <i>estrogen receptor-alpha (ESR1)</i> .....	9
ยีน <i>fat mass and obesity-associated (FTO)</i> .....	10
ยีน <i>growth differentiation factor 5 (GDF5)</i> .....	11
ยีน <i>SMAD family member 3 (SMAD3)</i> .....	13
แบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม .....	15
การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประเทศไทย.....	16
วิธี high resolution melting (HRM) .....	16

วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)	17
.....	17
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา	18
อุปกรณ์	18
สารเคมี	18
วิธีดำเนินการศึกษา	19
การรวบรวมตัวอย่าง	19
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด	20
การคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม	20
การออกแบบไพรเมอร์	20
การระบุจีโนไทป์	20
1. ยีน ADAM12 ตำแหน่ง rs1871054	20
2. ยีน ADAM12 ตำแหน่ง rs3740199	21
3. ยีน ESR1 ตำแหน่ง rs2234693 และ rs9340799	21
4. ยีน FTO ตำแหน่ง rs8044769	26
5. ยีน GDF5 ตำแหน่ง rs143383	27
6. ยีน SMAD3 ตำแหน่ง rs12901499	27
การวิเคราะห์ทางสถิติ	28
การสร้างแบบจำลองทำนาย	29
การประเมินแบบจำลองทำนาย	31
บทที่ 4 ผลการศึกษา	32
การรวบรวมตัวอย่าง	32
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด	32
การคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม	33



การออกแบบโปรแกรม.....	33
การระบุเงื่อนไขของเครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละตำแหน่ง .....	35
rs1871054 .....	35
rs3740199 .....	36
rs2234693 และ rs9340799.....	36
rs8044769 .....	38
rs143383 .....	39
rs12901499 .....	40
การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	41
การสร้างแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม .....	58
การประเมินแบบจำลองทำนาย .....	66
บรรณานุกรม.....	75
ประวัติผู้เขียน.....	83



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs1871054 .....	5
ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs3740199 .....	6
ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs2234693 .....	9
ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs9340799 .....	10
ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs8044769 .....	10
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs143383 .....	12
ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs12901499 .....	14
ตารางที่ 8 รูปแบบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการบ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย PvuII และ XbaI.....	24
ตารางที่ 9 การแปลงข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก .....	30
ตารางที่ 10 ข้อมูลทางคลินิกของประชากร .....	32
ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการระบุจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรม .....	34
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบสมดุลงของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก .....	41
ตารางที่ 13 ความเป็นอิสระกันของเครื่องหมายพันธุกรรม .....	42
ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ของ rs1871054 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด.....	43
ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ของ rs1871054 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง.....	44
ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ของ rs1871054 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย.....	45
ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ของ rs3740199 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด.....	46
ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ของ rs3740199 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง.....	47
ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ของ rs3740199 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย.....	48
ตารางที่ 20 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด.....	49

ตารางที่ 21 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง.....	50
ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย.....	51
ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด.....	52
ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง.....	53
ตารางที่ 25 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย.....	54
ตารางที่ 26 ความสัมพันธ์ของ rs8044769 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด.....	55
ตารางที่ 27 ความสัมพันธ์ของ rs8044769 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง.....	56
ตารางที่ 28 ความสัมพันธ์ของ rs8044769 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย.....	57
ตารางที่ 29 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก ด้วยวิธี Enter .....	58
ตารางที่ 30 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Enter .....	60
ตารางที่ 31 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Enter .....	61
ตารางที่ 32 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก ด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) .....	62
ตารางที่ 33 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) .....	63
ตารางที่ 34 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) .....	64
ตารางที่ 35 ค่า sensitivity และ specificity ของแบบจำลองทำนาย.....	65
ตารางที่ 36 Hosmer and Lemeshow test ของแบบจำลองทำนาย.....	66
ตารางที่ 37 ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC ของแบบจำลองทำนาย .....	68
ตารางที่ 38 ทดสอบความแตกต่างของค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC ด้วย Z-test.....	69

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 ภาพถ่ายรังสีของข้อเข่าที่ระดับความรุนแรงเกรด 1 ถึง เกรด 4.....	3
รูปที่ 2 การบ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะ PvuII และ XbaI กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์.....	23
รูปที่ 3 รูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) ของ rs1871054 .....	35
รูปที่ 4 รูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) ของ rs3740199 .....	36
รูปที่ 5 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs2234693 และ rs9340799 จากกระบวนการ PCR-RFLP.....	37
รูปที่ 6 ผล PCR-RFLP ของ rs2234693 และ rs9340799 .....	37
รูปที่ 7 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs8044769 จากเจโลอิเล็กโทรโฟรีซิส .....	38
รูปที่ 8 ผลเจโลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ rs8044769 .....	38
รูปที่ 9 ผลจีโนไทป์ของตำแหน่ง rs8044769 ที่ได้จากวิธี sequencing .....	39
รูปที่ 10 รูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) ของ rs143383 .....	39
รูปที่ 11 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs12901499 จากเจโลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	40
รูปที่ 12 ผลเจโลอิเล็กโทรโฟรีซิสของ rs12901499.....	40
รูปที่ 13 กราฟ receiver operating characteristic (ROC) ของแบบจำลองทำนายทั้งหมด .....	67

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคของข้อกระดูกที่พบได้มากที่สุดเ็นประชากรผู้สูงอายุ ซึ่งโรคนี้เกิดจากการเสื่อมของกระดูกอ่อนบริเวณข้อต่อ เมื่อกระดูกอ่อนบางลงจะทำให้ระยะห่างระหว่างข้อเข่าลดลง สามารถส่งผลให้เกิดการเสียดสีของข้อเข่าขึ้น ทำให้ผู้ป่วยมีอาการเจ็บเข่าหรือเกิดเสียงในข้อเข่าได้ ถ้าหากผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมไม่ได้รับการดูแลรักษาตั้งแต่ระยะแรกเริ่ม ผู้ป่วยอาจสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนไหวข้อเข่า เกิดข้อเข่าที่ผิดรูปร่าง บิดเบี้ยวหรือโก่งงอ และอาจนำไปสู่ความพิการในอนาคตได้ ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อมสามารถทำได้จากการพิจารณาภาพถ่ายรังสีของข้อเข่า การวินิจฉัยด้วยวิธีนี้มีข้อเสียคือ มีความไวไม่เพียงพอสำหรับการวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อมระยะแรกเริ่ม (Stachowiak et al., 2016) กล่าวคือ ภาพถ่ายรังสีอาจไม่สามารถแสดงการเสื่อมของข้อต่อในระยะแรกเริ่มได้ ซึ่งอาจส่งผลให้การรักษาข้อเข่าเสื่อมตั้งแต่ระยะแรกเริ่มเป็นไปได้ยาก

ข้อเข่าเสื่อมสามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็น อายุ เพศ การบาดเจ็บที่เข่า โรคอ้วน หรือพันธุกรรม ซึ่งแต่ละปัจจัยมีความสำคัญต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีความสำคัญต่อการเกิดข้อเข่าเสื่อมเป็นอย่างมาก นักวิจัยจึงพยายามศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยเหล่านี้กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม เพื่อนำปัจจัยที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคไปประยุกต์ใช้กับการพัฒนาแบบจำลองทำนายการเกิดโรค หรือการวินิจฉัยโรคให้มีความไวและจำเพาะมากขึ้นต่อไป ก่อนหน้านี้มีการพัฒนาแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมจากหลากหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางคลินิก จากข้อมูลของสารชีวเคมี จากข้อมูลทางพันธุกรรม หรือแม้กระทั่งแบบจำลองทำนายที่เกิดจากข้อมูลหลายชนิดวิเคราะห์ร่วมกัน อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีแบบจำลองทำนายใดที่มีความสามารถในการทำนายโรคนี้ได้ดีที่สุด หรือครอบคลุมประชากรได้มากที่สุด

ในปัจจุบัน การศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทยยังมีอยู่ไม่มาก (Honsawek et al., 2013; Poonpet et al., 2013b; Tawonsawatruk et al., 2011; Tawonsawatruk et al., 2009; Zhan et al., 2017) ทำให้ประเทศไทยขาดแคลนข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญต่อการพัฒนาการวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เหมาะสมกับประชากรไทย ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม แล้วนำตัวแปรทางพันธุกรรมและทางคลินิกที่ผ่านการวิเคราะห์แล้วว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมใน

ประชากรไทยมาสร้างเป็นสมการที่เรียกว่า แบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม เพื่อพัฒนาการวินิจฉัยโรคข้อเข่าเสื่อมให้มีความรวดเร็ว แม่นยำและสามารถทำได้ตั้งแต่ระยะแรกเริ่มของการเสื่อมของข้อเข่า

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายทางพันธุศาสตร์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย และพัฒนาแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม โดยอิงจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกที่ผ่านการวิเคราะห์แล้วว่ามีสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

แบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่ถูกพัฒนาจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก มีความสามารถในการทำนายที่ดีและเหมาะสมกับประชากรไทย และสามารถนำแบบจำลองที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทยได้

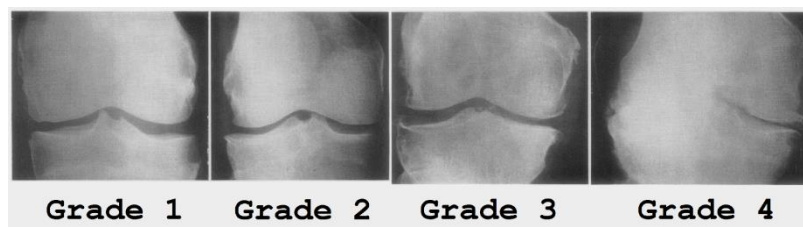
## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### โรคข้อเข่าเสื่อม

ข้อเข่าเสื่อมเป็นโรคที่ข้อต่อของเข่าเสื่อมสภาพ (Sinusas, 2012) เป็นโรคที่สามารถพบได้ทั่วไปในประชากรผู้สูงอายุ โรคนี้มีลักษณะการเสื่อมของพื้นผิวกระดูกอ่อนข้อต่อ โดยจุดเริ่มต้นมาจากการเกิดบาดแผล หรือรอยแยก ที่ทำให้พื้นผิวกระดูกอ่อนข้อต่อเป็นหลุมและสึกกร่อน ความเสียหายของกระดูกอ่อน สามารถส่งผลให้มีการลดลงของ proteoglycan ทำให้กระดูกอ่อนสูญเสียความแข็งแรง นอกจากนี้กระดูกอ่อนที่มีความเสียหาย อาจมีการปลดปล่อยเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสูญเสียกระดูกอ่อนอย่างต่อเนื่อง รวมไปถึงการเกิดเยื่อหุ้มข้อเข่าหนาขึ้น และเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อข้อต่อได้ เมื่อกระดูกอ่อนบางลงจนถึง subchondral bone จะเกิดการกระตุ้นให้สร้างเนื้อกระดูกมากขึ้น (subchondral bone sclerosis) ทำให้เกิดปุ่มงอก (osteophyte) ขึ้นที่ขอบของกระดูกแข็ง และระยะห่างระหว่างข้อเข่าลดน้อยลง (Martin, 1994) หากมีการรับน้ำหนักมากเกินไป ข้อเข่าที่ผิดปกติจะเกิดความเสียหายอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้กระดูกอ่อนเสียหายขั้นรุนแรง และสามารถนำไปสู่ความเจ็บปวด เมื่อยล้า มีการบวมบริเวณข้อเข่า หรือเกิดเสียงในข้อเมื่อผู้ป่วยเคลื่อนไหว ไปจนถึงการสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนไหว และส่งผลให้พิการได้ในที่สุด (Brandt, Dieppe, and Radin, 2008)

ในปัจจุบันการวินิจฉัยข้อเข่าเสื่อมสามารถทำได้จากการพิจารณาระยะของพื้นที่ระหว่างข้อเข่าและการปรากฏของปุ่มงอก (osteophyte) ของกระดูกจากภาพถ่ายรังสีของข้อเข่า (Sinusas, 2012) จากการวินิจฉัยภาพถ่ายรังสี ทำให้สามารถแบ่งความรุนแรงของการเสื่อมของข้อเข่าออกได้เป็น 5 เกรด นับจาก 0 ถึง 4 เรียงลำดับตามความรุนแรงจากน้อยไปมาก (รูปที่ 1) โดยเกรด 0 คือ ไม่มีการเสื่อมของข้อเข่า ในขณะที่ เกรด 4 คือ มีการเสื่อมของข้อเข่ารุนแรงมากที่สุด (Kellgren, and Lawrence, 1957)



รูปที่ 1 ภาพถ่ายรังสีของข้อเข่าที่ระดับความรุนแรงเกรด 1 ถึง เกรด 4

(Kellgren, and Lawrence, 1957)

ซึ่งการวินิจฉัยข้อเข่าเสื่อมนี้เป็นวิธีที่มีความไวต่ำ ไม่สามารถตรวจพบการเสื่อมของข้อเข่า ตั้งแต่ระยะแรกเริ่มได้ (Stachowiak et al., 2016) นอกจากนี้ข้อเข่าเสื่อมยังเป็นโรคที่มีความแปรผันสูง กล่าวคือ ผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมบางรายสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้หลายปีโดยไม่มีการสูญเสียการทำงาน ของข้อเข่าหรือมีอาการรุนแรงขึ้น ในขณะที่ผู้ป่วยบางรายต้องได้รับการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าภายในไม่กี่ปีหลังได้รับการวินิจฉัย (Blanco et al., 2015) ด้วยเหตุนี้ โรคข้อเข่าเสื่อมจึงเป็นโรคที่ไม่สามารถ ป้องกันการเสื่อม หรือจัดการการรักษาผู้ป่วยในระยะแรกเริ่มได้

โรคข้อเข่าเสื่อม มีสาเหตุการเกิดโรคได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ อายุ ซึ่งโรคข้อเข่าเสื่อม สามารถพบได้มากในประชากรผู้สูงอายุ โดยแนวโน้มของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมจะสูงขึ้น ใน ประชากรที่มีอายุสูงมากขึ้น (Fransen et al., 2011; Petersson, 1996) จากการสำรวจในประชากร สหรัฐอเมริกา พบว่า เกือบครึ่งหนึ่งของประชากรผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเป็นผู้ที่มีอายุอยู่ในช่วง 45 ถึง 64 ปี และมีเพียง 1 ใน 8 ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมเท่านั้นที่มีอายุน้อยกว่า 45 ปี (Deshpande et al., 2016) และจากการสำรวจในประชากรผู้สูงอายุของไทย มีความชุกของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ร้อยละ 34.5 ถึง 45.6 (Kuptniratsaikul et al., 2002) สอดคล้องกับความชุกของการเกิดโรคข้อเข่า เสื่อมในประชากรผู้สูงอายุของเกาหลี (Cho et al., 2011) อายุที่สูงมากขึ้นก็สามารถส่งผลให้การทำงาน ของข้อเข่าแย่ลง และมีอิทธิพลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Blagojevic et al., 2010) อีกทั้ง อายุยังสัมพันธ์กับระดับการเสื่อมที่เพิ่มมากขึ้นของข้อเข่าอีกด้วย (Pereira et al., 2017) อีกปัจจัยที่ สำคัญต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมคือ พันธุกรรม จากการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสามารถ ประเมินได้ว่าปัจจัยทางพันธุกรรมมีอิทธิพลต่อการเกิดข้อเข่าเสื่อม ประมาณร้อยละ 40 ถึง 60 (Gardiner et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของภูมิหลังพันธุกรรม (genetic background) ในแต่ละเชื้อชาติ สามารถส่งผลต่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ นอกจากนี้ ปัจจัยที่กล่าวไปข้างต้นแล้ว ปัจจัยของเพศ การเป็นโรคอ้วน และการบาดเจ็บที่ข้อเข่า สามารถส่งผล ต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้เช่นกัน (Haidich, 2010)

### **ยีน *ADAM metallopeptidase domain 12 (ADAM12)***

ยีน *ADAM metallopeptidase domain 12 (ADAM12)* อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 10q26.2 ทำหน้าที่ผลิตโปรตีน ADAM12 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มโปรตีน Zn-dependent metzincin โปรตีน ADAM12 มีบทบาทในกระบวนการสร้างกระดูก การเพิ่มจำนวนและการเจริญ เต็มที่ของเซลล์กระดูกอ่อน (Kveiborg et al., 2006) และกระบวนการสร้าง osteoclast (Verrier et



al., 2004) จากการศึกษาของ Sato และคณะ (2006) พบว่ายีน *ADAM12* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในกระดุก่อนของข้อที่เสื่อม (Sato et al., 2006) จากการศึกษาความสัมพันธ์ของความไวต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่า rs1871054 ในยีน *ADAM12* มีอิทธิพลกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรคอเคเซียน (Caucasian) (Valdes et al., 2006) และสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรจีนฮั่น (Odds ratio (OR) = 1.85,  $P < 0.001$ ) (Ren et al., 2017) และจากการวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta-analysis) พบว่า rs1871054 สัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (OR = 1.72,  $P < 0.001$ ) (Hu, Sun, and Wang, 2017)

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs1871054

ผลจากการศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Hu, Sun, and Wang, 2017	433	522	T vs. C (allele model)	1.72 (1.43-2.07)	<0.001*
	1,036	1,118	TT vs. CC (additive model)	2.06 (1.19-3.56)	0.010*
	433	522	TT+CT vs. CC (dominant model)	2.45 (1.85-3.25)	<0.001*
	433	522	TT vs. CT+CC (recessive model)	1.54 (1.13-2.10)	0.007*
Ren et al., 2017	316	379	C vs. T (allele model)	1.85 (1.49-2.30)	<0.001*
	316	379	CT vs. TT (heterozygote comparison)	1.12 (0.75-1.67)	0.592
	316	379	CC vs. TT (homozygote comparison)	2.81 (1.84-4.27)	<0.001*
	316	379	CT+CC vs. TT (dominant model)	1.68 (1.16-2.43)	0.006*
	316	379	CC vs. CT+TT (recessive model)	2.61 (1.89-3.60)	<0.001*

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ถ้อยพินนของ rs1871054 (ต่อ)

ผลจาก การศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วย โรคข้อเข่า เสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Lv et al., 2017	985	1,098	T vs. C (allele model)	1.52 (1.04-2.24)	0.03*
	382	502	TT vs. CC (additive model)	1.70 (1.03-2.83)	0.04*
	382	502	TT+CT vs. CC (dominant model)	1.36 (1.01-1.81)	0.04*
	382	502	TT vs. CT+CC (recessive model)	2.00 (1.18-3.37)	0.010*

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ถ้อยพินนของ rs3740199

ผลจาก การศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วย โรคข้อเข่า เสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Hu, Sun, and Wang, 2017	2,378	3,200	C vs. G (allele model)	1.00 (0.92-1.06)	0.955
	3,503	5,374	CC vs. GG (additive model)	0.98 (0.90-1.08)	0.738
	1,618	2,877	CC+CG vs. GG (dominant model)	1.10 (0.85-1.42)	0.468
	1,338	2,408	CC vs. GC+GG (recessive model)	0.95 (0.81-1.12)	0.557
	78	76	C vs. G (allele model)	2.41 (1.51-3.84)	<0.001* (เฉพาะ เพศชาย)
	846	1,530	CC vs. GG (additive model)	1.30 (0.81-2.08)	0.28 (เฉพาะ เพศชาย)

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ถ้อยถุณของ rs3740199 (ต่อ)

ผลจากการศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Hu, Sun, and Wang, 2017	78	76	CC+CG vs. GG (dominant model)	2.68 (1.17-6.14)	0.02* (เฉพาะเพศชาย)
	78	76	CC vs. GC+GG (recessive model)	3.51 (1.68-7.36)	0.001* (เฉพาะเพศชาย)
Hao et al., 2017	2,185	3,716	C vs. G (additive model)	0.983 (0.910-1.061)	0.657
	2,185	3,716	CC vs. GG (co-dominant model)	1.033 (0.851-1.255)	0.740
	2,185	3,716	CG vs. GG (co-dominant model)	1.030 (0.877-1.209)	0.721
	2,185	3,716	CC vs. CG+GG (recessive model)	1.017 (0.868-1.190)	0.837
	2,185	3,716	CC+CG vs. GG (dominant model)	1.031 (0.886-1.201)	0.690
Ren et al., 2017	1,405	2,531	C vs. G (allelic contrast)	1.02 (0.93-1.12)	0.726
	1,405	2,531	CG vs. GG (heterozygote comparison)	1.03 (0.87-1.21)	0.743
	1,405	2,531	CC vs. GG (homozygote comparison)	1.03 (0.85-1.25)	0.758
	1,405	2,531	CC+CG vs. GG (dominant model)	1.03 (0.88-1.20)	0.714

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ถ้อยถุณของ rs3740199 (ต่อ)

ผลจากการศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Ren et al., 2017	1,405	2,531	CC vs. CG+GG (recessive model)	1.00 (0.86-1.17)	0.967
	264	993	C vs. G (allelic contrast)	1.49 (0.95-2.34)	0.086 (เฉพาะเพศชาย)
	264	993	CG vs. GG (heterozygote comparison)	1.44 (1.02-2.04)	0.040* (เฉพาะเพศชาย)
	264	993	CC vs. GG (homozygote comparison)	2.09 (0.82-5.33)	0.122 (เฉพาะเพศชาย)
	264	993	CC+CG vs. GG (dominant model)	1.46 (1.05-2.03)	0.025* (เฉพาะเพศชาย)
	264	993	CC vs. CG+GG (recessive model)	1.60 (0.76-3.39)	0.220 (เฉพาะเพศชาย)
Lv et al., 2017	3,512	5,405	C vs. G (allele model)	1.02 (0.93-1.12)	0.68
	1,307	2,439	CC vs. GG (additive model)	1.02 (0.87-1.20)	0.81
	1,307	2,439	CC+CG vs. GG (dominant model)	1.03 (0.88-1.20)	0.70
	1,307	2,439	CC vs. CG+GG (recessive model)	1.00 (0.92-1.09)	0.98

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### ยีน *estrogen receptor-alpha (ESR1)*

ยีน *estrogen receptor-alpha (ESR1)* อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 6q25.1 จากการศึกษา การแสดงออกของยีน พบว่า ยีน *ESR1* มีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด ทั้งเซลล์กระดูกอ่อนข้อต่อ (Ushiyama et al., 1999) และเซลล์กระดูก (Ciocca, and Vargas Roig, 1995) โดย *estrogen receptor-alpha* เป็นตัวควบคุมที่สำคัญในภาวะธำรงดุลของกระดูก (Syed, and Khosla, 2005) มีหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างและสลายของเมทริกซ์กระดูก อ่อน เช่น metalloproteinases (Lee et al., 2003) nitric oxide (Richette et al., 2007) reaction oxygen species (Claassen, Schünke, and Kurz, 2005) เป็นต้น นอกจากนี้ ระดับ *estrogen* ใน น้ำไขข้อ และระดับการจับ *estrogen receptor* ในกระดูกอ่อนยังสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (Fawcett, and Barroso, 2010) ซึ่งระดับ *estrogen* ที่ต่ำจะสัมพันธ์กับความเสี่ยงที่สูงขึ้นของการ เกิดโรคข้อเสื่อม (Sowers et al., 2006) จากการศึกษาความสัมพันธ์ของความไวต่อการเกิดโรคข้อ เข่าเสื่อม พบว่า rs2234693 มีอิทธิพลกับความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรโรค เตอร์ดีม (Bergink et al., 2003) ในประชากรเกาหลี (Jin et al., 2004) และในประชากรเมสซิโซของ เม็กซิโก (Borgonio-Cuadra et al., 2012)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ถ้อยพินของ rs2234693

ผลจาก การศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วย โรคข้อเข่า เสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Wang et al., 2015	2,956	3,645	C vs. T (allelic model)	1.06 (0.98-1.15)	0.67
	2,956	3,645	CC vs. TT (additive model)	1.10 (0.94-1.30)	0.79
	2,956	3,645	CC+TC vs. TT (dominant model)	1.15 (1.02-1.29)	0.02*
	2,956	3,645	CC vs. TC+TT (recessive model)	1.00 (0.87-1.15)	0.62

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ถ้อยพิกษานของ rs9340799

ผลจาก การศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วย โรคข้อเข่า เสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Yin et al., 2015	1,883	1,139	G vs. A (allelic model)	1.47 (1.08-1.99)	0.01*
	1,883	1,139	GG vs. AA (additive model)	2.07 (1.11-3.87)	0.02*
	1,883	1,139	GG+AG vs. AA (dominant model)	1.40 (1.06-1.86)	0.02*

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### ยีน *fat mass and obesity-associated (FTO)*

ยีน *fat mass and obesity-associated (FTO)* อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 16q12.2 ผลจากการศึกษา genome-wide association study (GWAS) แสดงให้เห็นว่า rs8044769 ในยีน *FTO* สัมพันธ์กับโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรยุโรป (Zeggini et al., 2012) และในประชากรคนผิวขาวของทวีปอเมริกาเหนือ (Yau et al., 2017) จากการวิเคราะห์ถ้อยพิกษานของ rs8044769 ในกลุ่มประชากรสหราชอาณาจักรและออสเตรเลีย พบว่าตำแหน่งพหุสัณฐานนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (OR = 1.08,  $P = 0.009$ ) (Panoutsopoulou et al., 2014) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของ rs8044769 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรจีน (Wang et al., 2016)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ถ้อยพิกษานของ rs8044769

ผลจาก การศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วย โรคข้อเข่า เสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Yau et al., 2017	3,898	3,168	C vs. T (allele model)	1.10 (1.03-1.19)	$6.13 \times 10^{-3}$ *

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### ยีน *growth differentiation factor 5 (GDF5)*

ยีน *growth differentiation factor 5 (GDF5)* อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 20q11.22 เป็นยีนสำหรับการสร้างโปรตีน *growth differentiation factor 5 (GDF5)* หรืออีกชื่อหนึ่งคือ โปรตีน *cartilage-derived morphogenetic protein 1 (CDMP1)* ซึ่งอยู่ในกลุ่มโปรตีน *transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )* มีบทบาทสำคัญร่วมกับโปรตีน *bone morphogenetic proteins* หรือ *BMPs* ชนิดต่างๆ ในกระบวนการเจริญของกระดูกอ่อน กระดูกโครงร่าง และข้อต่อ (Francis-West et al., 1999) โปรตีน *GDF5* มีบทบาทในการสร้างข้อต่อไขข้อและรักษาภาวะธำรงดุลของกระดูกอ่อนข้อต่อ (Edwards, and Francis-West, 2001) จากการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GDF5* กับความไวต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่า rs143383 สัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเพิ่มขึ้นในประชากรสหราชอาณาจักร (OR = 1.29,  $P = 8 \times 10^{-5}$ ) (Valdes et al., 2009) และในประชากรไทย (OR = 1.53,  $P = 0.043$ ) (Tawonsawatruk et al., 2011) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประชากรเอเชีย ที่แสดงให้เห็นว่า แอลลีล T ของ rs143383 สัมพันธ์กับความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของการเกิดโรคข้อเสื่อม รวมถึงการมีแอลลีล T ส่งผลให้เซลล์กระดูกอ่อนมีระดับการแสดงออกของยีน *GDF5* ลดต่ำลง และ ระดับการแสดงออกของยีน *GDF5* ที่ต่ำ สัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเสื่อม (Miyamoto et al., 2007) จากการวิเคราะห์ห่อภิมาณของความสัมพันธ์ของยีน *GDF5* กับความไวต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมจากข้อมูลของประชากรยุโรปร่วมกับประชากรเอเชีย แสดงให้เห็นว่า rs143383 มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม (OR = 1.21,  $P = 0.0004$ ) (Chapman et al., 2008) สอดคล้องกับการวิเคราะห์ห่อภิมาณจากข้อมูลที่มากขึ้น (OR = 1.18,  $P = 1.84 \times 10^{-6}$ ) (Zhang et al., 2015)

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ถ้อยพินนของ rs143383

ผลจาก การศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วย โรคข้อเข่า เสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Aghili et al., 2018	7,424	11,310	C vs. T (allele model)	0.792 (0.732-0.857)	≤0.001*
	7,424	11,310	CC vs. TT (homozygote comparison)	0.634 (0.544-0.739)	≤0.001*
	7,424	11,310	CT vs. TT (heterozygote comparison)	1.144 (1.029-1.272)	0.013*
	7,424	11,310	CC+CT vs. TT (dominant model)	0.682 (0.541-0.860)	0.001*
	7,424	11,310	CC vs. CT+TT (recessive model)	0.772 (0.999-0.853)	≤0.001*
Yau et al., 2017	3,898	3,168	T vs. C (allele model)	1.12 (1.04-1.21)	2.13×10 <sup>-3</sup> *
Jiang et al., 2016	3,319	4,987	C vs. T (allele model)	0.808 (0.754-0.866)	<0.001*
	3,319	4,987	TC+CC vs. TT (dominant model)	0.777 (0.708-0.852)	<0.001*
	3,319	4,987	CC vs. TC+TT (recessive model)	0.723 (0.623-0.839)	<0.001*



ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ถ้อยถุณของ rs143383 (ต่อ)

ผลจาก การศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วย โรคข้อเข่า เสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Jiang et al., 2016	3,319	4,987	CC vs. TT (additive model)	0.648 (0.552-0.760)	<0.001*
	3,319	4,987	CC vs. CT (additive model)	0.801 (0.685-0.936)	0.005*
Zhang et al., 2015	7,965	12,747	T vs. C (allelic model)	1.18 (1.10-1.27)	1.84×10 <sup>-6</sup> *
Pan et al., 2014	8,709	15,286	C vs. T (additive model)	0.85 (0.80-0.90)	<0.001*
	8,261	12,947	CC vs. TT (co-dominant)	0.73 (0.66-0.81)	<0.001*
	8,261	12,947	CT vs. TT (co-dominant)	0.84 (0.76-0.94)	0.002*
	8,261	12,947	CC+CT vs. TT (dominant model)	0.81 (0.73-0.90)	<0.001*
	8,261	12,947	CC vs. CT+TT (recessive model)	0.81 (0.74-0.86)	<0.001*
Chapman et al., 2008	2,207	4,356	T vs. C (allelic model)	1.21 (1.09-1.34)	0.0004*
	2,207	4,356	TT+TC vs. CC (dominant model)	1.48 (1.24-1.78)	<0.0001*

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### ยีน *SMAD family member 3 (SMAD3)*

ยีน *SMAD family member 3 (SMAD3)* อยู่บนโครโมโซมตำแหน่ง 15q22.33 ทำหน้าที่ผลิตโปรตีน SMAD3 ซึ่งอยู่ในกลุ่มโปรตีน SMAD family มีบทบาทเป็นตัวกลางสำคัญในหลายกระบวนการส่งสัญญาณ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการส่งสัญญาณของ TGF- $\beta$  ในการเจริญของกระดูกอ่อน (Ferguson et al., 2000) จากการศึกษาของ Yao และคณะ พบว่าการทำให้ยีน Smad3

กลายพันธุ์แบบแทนที่คู่เบส ส่งผลให้เกิดโรคข้อเสื่อมในหนู อีกทั้งยังพบการกลายพันธุ์แบบเดียวกันในผู้ป่วยโรคข้อเสื่อมด้วย (Yao et al., 2003) จากการศึกษาพบว่า rs12901499 ของยีน *SMAD3* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของจีน (OR = 3.68,  $P < 0.001$ ) (Liyang et al., 2013) สอดคล้องกับการวิเคราะห์ห่อภิมาณของความสัมพันธ์ระหว่าง rs12901499 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรยุโรป (OR = 1.22,  $P < 7.5 \times 10^{-6}$ ) (Valdes et al., 2010)

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณของ rs12901499

ผลจากการศึกษาของ	ขนาดประชากร		genetic model	pooled ORs (95% CI)	P-value*
	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม			
Hong et al., 2018	3,438	4,619	G vs. A (allele model)	1.18 (1.04–1.34)	0.011*
Yang et al., 2018	3,871	4,597	G vs. A (allele model)	1.16 (0.99–1.35)	0.054
	3,871	4,597	GG vs. AA (homozygote comparison)	1.26 (0.98–1.63)	0.074
	3,871	4,597	GA vs. AA (heterozygote comparison)	1.16 (0.82–1.65)	0.391
	3,871	4,597	GG+GA vs. AA (recessive model)	1.23 (0.92–1.64)	0.164
	3,871	4,597	GG vs. GA+AA (dominant model)	1.19 (0.97–1.47)	0.102
Valdes et al., 2010	1,888	3,057	G vs. A (allele model)	1.22 (1.12–1.34)	$<7.5 \times 10^{-6}$ *

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### แบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

ก่อนหน้านี้นี้ แบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมถูกพัฒนาขึ้นจากตัวแปรที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นแบบจำลองโดยใช้ตัวแปรทางคลินิก ยกตัวอย่างเช่น อายุ เพศ ค่าดัชนีมวลกาย ระดับความเจ็บปวดบริเวณข้อเข่า เป็นต้น ซึ่งตัวแปรเหล่านี้ทำให้แบบจำลองมีความสามารถในการทำนายข้อเข่าเสื่อมอยู่ในระดับปานกลาง (Yoo et al., 2016) ในทำนองเดียวกันนี้ แบบจำลองที่ใช้ตัวแปรทางชีวเคมีที่สัมพันธ์กับเมแทบอลิซึมของโรคข้อเสื่อม ยกตัวอย่างเช่น ระดับของโปรตีน C-terminal telopeptide of collagen type II (CTX-II) ระดับของโปรตีน cartilage oligomeric matrix proteins (COMP) และระดับของ hyaluronan เป็นต้น ซึ่งตัวแปรเหล่านี้มีบทบาทในการพัฒนาสำหรับรักษาโรคข้อเสื่อมในหลากหลายข้อต่อ แต่จากการประเมินความสามารถในการทำนายโรคข้อเสื่อมในแต่ละข้อต่อจากตัวแปรเหล่านี้ พบว่ายังไม่มีตัวแปรทางชีวเคมีใดที่เป็นตัวทำนายที่ดีที่สุด (Lotz et al., 2013) แม้กระทั่งข้อมูลจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างข้อเข่าเสื่อมกับเครื่องหมายทางพันธุศาสตร์ (genetic marker) ยังไม่สามารถให้ข้อมูลที่เหมาะสมต่อการสร้างแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ (Gardiner et al., 2016)

เมื่อแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมจากตัวแปรเพียงชนิดเดียวไม่สามารถทำนายโรคได้อย่างเที่ยงตรงแม่นยำ จึงทำให้มีการพัฒนาแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมโดยอาศัยข้อมูลจากตัวแปรหลายชนิดประกอบกัน ยกตัวอย่างเช่น แบบจำลองที่สร้างจากตัวแปรทางพันธุกรรมคือ จีโนไทป์ของยีนที่สัมพันธ์กับข้อเข่าเสื่อม ได้แก่ ยีน *asporin* (ASPN) ยีน *growth differentiation factor 5* (GDF5) และ ยีน *double von Willebrand factor A domains* (DVWA) วิเคราะห์ร่วมกับตัวแปรทางคลินิก ได้แก่ เพศ อายุ และค่าดัชนีมวลกาย ทำให้ได้แบบจำลองที่มีความสามารถในการทำนายที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับแบบจำลองที่สร้างจากตัวแปรใดตัวแปรหนึ่ง (Takahashi et al., 2010) ต่อมามีการพัฒนาแบบจำลอง โดยอาศัยการเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมจากฐานข้อมูล ทำให้ได้ตัวแปรทางพันธุกรรมเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับการวิเคราะห์ร่วมกับตัวแปรทางคลินิก ซึ่งแบบจำลองที่ดีที่สุดที่ถูกพัฒนาขึ้นจากการศึกษานี้ ประกอบด้วย ตัวแปรทางคลินิก คือ อายุเมื่อได้รับการวินิจฉัย และตัวแปรทางพันธุกรรม คือ ภาวะพหุสัญญาณที่ตั้งอยู่ในยีนที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้ ยีน *transforming growth factor beta 1* (TGFB1) \_ ยีน *LDL receptor related protein 6* (LRP6) \_ ยีน *prostaglandin-endoperoxide synthase 2* (PTGS2) \_ ยีน *carbohydrate sulfotransferase 3* (CHST3) \_ ยีน *TIMP metalloproteinase inhibitor 2* (TIMP2) ยีน *glucokinase regulator* (GCKR) \_ ยีน *heat shock protein family A (Hsp70) member 5* (HSPA5) และภาวะพหุสัญญาณ

ที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีน *solute carrier family 27 member 2 (SLC27A2)* แบบจำลองนี้ถูกประเมินความสามารถในการทำนายแล้วพบว่ามีความสัมพันธ์ที่ไคกราฟ receiver operating characteristic (ROC) curve เท่ากับ 0.82 แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองนี้สามารถทำนายข้อผิดพลาดได้ในระดับดี และเมื่อเทียบแบบจำลองที่ดีที่สุดนี้กับแบบจำลองที่ถูกสร้างจากตัวแปรเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง พบว่าความสามารถในการทำนายของแบบจำลองเพิ่มขึ้นร้อยละ 4 เมื่อเทียบกับแบบจำลองที่ถูกสร้างจากตัวแปรทางพันธุกรรมเท่านั้น และความสามารถในการทำนายของแบบจำลองเพิ่มขึ้น ร้อยละ 16 เมื่อเทียบกับแบบจำลองที่ถูกสร้างจากตัวแปรทางคลินิกเท่านั้น (Blanco et al., 2015) อย่างไรก็ตาม การพัฒนาแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมยังคงเป็นเรื่องที่ท้าทายในหลายประชากร เนื่องจากว่าปัจจุบันยังไม่มีแบบจำลองใดที่สามารถทำนายโรคนี้ได้อย่างแม่นยำและครอบคลุมในทุกประชากร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประชากรไทย

#### การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย

ในปี 2011 Tawonsawatruk และคณะ เสนอว่าความเสี่ยงการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมยังสัมพันธ์กับ rs143383 ของยีน *GDF5* (Tawonsawatruk et al., 2011) นอกจากนี้ การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม แสดงให้เห็นว่า rs4747096 ของยีน *ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 14 (ADAMTS14)* สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเพิ่มขึ้นในเพศหญิง (Poonpet et al., 2013a) ในขณะที่ rs3740199 ของยีน *ADAM metalloproteinase domain 12 (ADAM12)* สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเพิ่มขึ้นในเพศชาย (Poonpet et al., 2016)

อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีผลการนำปัจจัยทางพันธุกรรมเหล่านี้มาพัฒนาแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมสำหรับประชากรไทย

#### วิธี high resolution melting (HRM)

HRM เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาความแตกต่างและพอลิมอร์ฟิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำได้รวดเร็ว โดยอาศัยการตรวจสอบ melting temperature ของดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันก็จะมี melting temperature ที่แตกต่างกันด้วย สำหรับการทำให้ HRM จะใช้สารฟลูออเรสเซนต์ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอสายคู่ สารนี้จะเรืองแสงเมื่อจับกับดีเอ็นเอเท่านั้น เมื่อดีเอ็นเอสายคู่แยก

ออกจากกันที่ melting temperature ระดับแสงฟลูออเรสเซนซ์ก็จะลดลง ทำให้เครื่องตรวจจับการเปลี่ยนแปลงของระดับฟลูออเรสเซนซ์ได้ จึงสามารถระบุจีโนไทป์ของดีเอ็นเอได้

### วิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

วิธี PCR-RFLP มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบชนิดของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ มีขั้นตอนเริ่มจากการทำพีซีอาร์เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการศึกษาก่อน แล้วจึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แอลลีลที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะถูกตัด ในขณะที่แอลลีลที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน ไม่สามารถจดจำด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ จะไม่ถูกตัด เมื่อแยกขนาดแถบดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะได้แถบที่มีขนาดต่างกัน



### บทที่ 3

#### อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา

##### อุปกรณ์

- ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด P2 (0.2-2  $\mu$ l), P20 (2-20  $\mu$ l), P100 (10-100  $\mu$ l), P200 (20-200  $\mu$ l) และ P1000 (100-1000  $\mu$ l) (Gilson, France)
- ไมโครปิเปตทิว (micropipette tip) ขนาด 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l และ 1000  $\mu$ l (ExtraGene Inc., Taiwan)
- หลอด microcentrifuge ขนาด 0.2 ml และ 1.5 ml (ExtraGene Inc)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง MIKRO 120 MICROLITER CENTRIFUGE (Hettich Lab Technology, USA)
- เครื่องผสมสารละลาย Multi-purpose vortex mixer (DAIHAN Scientific, South Korea)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ GenePro Thermal cycler (Bioer Technology, China)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Heat block ALB64 (FINEPCR, Korea)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA)
- Submerge-Mini Gel Electrophoresis System WSE-1710 (ATTO, Japan)
- เตอบไมโครเวฟ (SHARP, Thailand)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C

##### สารเคมี

- AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)
- SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories)
- Green PCR Master Mix Direct-Load, 2X (Biotechrabbit, Germany)
- Taq DNA Polymerase Recombinant, 5 U/ $\mu$ l (Apsalagen, Thailand)
- Taq DNA polymerase (Fermentas Inc., USA)
- 10X reaction buffer (Apsalagen)

- 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Apsalagen)
- 10 mM dNTP Mix, PCR Grade (Invitrogen, USA)
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ
  - PvuII, XbaI, BsmFI, MboII (New England BioLabs, USA)
  - 10X CutSmart<sup>®</sup> buffer (New England BioLabs)
- Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen)
- Agarose Vetec<sup>™</sup> reagent grade (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris (Bio Basic Inc., Canada)
- Boric acid (Bio Basic Inc.)
- EDTA, disodium salt, dihydrate (Bio Basic Inc.)
- 100 bp DNA Ladder OneMARK 100 (GeneDireX, Taiwan)
- 25 bp DNA Ladder HyperLadder<sup>™</sup> 25bp (Bioline, England)
- Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs)
- 6X loading dye (Biotechrabbit)
- RedSafe<sup>™</sup> Nucleic Acid Staining Solution (20,000X) (iNtRON Biotechnology, USA)

### วิธีดำเนินการศึกษา

#### การรวบรวมตัวอย่าง

ขอรับรองการพิจารณาด้านจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 (คณะแพทยศาสตร์) ในการศึกษาประกอบด้วยอาสาสมัคร 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม กลุ่มละอย่างน้อย 150 ราย ในศึกษานี้ ผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม หมายถึง ผู้ป่วยที่เป็นประชากรไทย อายุ 50 ปีขึ้นไป คัดเลือกเฉพาะผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของการเสื่อมของข้อเข่าอยู่ในช่วงเกรด 3 ถึง 4 ตามเกณฑ์ของ Kellgren และ Lawrence (1957) ซึ่งพิจารณาจากการตรวจทางรังสีวิทยาโดยแพทย์เฉพาะทาง เพื่อให้ได้ฟีโนไทป์ที่แสดงความเป็นโรคข้อเข่าเสื่อมแบบรุนแรง กลุ่มควบคุม หมายถึง อาสาสมัครที่เป็นประชากรไทยอายุ 50 ปีขึ้นไป ที่ได้รับการซักประวัติ สอบถามอาการ และการตรวจทางรังสีวิทยาโดยแพทย์เฉพาะทาง

เพื่อสรุปว่า อาสาสมัครไม่ได้เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม และไม่มีประวัติอุบัติเหตุ หรือทำกิจกรรม/เล่นกีฬาที่ทำให้เข่าเสื่อม โดยอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ไม่ถูกคัดเข้าในการศึกษานี้

รวบรวมข้อมูลทางคลินิก ได้แก่ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง การเสื่อมของข้อเข่า และการปรากฏของการเสื่อมที่ข้อต่ออื่น และรวบรวมตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 3 มิลลิลิตร โดยพยาบาลวิชาชีพของแผนกผู้ป่วยนอก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

#### **การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด**

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer) เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$

วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร  $\times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{dilution factor}$  สำหรับการศึกษาขั้นต่อไป และคำนวณความบริสุทธิ์ของตัวอย่างดีเอ็นเอจากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร

#### **การคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม**

คัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมอย่างน้อย 7 ตำแหน่ง จากฐานข้อมูลระดับชาติและระดับนานาชาติ โดยมีหลักเกณฑ์การคัดเลือก คือ เลือกยีนที่ผ่านการวิเคราะห์อภิมาน (meta-analysis) แล้วว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

#### **การออกแบบไพรเมอร์**

ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 (Untergasser et al., 2012) และอ้างอิงลำดับเบสของไพรเมอร์จากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ กรณีเครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้รับคัดเลือกมาเคยผ่านการระบุจีโนไทป์โดยวิธี PCR-RFLP หรือวิธี HRM

#### **การระบุจีโนไทป์**

1. ยีน ADAM12 ตำแหน่ง rs1871054

ระบุจีโนไทป์ด้วยวิธี HRM เริ่มจากการสุ่มระบุจีโนไทป์ของดีเอ็นเอด้วยวิธี sequencing เพื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์แล้วเป็น ดีเอ็นเออ้างอิง (reference DNA) เมื่อได้ดีเอ็นเออ้างอิงครบทุกจีโนไทป์แล้ว จึงนำดีเอ็นเอเหล่านั้นมาปรับปฏิกิริยาของ HRM เพื่อให้ได้องค์ประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยาที่เหมาะสมกับการจัดกลุ่มตัวอย่างตามจีโนไทป์ที่ทราบแล้ว

โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories) 10  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{M}$  primer ปริมาณ 0.7  $\mu\text{l}$  ทั้ง forward และ reverse primer, ดีเอ็นเอ



100 ng และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen) ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 3 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 57.6°C เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 40 รอบ โดยกำหนดให้บันทึกการเรืองแสงของ EvaGreen ในขั้น annealing หลังจากรอบการทำ denaturation และ annealing ครบ 40 รอบ ขั้นตอนต่อไปคือ การเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 98°C เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย 65°C เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนสุดท้ายคือการสร้าง melt curve ที่อุณหภูมิ 65 ถึง 90°C โดยเพิ่มอุณหภูมิทีละ 2°C แต่ละอุณหภูมิใช้เวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจึงใช้โปรแกรม Precision Melt Analysis™ software (Bio-Rad Laboratories) ในการวิเคราะห์ melt profile และจัดกลุ่มตัวอย่างตามจีโนไทป์ของดีเอ็นเออ้างอิง

## 2. ยีน ADAM12 ตำแหน่ง rs3740199

อ้างอิงวิธีการระบุจีโนไทป์จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Poonpet et al., 2016) และสุ่มระบุจีโนไทป์ของดีเอ็นเอด้วยวิธี sequencing เพื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์แล้วเป็นดีเอ็นเออ้างอิง

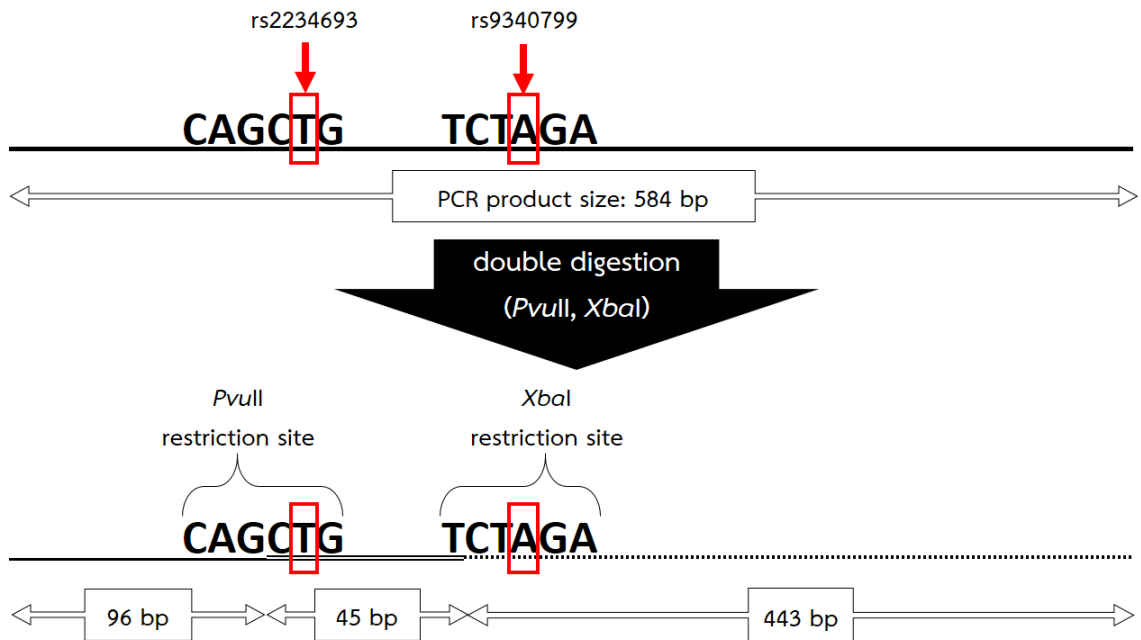
โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories) 10  $\mu$ l, 10  $\mu$ M primer ปริมาณ 0.3  $\mu$ l ทั้ง forward และ reverse primer, ดีเอ็นเอ 100 ng และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen) ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 2 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 40 รอบ โดยกำหนดให้บันทึกการเรืองแสงของ EvaGreen ในขั้น annealing หลังจากรอบการทำ denaturation และ annealing ครบ 40 รอบ ขั้นตอนต่อไปคือ การเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 98°C เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย 70°C เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนสุดท้ายคือการสร้าง melt curve ที่อุณหภูมิ 70 ถึง 90°C โดยเพิ่มอุณหภูมิทีละ 2°C แต่ละอุณหภูมิใช้เวลา 10 วินาที พร้อมทั้งบันทึกการเรืองแสงของ EvaGreen ในแต่ละอุณหภูมิ หลังจากนั้นจึงใช้โปรแกรม Precision Melt Analysis™ software (Bio-Rad Laboratories) ในการวิเคราะห์ melt profile และจัดกลุ่มตัวอย่างตามจีโนไทป์ของดีเอ็นเออ้างอิง

## 3. ยีน ESR1 ตำแหน่ง rs2234693 และ rs9340799

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ครอบคลุมทั้งสองเครื่องหมายพันธุกรรมด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X reaction buffer ปริมาณ 2  $\mu$ l, 50 mM MgCl<sub>2</sub> ปริมาณ 0.8  $\mu$ l, 10 mM dNTP mix ปริมาณ 0.4  $\mu$ l, 10  $\mu$ M primer ปริมาณ 0.4  $\mu$ l ทั้ง forward และ reverse

primer, ดีเอ็นเอ 100 ng, *Taq* DNA Polymerase Recombinant, 5 U/ $\mu$ l (Apsalagen) ปริมาณ 0.2  $\mu$ l และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen) ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ ประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 52°C เป็นเวลา 15 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 40 วินาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% (w/v) ในการตรวจสอบนี้ใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 5  $\mu$ l เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 100 bp DNA ladder และแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หลังจากตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้ว นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เหลื้อมาบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pvu*II และ *Xba*I พร้อมกัน (double digestion) โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 15  $\mu$ l, 10X CutSmart® buffer (New England Biolabs) ปริมาณ 2  $\mu$ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pvu*II และ *Xba*I (New England Biolabs) ชนิดละ 4 U และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen) จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้กับ 25 bp DNA ladder และ 100 bp DNA ladder ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรส ความเข้มข้น 3% (w/v) และแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

การบ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pvu*II และ *Xba*I กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ทำให้แปลผลจีโนไทป์ของตำแหน่ง rs2234693 และ rs9340799 ได้ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การบ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะ PvuII และ XbaI กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

ที่มีจีโนไทป์ของตำแหน่ง rs2234693 คือ T และจีโนไทป์ของตำแหน่ง rs9340799 คือ A

จากรูปที่ 2 ทำให้สามารถแปลผลจีโนไทป์ของทั้งสองตำแหน่งที่เป็นไปได้ทั้งหมด  
จำนวน 10 รูปแบบ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 รูปแบบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการบ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย *PvuII* และ *XbaI*

รูปแบบ ที่	ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการบ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วย <i>PvuII</i> และ <i>XbaI</i>	ผลที่ได้	
		จีโนไทป์ของ rs2234693	จีโนไทป์ของ rs9340799
1	<p>TA/TA</p> <p>CAGCTG TCTAGA</p> <p>96 bp 45 bp 443 bp</p> <p>CAGCTG TCTAGA</p> <p>96 bp 45 bp 443 bp</p>	TT	AA
2	<p>TA/TG</p> <p>CAGCTG TCTAGA</p> <p>96 bp 45 bp 488 bp</p> <p>CAGCTG TCTGGA</p> <p>96 bp 488 bp</p>	TT	AG
3	<p>TG/TG</p> <p>CAGCTG TCTGGA</p> <p>96 bp 488 bp</p> <p>CAGCTG TCTGGA</p> <p>96 bp 488 bp</p>	TT	GG
4	<p>TA/CA</p> <p>CAGCTG TCTAGA</p> <p>96 bp 45 bp 443 bp</p> <p>CAGCCG TCTAGA</p> <p>141 bp 443 bp</p>	TC	AA

ตารางที่ 8 รูปแบบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการบ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย *PvuII* และ *XbaI* (ต่อ)

รูปแบบ ที่	ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการบ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วย <i>PvuII</i> และ <i>XbaI</i>	ผลที่ได้	
		จีโนไทป์ของ rs2234693	จีโนไทป์ของ rs9340799
5	<p>TA/CG</p> <p>CAGCTG TCTAGA</p> <p>96 bp 45 bp 443 bp</p> <p>CAGCCG TCTGGA</p> <p>584 bp</p>	TC	AG
6	<p>TG/CA</p> <p>CAGCTG TCTGGA</p> <p>96 bp 488 bp</p> <p>CAGCCG TCTAGA</p> <p>141 bp 443 bp</p>	TC	AG
7	<p>TG/CG</p> <p>CAGCTG TCTGGA</p> <p>96 bp 488 bp</p> <p>CAGCCG TCTGGA</p> <p>584 bp</p>	TC	GG
8	<p>CA/CA</p> <p>CAGCCG TCTAGA</p> <p>141 bp 443 bp</p> <p>CAGCCG TCTAGA</p> <p>141 bp 443 bp</p>	CC	AA

ตารางที่ 8 รูปแบบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการบ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย *PvuII* และ *XbaI* (ต่อ)

รูปแบบ ที่	ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการบ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วย <i>PvuII</i> และ <i>XbaI</i>	ผลที่ได้	
		จีโนไทป์ของ rs2234693	จีโนไทป์ของ rs9340799
9		CC	AG
10		CC	GG

#### 4. ยีน FTO ตำแหน่ง rs8044769

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ครอบคลุมตำแหน่ง rs8044769 ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X *Taq* buffer ปริมาณ 2  $\mu$ l, 50 mM  $MgCl_2$  ปริมาณ 0.6  $\mu$ l, 10 mM dNTPs ปริมาณ 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ M primer ปริมาณ 0.4  $\mu$ l ทั้ง forward และ reverse primer, ดีเอ็นเอ 100 ng, *Taq* DNA polymerase (Fermentas Inc.) ปริมาณ 0.4 U และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen) ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 54°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% (w/v) ในการตรวจสอบนี้ใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 10  $\mu$ l เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 100 bp DNA ladder และแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หลังจาก

ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้ว นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เหลือมาบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsmFI* โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 10  $\mu$ l, 10X *CutSmart*<sup>®</sup> buffer ปริมาณ 2  $\mu$ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 U/ $\mu$ l *BsmFI* (New England BioLabs) และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen) จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรสความเข้มข้น 2% (w/v) และแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

#### 5. ยีน GDF5 ตำแหน่ง rs143383

ระบุจีโนไทป์ด้วยวิธี HRM เริ่มจากการสุ่มระบุจีโนไทป์ของดีเอ็นเอด้วยวิธี sequencing เพื่อใช้ดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์แล้วเป็น ดีเอ็นเออ้างอิง เมื่อได้ดีเอ็นเออ้างอิงครบทุกจีโนไทป์แล้ว จึงนำดีเอ็นเอเหล่านั้นมาปรับปฏิกิริยาของ HRM เพื่อให้ได้องค์ประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยาที่เหมาะสมกับการจัดกลุ่มตัวอย่างตามจีโนไทป์ที่ทราบแล้ว

โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย *SsoFast*<sup>™</sup> *EvaGreen*<sup>®</sup> *Supermix* (Bio-Rad Laboratories) 10  $\mu$ l, 10  $\mu$ M primer ปริมาณ 0.7  $\mu$ l ทั้ง forward และ reverse primer, ดีเอ็นเอ 100 ng และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen) ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำ denaturation ที่อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 5 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 57.6°C เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 40 รอบ โดยกำหนดให้บันทึกการเรืองแสงของ *EvaGreen* ในขั้น annealing หลังจากรอบการทำ denaturation และ annealing ครบ 40 รอบ ขั้นตอนต่อไปคือ การเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 98°C เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย 65°C เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนสุดท้ายคือการสร้าง melt curve ที่อุณหภูมิ 65 ถึง 90°C โดยเพิ่มอุณหภูมิทีละ 2°C แต่ละอุณหภูมิใช้เวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจึงใช้โปรแกรม Precision Melt Analysis<sup>™</sup> software (Bio-Rad Laboratories) ในการวิเคราะห์ melt profile และจัดกลุ่มตัวอย่างตามจีโนไทป์ของดีเอ็นเออ้างอิง

#### 6. ยีน SMAD3 ตำแหน่ง rs12901499

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ครอบคลุมตำแหน่ง rs12901499 ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย *Green PCR Master Mix Direct-Load, 2X* (Biotechrabbit) ปริมาณ 10  $\mu$ l, 10  $\mu$ M primer ปริมาณ 0.6  $\mu$ l ทั้ง forward และ reverse primer, ดีเอ็นเอ 100 ng และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen) ขั้นตอนการ

ทำพีซีอาร์ ประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่รอบการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที, 60°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรสความเข้มข้น 2% (w/v) ในการตรวจสอบนี้ใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 10  $\mu$ l เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ 100 bp DNA ladder และแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที หลังจากตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้ว นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เหลือมาบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo*II โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 10  $\mu$ l, 10X CutSmart<sup>®</sup> buffer ปริมาณ 2  $\mu$ l, เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 U/ $\mu$ l *Mbo*II (New England BioLabs) 0.4  $\mu$ l และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20  $\mu$ l ด้วย Nuclease- and Protease-Free Water (Apsalagen) จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้กับ 100 bp DNA ladder ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลชนิดอะกาโรสความเข้มข้น 3.5% (w/v) และแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 55 นาที

#### การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบข้อมูลทางคลินิกของประชากรด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2013 (USA) โดยใช้การทดสอบไคสแควร์ ( $\chi^2$  test) เปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างเพศหญิงต่อเพศชายของสองกลุ่มตัวอย่าง และใช้ unpaired Student's t-test เปรียบเทียบข้อมูลอายุ น้ำหนัก ส่วนสูง และค่าดัชนีมวลกายระหว่างสองกลุ่มตัวอย่าง

ตรวจสอบสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) โดยใช้ OEGE - Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>) (Rodriguez, Gaunt, and Day, 2009)

ทดสอบความเป็นอิสระกันของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรม โดยการทดสอบไคสแควร์ แบบทีละคู่ และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมด้วย odds ratio (OR) โดยใช้ MEDCALC<sup>®</sup> easy-to-use statistical software (MedCalc Software, Belgium)



### การสร้างแบบจำลองทำนาย

สร้างแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก (logistic regression analysis) โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp., USA) ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติกต้องผ่านการแปลงให้เป็นตัวเลขก่อนนำไปวิเคราะห์ ดังตารางที่ 9

การวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติกนี้ กำหนดให้ ตัวแปรต้น คือ ข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก ตัวแปรตาม คือ การเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม และใช้ค่าความน่าจะเป็น เท่ากับ 0.5 เป็นค่าแบ่งแยกกลุ่มของการทำนาย (classification cutoff) โดยเลือกวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก ด้วย 2 วิธี ได้แก่ วิธี Enter เพื่อใช้ทุกตัวแปรในการวิเคราะห์ และอีกวิธีหนึ่ง คือ วิธี Forward Stepwise (Wald) เป็นการใช้ Wald  $\chi^2$  statistics คัดเลือกตัวแปรในการวิเคราะห์ เพื่อให้ได้แบบจำลองทำนายที่ดีที่สุด

นอกจากแบบจำลองทำนายการเกิดโรคแล้ว โปรแกรม SPSS ยังรายงานค่า sensitivity และ specificity ของแบบจำลองทำนายที่วิเคราะห์ได้อีกด้วย โดยค่า sensitivity (หรือ true positive) คือ เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่ได้รับการทำนายจากแบบจำลองว่าเป็นโรคข้อเข่าเสื่อม และค่า specificity (หรือ true negative) คือ เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มควบคุมที่ได้รับการทำนายจากแบบจำลองว่าไม่เป็นโรคข้อเข่าเสื่อม

ตารางที่ 9 การแปลงข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก

ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์	กำหนดค่าให้เป็นตัวเลข
การเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม = 0
	กลุ่มผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม = 1
เพศ	เพศหญิง = 0
	เพศชาย = 1
อายุ	ระบุค่าตามจริง
น้ำหนัก	ระบุค่าตามจริง
ส่วนสูง	ระบุค่าตามจริง
ค่าดัชนีมวลกาย	ระบุค่าตามจริง
rs1871054	จีโนไทป์ CC = 0
	จีโนไทป์ CT = 1
	จีโนไทป์ TT = 2
rs3740199	จีโนไทป์ GG = 0
	จีโนไทป์ GC = 1
	จีโนไทป์ CC = 2
rs2234693	จีโนไทป์ TT = 0
	จีโนไทป์ TC = 1
	จีโนไทป์ CC = 2
rs9340799	จีโนไทป์ AA = 0
	จีโนไทป์ AG = 1
	จีโนไทป์ GG = 2
rs8044769	จีโนไทป์ CC = 0
	จีโนไทป์ CT = 1
	จีโนไทป์ TT = 2

### การประเมินแบบจำลองทำนาย

ประเมินความเหมาะสมของแบบจำลองทำนายด้วย Hosmer and Lemeshow test และ ประเมินความสามารถในการทำนายของแบบจำลองด้วยการวิเคราะห์ค่าพื้นที่ใต้กราฟ receiver operating characteristic (ROC) curve โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp.) ใน การศึกษานี้ใช้ค่าความน่าจะเป็นที่ได้จากแบบจำลองทำนายในการสร้างกราฟ ROC และเปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าพื้นที่ใต้กราฟด้วย Z-test (Hanley and McNeil, 1983)



## บทที่ 4 ผลการศึกษา

### การรวบรวมตัวอย่าง

การศึกษานี้ได้รับอนุมัติ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 (คณะแพทยศาสตร์) โดยมีรหัสโครงการวิจัยคือ MTU-EC-OT-4-193/60 อาสาสมัครทั้งหมดของการศึกษานี้ มีจำนวนรวมทั้งสิ้น 410 ราย ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม 233 ราย และกลุ่มควบคุม 177 ราย ข้อมูลสัดส่วนระหว่างเพศหญิงต่อเพศชาย อายุเฉลี่ย น้ำหนักเฉลี่ย ส่วนสูงเฉลี่ย และค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และกลุ่มควบคุม แสดงดังตารางที่ 10 สัดส่วนระหว่างเพศหญิงต่อเพศชายในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและในกลุ่มควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกันกับน้ำหนักเฉลี่ยและค่าดัชนีมวลกายเฉลี่ยของทั้งสองกลุ่มที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ อายุเฉลี่ยและส่วนสูงเฉลี่ยของกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 10 ข้อมูลทางคลินิกของประชากร

ข้อมูลทางคลินิก	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม	P-value*
	n=233	n=177	
เพศหญิง/เพศชาย	197/36	138/39	0.088
อายุ (ปี)	71.1±8.8	58.1±7.7	<0.001*
น้ำหนัก (กก.)	61.4±11.9	63.1±12.0	0.153
ส่วนสูง (ซม.)	154.7±7.2	157.6±6.1	<0.001*
ค่าดัชนีมวลกาย (กก./ม <sup>2</sup> )	25.7±4.6	25.4±4.1	0.499

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด

ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง 0.0000725 – 0.493 และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าอยู่ในช่วง -0.007 – 0.270 โดยตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.181 – 654.925 ng/ $\mu$ l และมีค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง -197.699 – 66.084

### การคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม

เครื่องหมายพันธุกรรมในการศึกษานี้ ได้รับคัดเลือกจากผลการวิเคราะห์ถ้อยคำของการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 1-7) ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่ผ่านการคัดเลือกตามเกณฑ์ (รายละเอียดในบทที่ 3) ประกอบด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมตำแหน่ง rs1871054 (ยีน *ADAM12*) ตำแหน่ง rs3740199 (ยีน *ADAM12*) ตำแหน่ง rs2234693 (ยีน *ESR1*) ตำแหน่ง rs9340799 (ยีน *ESR1*) ตำแหน่ง rs8044769 (ยีน *FTO*) ตำแหน่ง rs143383 (ยีน *GDF5*) และ ตำแหน่ง rs12901499 (ยีน *SMAD3*)

### การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์สำหรับการระบุจีโนไทป์ของตำแหน่ง rs3740199 rs143383 และ rs12901499 ได้รับการอ้างอิงมาจากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ ในขณะที่ไพรเมอร์ของเครื่องหมายพันธุกรรมอีก 4 ตำแหน่งที่เหลือ มาจากการออกแบบตามความเหมาะสมของวิธีการระบุจีโนไทป์ของแต่ละตำแหน่ง สำหรับไพรเมอร์ของตำแหน่ง rs2234693 และ rs9340799 ถูกออกแบบครอบคลุมบริเวณเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 2 ตำแหน่งเพื่อระบุจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-RFLP ที่สามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะกับทั้ง 2 ตำแหน่งได้ในเวลาเดียวกัน ข้อมูลไพรเมอร์และ melting temperature แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการระบุจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรม

เครื่องหมายพันธุกรรม	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์		melting temperature (T <sub>m</sub> )	ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	อ้างอิงจาก
rs1871054	forward primer	5' AAAGTAATTCCTTCCCAAGAAGC 3'	59.3°C	57 bp	-
	reverse primer	5' CCCATGGCTCTCCAGAGTA 3'	59.5°C		
rs3740199	forward primer	5' TCACTGGGATCCAGAGGT 3'	56°C	50 bp	Poonpet et al., 2016
	reverse primer	5' TGAAGTTGTCAGTGCCTCT 3'	54.5°C		
rs2234693 และ rs9340799	forward primer	5' AGGGTTATGTGGCAATGACG 3'	58.4°C	584 bp	-
	reverse primer	5' TCCTTGGCAGATTCCATAGC 3'	58.4°C		
rs8044769	forward primer	5' CCATAGTGCTGGGCTTACAGG 3'	66°C	527 bp	-
	reverse primer	5' TACACCAGCCCTAAGCCTCTG 3'	66°C		
rs143383	forward primer	5' CCTCAGTCAGTTGTGCAGGA 3'	60.5°C	86 bp	Shin et al., 2012
	reverse primer	5' CACCGTCTCCAGTCAGCAG 3'	61.7°C		

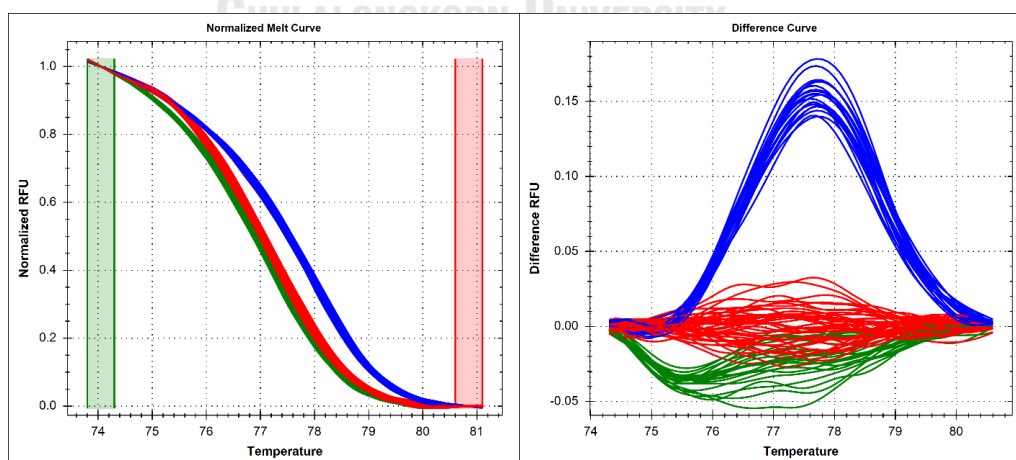
ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับการระบุจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรม (ต่อ)

เครื่องหมายพันธุกรรม	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์		melting temperature ( $T_m$ )	ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	อ้างอิงจาก
rs12901499	forward primer	5' GAGGAGTTGGAGAAGGATGTT 3'	62°C	293 bp	Liyang et al., 2013
	reverse primer	5' CTCTCCTGACAGTGAACAAAAC 3'	64°C		

### การระบุจีโนไทป์ของเครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละตำแหน่ง

#### rs1871054

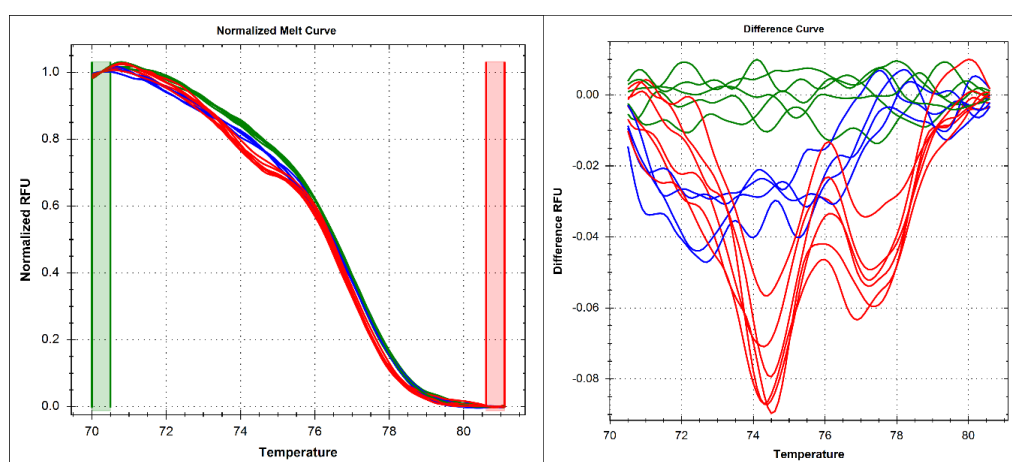
ความแตกต่างของแต่ละจีโนไทป์ที่ได้จากการทำ HRM ได้แก่  $T_m$  และรูปแบบ melt curve โดย  $T_m$  ของจีโนไทป์ CC จีโนไทป์ CT และจีโนไทป์ TT มีค่าเท่ากับ 78.0°C, 77.4°C และ 77.2°C ตามลำดับ รูปแบบ melt curve ได้จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Precision Melt Analysis™ software จากรูปที่ 3 แสดงให้เห็นรูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) เส้นกราฟแต่ละสี เป็นรูปแบบของแต่ละจีโนไทป์ โดย สีน้ำเงิน คือ จีโนไทป์ CC สีแดง คือ จีโนไทป์ CT และสีเขียว คือ จีโนไทป์ TT



รูปที่ 3 รูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) ของ rs1871054 โดย สีน้ำเงิน คือ จีโนไทป์ CC สีแดง คือ จีโนไทป์ CT และสีเขียว คือ จีโนไทป์ TT

### rs3740199

ผลที่ได้จากการทำ HRM ของ rs3740199 สามารถระบุจีโนไทป์ได้ในทำนองเดียวกันกับการระบุจีโนไทป์ของ rs1871054 โดย  $T_m$  ของจีโนไทป์ GG จีโนไทป์ GC และจีโนไทป์ CC มีค่าเท่ากับ 77.2°C, 76.8°C และ 77.0°C ตามลำดับ รูปแบบ melt curve ได้จากการวิเคราะห์โดยโปรแกรม Precision Melt Analysis™ software จากรูปที่ 4 แสดงให้เห็นรูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) เส้นกราฟแต่ละสี เป็นรูปแบบของแต่ละจีโนไทป์ โดย สีน้ำเงิน คือ จีโนไทป์ GG สีแดง คือ จีโนไทป์ GC และสีเขียว คือ จีโนไทป์ CC

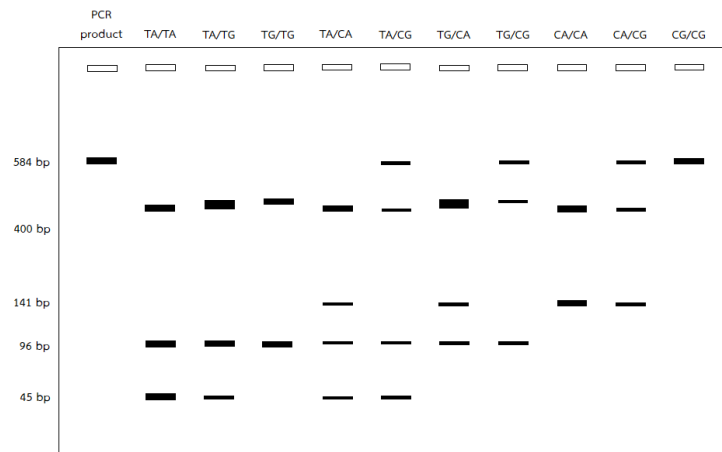


รูปที่ 4 รูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) ของ rs3740199 โดย สีน้ำเงิน คือ จีโนไทป์ GG สีแดง คือ จีโนไทป์ GC และสีเขียว คือ จีโนไทป์ CC

### rs2234693 และ rs9340799

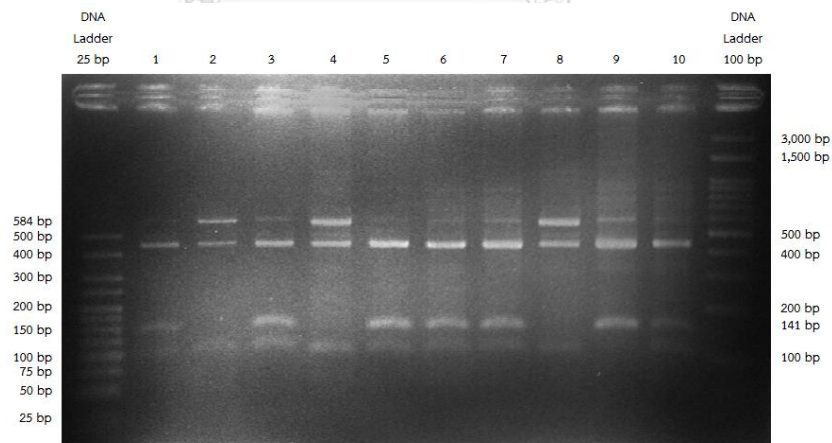
จากการทำพีซีอาร์และเจลอิลีกโทรฟอรีซิส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 584 bp ถูกต้องตามการออกแบบไพรเมอร์ และหลังจากการบมเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* (สำหรับ rs2234693) และ *XbaI* (สำหรับ rs9340799) กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้วตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเจลอิลีกโทรฟอรีซิส ทำให้ได้รูปแบบจีโนไทป์ ดังรูปที่ 5





รูปที่ 5 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs2234693 และ rs9340799 จากกระบวนการ PCR-RFLP

พิจารณาการตัดของเอนไซม์ที่ละตำแหน่ง โดย *PvuII* สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตำแหน่ง rs2234693 แอลลีล T ได้เป็นดีเอ็นเอขนาด 96 bp และ 488 bp ส่วน *XbaI* สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตำแหน่ง rs9340799 แอลลีล A ได้เป็นดีเอ็นเอขนาด 141 bp และ 443 bp สำหรับกรณีที่เอนไซม์สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ทั้งสองตำแหน่ง ผลที่ได้ คือ ดีเอ็นเอขนาด 45 bp 96 bp และ 443 bp โดยผลจากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ไม่สามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอขนาด 443 bp และ 488 bp ออกจากกันได้ ทำให้เห็นเพียงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 400-500 bp เท่านั้น (รูปที่ 6)

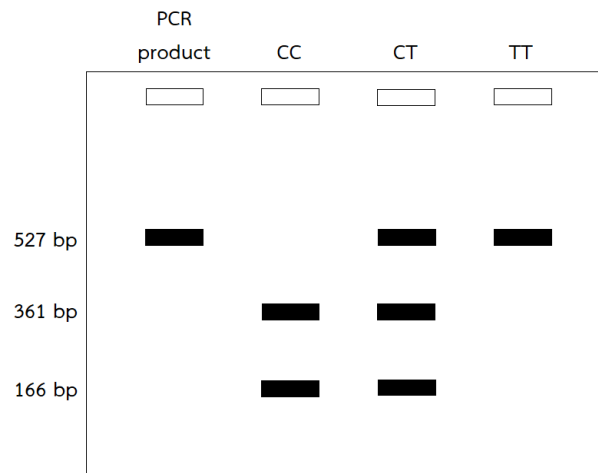


รูปที่ 6 ผล PCR-RFLP ของ rs2234693 และ rs9340799

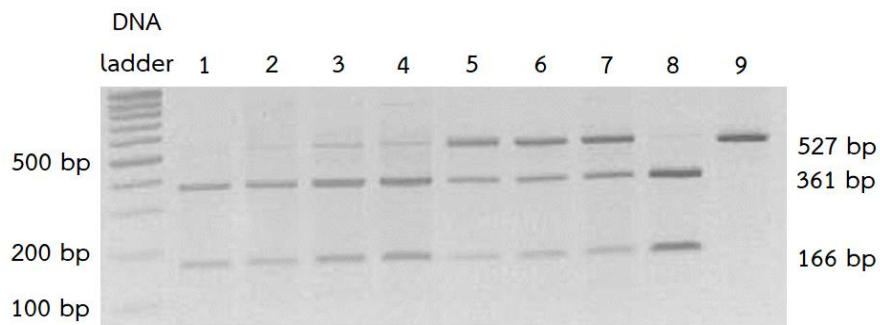
โดย สามารถแปลผลได้ดังนี้ 1 คือ จีโนไทป์ TG/CA 2 คือ จีโนไทป์ TA/CG 3 คือ จีโนไทป์ TG/CA 4 คือ จีโนไทป์ TG/CG 5 คือ จีโนไทป์ TG/CA 6 คือ จีโนไทป์ TG/CA 7 คือ จีโนไทป์ TG/CA 8 คือ จีโนไทป์ TG/CG 9 คือ จีโนไทป์ CA/CA 10 คือ จีโนไทป์ TG/CA

## rs8044769

จากการทำพีซีอาร์และเจลิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 527 bp ถูกตัดตามการออกแบบไพรเมอร์ และหลังจากการบ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsmFI* กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยเอนไซม์ *BsmFI* สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตำแหน่ง rs8044769 แอลลิล C ได้เป็นดีเอ็นเอขนาด 166 bp และ 361 bp เมื่อตรวจสอบด้วยเจลิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ได้รูปแบบจีโนไทป์ ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs8044769 จากเจลิเล็กโทรโฟรีซิส ผลการทำการทดลองจริง ให้ผลดังรูปที่ 8

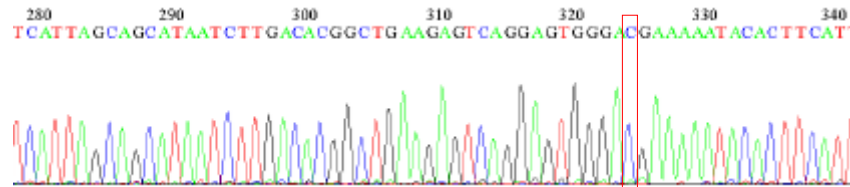


รูปที่ 8 ผลเจลิเล็กโทรโฟรีซิสของ rs8044769

โดย สามารถแปลผลได้ดังนี้ 1 คือ จีโนไทป์ CC 2 คือ จีโนไทป์ CC  
3 คือ จีโนไทป์ CC 4 คือ จีโนไทป์ CC 5 คือ จีโนไทป์ CT  
6 คือ จีโนไทป์ CT 7 คือ จีโนไทป์ CT 8 คือ จีโนไทป์ CC  
9 คือ จีโนไทป์ TT

(ได้รับความเอื้อเฟื้อมาจากนางสาววิรัชญา เพ็ชรสม)

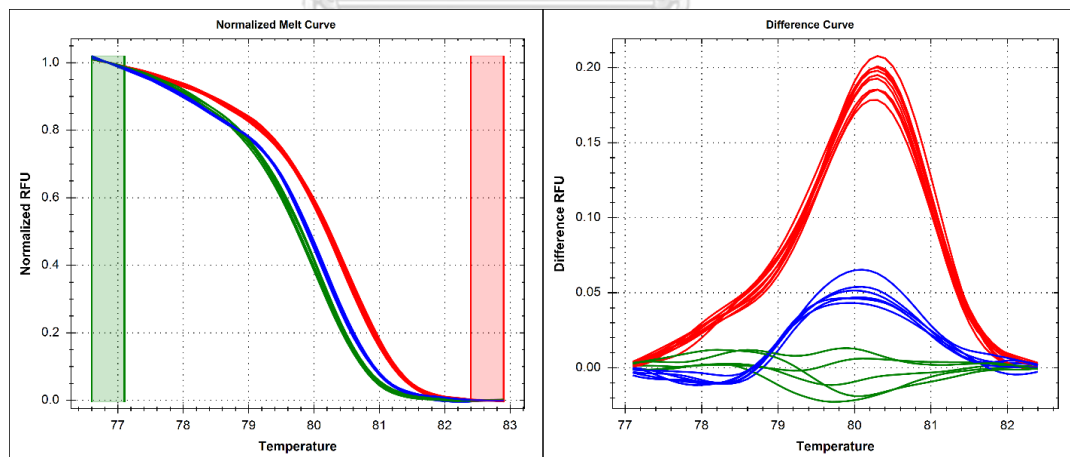
ในกรณีที่ตัวอย่างดีเอ็นเอมีผลจากการระบุจีโนไทป์ไม่ชัดเจน ตัวอย่างดีเอ็นเอนั้นต้องได้รับการยืนยันความถูกต้องของจีโนไทป์ด้วยวิธี sequencing ยกตัวอย่างเช่น ตัวอย่างที่ 3 ของรูปที่ 8 ถูกยืนยันจีโนไทป์ให้ผลดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ผลจีโนไทป์ของตำแหน่ง rs8044769 ที่ได้จากวิธี sequencing ของตัวอย่างที่ 3 ของรูปที่ 8 (ในกรอบสีแดง)

### rs143383

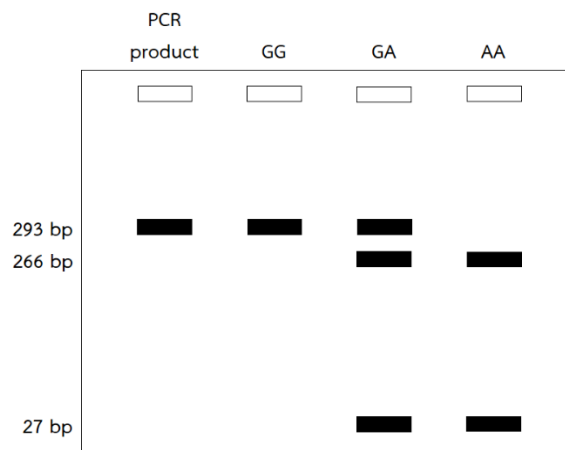
ผลที่ได้จากการทำ HRM ของ rs143383 สามารถระบุจีโนไทป์ได้ในทำนองเดียวกันกับการระบุจีโนไทป์ของ rs1871054 และ rs3740199 โดย  $T_m$  ของจีโนไทป์ CC จีโนไทป์ CT และจีโนไทป์ TT มีค่าเท่ากับ 80.4°C, 80.2°C และ 80.0°C ตามลำดับ จากรูปที่ 10 แสดงให้เห็นรูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) โดย สีแดง คือ จีโนไทป์ CC สีน้ำเงิน คือ จีโนไทป์ CT และสีเขียว คือ จีโนไทป์ TT



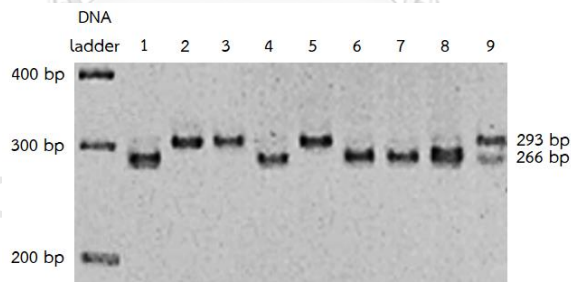
รูปที่ 10 รูปแบบ normalized melt curve (ซ้าย) และ difference curve (ขวา) ของ rs143383 โดย สีแดง คือ จีโนไทป์ CC สีน้ำเงิน คือ จีโนไทป์ CT และสีเขียว คือ จีโนไทป์ TT

### rs12901499

จากการทำพีซีอาร์และเจลอิลีกโทรฟอร์ซิส พบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 293 bp ถูกต้องตามการออกแบบไพรเมอร์ และหลังจากการบ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo*II กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ โดยเอนไซม์ *Mbo*II สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ตำแหน่ง rs12901499 แอลลิล A ได้เป็นดีเอ็นเอขนาด 27 bp และ 266 bp เมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเจลอิลีกโทรฟอร์ซิส ทำให้ได้รูปแบบจีโนไทป์ ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 รูปแบบจีโนไทป์ของ rs12901499 จากเจลอิลีกโทรฟอร์ซิส ผลการทำการทดลองจริง ให้ผลดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 ผลเจลอิลีกโทรฟอร์ซิสของ rs12901499

โดย สามารถแปลผลได้ดังนี้ 1 คือ จีโนไทป์ AA 2 คือ จีโนไทป์ GG  
 3 คือ จีโนไทป์ GG 4 คือ จีโนไทป์ AA 5 คือ จีโนไทป์ GG  
 6 คือ จีโนไทป์ AA 7 คือ จีโนไทป์ AA 8 คือ จีโนไทป์ AA  
 9 คือ จีโนไทป์ GA

(อัศวินท์ แจ้งสว่าง, 2558)

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการทดสอบสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่าการกระจายของจีโนไทป์ของ rs143383 และ rs12901499 เบี่ยงเบนไปจากสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ในขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรมอีก 5 ตำแหน่ง มีการกระจายของจีโนไทป์อยู่ในสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ( $P > 0.05$ ) ทั้งในประชากรทั้งหมด ในกลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม และในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 12) อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายพันธุกรรมที่มีการกระจายของจีโนไทป์อยู่ในสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กเท่านั้นที่ได้รับการวิเคราะห์ทางสถิติอื่น ๆ ต่อไป

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

	Common homozygotes	Heterozygotes	Rare Homozygotes	Chi-squared	P-value*
<b>rs1871054</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>		
ประชากรทั้งหมด	91	157	59	0.36	0.549
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	53	72	31	0.53	0.467
กลุ่มควบคุม	38	85	28	2.58	0.108
<b>rs3740199</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>		
ประชากรทั้งหมด	74	146	85	0.52	0.471
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	37	75	39	0.01	0.920
กลุ่มควบคุม	37	71	46	0.86	0.354
<b>rs2234693</b>	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>		
ประชากรทั้งหมด	92	177	64	1.66	0.198
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	56	96	21	4.27	0.039*
กลุ่มควบคุม	36	81	43	0.03	0.862
<b>rs9340799</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>		
ประชากรทั้งหมด	132	147	48	0.46	0.498
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	95	64	14	0.47	0.493
กลุ่มควบคุม	37	83	34	0.94	0.332

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบสมมูลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (ต่อ)

	Common homozygotes	Heterozygotes	Rare Homozygotes	Chi-squared	P-value*
<b>rs8044769</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>		
ประชากรทั้งหมด	141	132	38	0.67	0.413
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	64	74	20	0.04	0.841
กลุ่มควบคุม	77	58	18	1.83	0.176
<b>rs143383</b>	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>		
ประชากรทั้งหมด	73	105	141	30.73	<0.00001*
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	39	51	79	21.98	<0.00001*
กลุ่มควบคุม	34	54	62	9.68	0.002*
<b>rs12901499</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b>	<b>AA</b>		
ประชากรทั้งหมด	96	124	86	10.89	<0.001*
กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	58	54	42	13.05	<0.001*
กลุ่มควบคุม	38	70	44	0.91	0.340

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ความเป็นอิสระกันของเครื่องหมายพันธุกรรมถูกทดสอบด้วยไคสแควร์ โดยการทดสอบเครื่องหมายพันธุกรรมทีละคู่ พบว่าส่วนใหญ่เครื่องหมายพันธุกรรมเป็นอิสระต่อกัน ยกเว้น คู่ของ rs1871054 กับ rs2234693 และ คู่ของ rs2234693 กับ rs9340799 ที่มีความไม่อิสระต่อกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ความเป็นอิสระกันของเครื่องหมายพันธุกรรม

P-value*	rs3740199	rs2234693	rs9340799	rs8044769
rs1871054	0.471	0.011*	0.358	0.533
rs3740199		0.107	0.674	0.807
rs2234693			0.002*	0.869
rs9340799				0.392

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม ถูกวิเคราะห์ตาม genetic model ได้แก่ allele model (A vs. B) additive model (AA vs. BB และ AB vs. BB) dominant model (AA+AB vs. BB) และ recessive model (AA vs. AB+BB)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs1871054 ในประชากรทั้งหมด (ตารางที่ 14) ไม่พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมนี้กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง (ตารางที่ 15-16) พบว่า มีความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ CT กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเฉพาะในเพศหญิงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 0.56, 95% CI = 0.31-0.99,  $P = 0.048$ )

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ของ rs1871054 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=156	กลุ่มควบคุม n=151	OR (95% CI)	P-value*
allele model	T	134 (42.9%)	141 (46.7%)	0.86 (0.63-1.18)	0.352
	C <sup>a</sup>	178 (57.1%)	161 (53.3%)		
additive model	TT	31 (19.9%)	28 (18.5%)	0.79 (0.41-1.53)	0.492
	CC <sup>a</sup>	53 (34.0%)	38 (25.2%)		
additive model	CT	72 (46.1%)	85 (56.3%)	0.61 (0.36-1.02)	0.061
	CC <sup>a</sup>	53 (34.0%)	38 (25.2%)		
dominant model	CT+TT	103 (66.0%)	113 (74.8%)	0.65 (0.40-1.07)	0.092
	CC <sup>a</sup>	53 (34.0%)	38 (25.2%)		
recessive model	TT	31 (19.9%)	28 (18.5%)	1.09 (0.62-1.92)	0.768
	(CT+CC) <sup>a</sup>	125 (80.1%)	123 (81.5%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ของ rs1871054 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=132	กลุ่มควบคุม n=116	OR (95% CI)	P-value*
allele model	T	112 (42.4%)	106 (45.7%)	0.88 (0.61-1.25)	0.465
	C <sup>a</sup>	152 (57.6%)	126 (54.3%)		
additive model	TT	26 (19.7%)	19 (16.4%)	0.86 (0.41-1.83)	0.700
	CC <sup>a</sup>	46 (34.8%)	29 (25.0%)		
additive model	CT	60 (45.5%)	68 (58.6%)	0.56 (0.31-0.99)	0.048*
	CC <sup>a</sup>	46 (34.8%)	29 (25.0%)		
dominant model	CT+TT	86 (65.2%)	87 (75.0%)	0.62 (0.36-1.08)	0.093
	CC <sup>a</sup>	46 (34.8%)	29 (25.0%)		
recessive model	TT	26 (19.7%)	19 (16.4%)	1.25 (0.65-2.40)	0.499
	(CT+CC) <sup>a</sup>	106 (80.3%)	97 (83.6%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ของ rs1871054 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=24	กลุ่มควบคุม n=35	OR (95% CI)	P-value*
allele model	T	22 (45.8%)	35 (50.0%)	0.85 (0.41-1.77)	0.657
	C <sup>a</sup>	26 (54.2%)	35 (50.0%)		
additive model	TT	5 (20.8%)	9 (25.7%)	0.71 (0.16-3.12)	0.654
	CC <sup>a</sup>	7 (29.2%)	9 (25.7%)		
additive model	CT	12 (50.0%)	17 (48.6%)	0.91 (0.26-3.12)	0.878
	CC <sup>a</sup>	7 (29.2%)	9 (25.7%)		
dominant model	CT+TT	17 (70.8%)	26 (74.3%)	0.84 (0.26-2.69)	0.770
	CC <sup>a</sup>	7 (29.2%)	9 (25.7%)		
recessive model	TT	5 (20.8%)	9 (25.7%)	0.76 (0.22-2.64)	0.666
	(CT+CC) <sup>a</sup>	19 (79.2%)	26 (74.3%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs3740199 ในประชากรทั้งหมด (ตารางที่ 17) ไม่พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมนี้กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง (ตารางที่ 18-19) พบว่า ทั้งแอลลีล C (OR = 2.48, 95% CI = 1.14-5.37,  $P = 0.022$ ) และจีโนไทป์ CC (OR = 4.89, 95% CI = 1.05-22.84,  $P = 0.044$ ) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเฉพาะในเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ของ rs3740199 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=151	กลุ่มควบคุม n=154	OR (95% CI)	P-value*
allele model	C	153 (50.7%)	163 (52.9%)	0.91 (0.66-1.26)	0.577
	G <sup>a</sup>	149 (49.3%)	145 (47.1%)		
additive model	CC	39 (25.8%)	46 (29.9%)	0.85 (0.45-1.58)	0.604
	GG <sup>a</sup>	37 (24.5%)	37 (24.0%)		
additive model	GC	75 (49.7%)	71 (46.1%)	1.06 (0.60-1.85)	0.848
	GG <sup>a</sup>	37 (24.5%)	37 (24.0%)		
dominant model	GC+CC	114 (75.5%)	117 (76.0%)	0.97 (0.58-1.64)	0.923
	GG <sup>a</sup>	37 (24.5%)	37 (24.0%)		
recessive model	CC	39 (25.8%)	46 (29.9%)	0.82 (0.49-1.35)	0.432
	(GC+GG) <sup>a</sup>	112 (74.2%)	108 (70.1%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 18 ความสัมพันธ์ของ rs3740199 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=127	กลุ่มควบคุม n=120	OR (95% CI)	P-value*
allele model	C	120 (47.2%)	131 (54.6%)	0.75 (0.52-1.06)	0.103
	G <sup>a</sup>	134 (52.8%)	109 (45.4%)		
additive model	CC	27 (21.2%)	37 (30.8%)	0.56 (0.27-1.14)	0.108
	GG <sup>a</sup>	34 (26.8%)	26 (21.7%)		
additive model	GC	66 (52.0%)	57 (47.5%)	0.89 (0.48-1.65)	0.701
	GG <sup>a</sup>	34 (26.8%)	26 (21.7%)		
dominant model	GC+CC	93 (73.2%)	94 (78.3%)	0.76 (0.42-1.36)	0.351
	GG <sup>a</sup>	34 (26.8%)	26 (21.7%)		
recessive model	CC	27 (21.2%)	37 (30.8%)	0.61 (0.34-1.08)	0.088
	(GC+GG) <sup>a</sup>	100 (78.8%)	83 (69.2%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ของ rs3740199 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม	OR	P-value*
		n=24	n=34	(95% CI)	
allele model	C	33 (68.8%)	32 (47.1%)	2.48 (1.14-5.37)	0.022*
	G <sup>a</sup>	15 (31.2%)	36 (52.9%)		
additive model	CC	12 (50.0%)	9 (26.5%)	4.89 (1.05-22.84)	0.044*
	GG <sup>a</sup>	3 (12.5%)	11 (32.3%)		
additive model	GC	9 (37.5%)	14 (41.2%)	2.36 (0.51-10.85)	0.271
	GG <sup>a</sup>	3 (12.5%)	11 (32.3%)		
dominant model	GC+CC	21 (87.5%)	23 (67.7%)	3.35 (0.82-13.67)	0.092
	GG <sup>a</sup>	3 (12.5%)	11 (32.3%)		
recessive model	CC	12 (50.0%)	9 (26.5%)	2.78 (0.92-8.39)	0.070
	(GC+GG) <sup>a</sup>	12 (50.0%)	25 (73.5%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs2234693 ในประชากรทั้งหมด (ตารางที่ 20) พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุก genetic model ยกเว้น additive model ของจีโนไทป์ TC และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง (ตารางที่ 21-22) พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเดียวกันนี้เฉพาะในเพศหญิงเท่านั้น

ตารางที่ 20 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=173	กลุ่มควบคุม n=160	OR (95%CI)	P-value*
allele model	C	138 (39.9%)	167 (52.2%)	0.61 (0.45-0.83)	0.002*
	T <sup>a</sup>	208 (60.1%)	153 (47.8%)		
additive model	CC	21 (12.1%)	43 (26.9%)	0.31 (0.16-0.61)	0.001*
	TT <sup>a</sup>	56 (32.4%)	36 (22.5%)		
additive model	TC	96 (55.5%)	81 (50.6%)	0.76 (0.46-1.27)	0.298
	TT <sup>a</sup>	56 (32.4%)	36 (22.5%)		
dominant model	TC+CC	117 (67.6%)	124 (77.5%)	0.61 (0.37-0.99)	0.045*
	TT <sup>a</sup>	56 (32.4%)	36 (22.5%)		
recessive model	CC	21 (12.1%)	43 (26.9%)	0.38 (0.21-0.67)	0.001*
	(TC+TT) <sup>a</sup>	152 (87.9%)	117 (73.1%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 21 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=144	กลุ่มควบคุม n=123	OR (95%CI)	P-value*
allele model	C	114 (39.6%)	131 (53.3%)	0.58 (0.41-0.81)	0.002*
	T <sup>a</sup>	174 (60.4%)	115 (46.7%)		
additive model	CC	16 (11.1%)	34 (27.6%)	0.27 (0.12-0.57)	0.001*
	TT <sup>a</sup>	46 (31.9%)	26 (21.1%)		
additive model	TC	82 (56.9%)	63 (51.2%)	0.74 (0.41-1.32)	0.302
	TT <sup>a</sup>	46 (31.9%)	26 (21.1%)		
dominant model	TC+CC	98 (68.1%)	97 (78.9%)	0.57 (0.33-1.00)	0.049*
	TT <sup>a</sup>	46 (31.9%)	26 (21.1%)		
recessive model	CC	16 (11.1%)	34 (27.6%)	0.33 (0.17-0.63)	0.001*
	(TC+TT) <sup>a</sup>	128 (88.9%)	89 (72.4%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ของ rs2234693 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย

genetic model	กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม		กลุ่มควบคุม	OR (95%CI)	P-value*
	n=29	n=37			
allele model	C	24 (41.4%)	36 (48.6%)	0.75 (0.37-1.49)	0.406
	T <sup>a</sup>	34 (58.6%)	38 (51.4%)		
additive model	CC	5 (17.2%)	9 (24.3%)	0.56 (0.14-2.26)	0.411
	TT <sup>a</sup>	10 (34.5%)	10 (27.0%)		
additive model	TC	14 (48.3%)	18 (48.7%)	0.78 (0.25-2.39)	0.660
	TT <sup>a</sup>	10 (34.5%)	10 (27.0%)		
dominant model	TC+CC	19 (65.5%)	27 (73.0%)	0.70 (0.25-2.02)	0.514
	TT <sup>a</sup>	10 (34.5%)	10 (27.0%)		
recessive model	CC	5 (17.2%)	9 (24.3%)	0.65 (0.19-2.20)	0.487
	(TC+TT) <sup>a</sup>	24 (82.8%)	28 (75.7%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs9340799 ในประชากรทั้งหมด (ตารางที่ 23) พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุก genetic model และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง (ตารางที่ 24-25) พบว่ามีความสัมพันธ์แบบเดียวกันนี้เฉพาะในเพศหญิงเท่านั้น และไม่พบความสัมพันธ์ใด ๆ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศชาย

ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=173	กลุ่มควบคุม n=154	OR (95%CI)	P-value*
allele model	G	92 (26.6%)	151 (49.0%)	0.38 (0.27-0.52)	<0.001*
	A <sup>a</sup>	254 (73.4%)	157 (51.0%)		
additive model	GG	14 (8.1%)	34 (22.1%)	0.16 (0.08-0.33)	<0.001*
	AA <sup>a</sup>	95 (54.9%)	37 (24.0%)		
additive model	AG	64 (37.0%)	83 (53.9%)	0.30 (0.18-0.50)	<0.001*
	AA <sup>a</sup>	95 (54.9%)	37 (24.0%)		
dominant model	AG+GG	78 (45.1%)	117 (76.0%)	0.26 (0.16-0.42)	<0.001*
	AA <sup>a</sup>	95 (54.9%)	37 (24.0%)		
recessive model	GG	14 (8.1%)	34 (22.1%)	0.31 (0.16-0.60)	<0.001*
	(AG+AA) <sup>a</sup>	159 (91.9%)	120 (77.9%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=144	กลุ่มควบคุม n=119	OR (95%CI)	P-value*
allele model	G	77 (26.7%)	126 (52.9%)	0.32 (0.23-0.47)	<0.001*
	A <sup>a</sup>	211 (73.3%)	112 (47.1%)		
additive model	GG	11 (7.6%)	29 (24.4%)	0.11 (0.05-0.25)	<0.001*
	AA <sup>a</sup>	78 (54.2%)	22 (18.5%)		
additive model	AG	55 (38.2%)	68 (57.1%)	0.23 (0.13-0.41)	<0.001*
	AA <sup>a</sup>	78 (54.2%)	22 (18.5%)		
dominant model	AG+GG	66 (45.8%)	97 (81.5%)	0.19 (0.11-0.34)	<0.001*
	AA <sup>a</sup>	78 (54.2%)	22 (18.5%)		
recessive model	GG	11 (7.6%)	29 (24.4%)	0.26 (0.12-0.54)	<0.001*
	(AG+AA) <sup>a</sup>	133 (92.4%)	90 (75.6%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 25 ความสัมพันธ์ของ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม	กลุ่มควบคุม	OR (95%CI)	P-value*
		n=29	n=35		
allele model	G	15 (25.9%)	25 (35.7%)	0.63 (0.29-1.35)	0.233
	A <sup>a</sup>	43 (74.1%)	45 (64.3%)		
additive model	GG	3 (10.4%)	5 (14.3%)	0.53 (0.11-2.60)	0.433
	AA <sup>a</sup>	17 (58.6%)	15 (42.9%)		
additive model	AG	9 (31.0%)	15 (42.9%)	0.53 (0.18-1.56)	0.248
	AA <sup>a</sup>	17 (58.6%)	15 (42.9%)		
dominant model	AG+GG	12 (41.4%)	20 (57.1%)	0.53 (0.20-1.44)	0.211
	AA <sup>a</sup>	17 (58.6%)	15 (42.9%)		
recessive model	GG	3 (10.4%)	5 (14.3%)	0.69 (0.15-3.18)	0.636
	(AG+AA) <sup>a</sup>	26 (89.6%)	30 (85.7%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ rs8044769 ในประชากรทั้งหมด (ตารางที่ 26) ไม่พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมนี้กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง (ตารางที่ 27-28) พบว่าจีโนไทป์ CT มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมเฉพาะในเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 3.62, 95% CI = 1.06-12.31,  $P = 0.039$ )

ตารางที่ 26 ความสัมพันธ์ของ rs8044769 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=158	กลุ่มควบคุม n=153	OR (95% CI)	P-value*
allele model	T	114 (36.1%)	94 (30.7%)	1.27 (0.91-1.78)	0.157
	C <sup>a</sup>	202 (63.9%)	212 (69.3%)		
additive model	TT	20 (12.7%)	18 (11.8%)	1.34 (0.65-2.74)	0.428
	CC <sup>a</sup>	64 (40.5%)	77 (50.3%)		
additive model	CT	74 (46.8%)	58 (37.9%)	1.54 (0.95-2.47)	0.079
	CC <sup>a</sup>	64 (40.5%)	77 (50.3%)		
dominant model	CT+TT	94 (59.5%)	76 (49.7%)	1.49 (0.95-2.33)	0.083
	CC <sup>a</sup>	64 (40.5%)	77 (50.3%)		
recessive model	TT	20 (12.7%)	18 (11.8%)	1.09 (0.55-2.14)	0.810
	(CT+CC) <sup>a</sup>	138 (87.3%)	135 (88.2%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 27 ความสัมพันธ์ของ rs8044769 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศหญิง

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=135	กลุ่มควบคุม n=120	OR (95% CI)	P-value*
allele model	T	94 (34.8%)	75 (31.3%)	1.18 (0.81-1.70)	0.394
	C <sup>a</sup>	176 (65.2%)	165 (68.7%)		
additive model	TT	16 (11.9%)	13 (10.8%)	1.25 (0.55-2.84)	0.590
	CC <sup>a</sup>	57 (42.2%)	58 (48.3%)		
additive model	CT	62 (45.9%)	49 (40.8%)	1.29 (0.76-2.17)	0.344
	CC <sup>a</sup>	57 (42.2%)	58 (48.3%)		
dominant model	CT+TT	78 (57.8%)	62 (51.7%)	1.28 (0.78-2.10)	0.328
	CC <sup>a</sup>	57 (42.2%)	58 (48.3%)		
recessive model	TT	16 (11.9%)	13 (10.8%)	1.11 (0.51-2.41)	0.798
	(CT+CC) <sup>a</sup>	119 (88.1%)	107 (89.2%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 28 ความสัมพันธ์ของ rs8044769 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรเพศชาย

genetic model		กลุ่มผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม n=23	กลุ่มควบคุม n=33	OR (95% CI)	P-value*
allele model	T	20 (43.5%)	19 (28.8%)	1.90 (0.86-4.19)	0.110
	C <sup>a</sup>	26 (56.5%)	47 (71.2%)		
additive model	TT	4 (17.4%)	5 (15.2%)	2.17 (0.45-10.49)	0.335
	CC <sup>a</sup>	7 (30.4%)	19 (57.6%)		
additive model	CT	12 (52.2%)	9 (27.2%)	3.62 (1.06-12.31)	0.039*
	CC <sup>a</sup>	7 (30.4%)	19 (57.6%)		
dominant model	CT+TT	16 (69.6%)	14 (42.4%)	3.10 (1.01-9.55)	0.049
	CC <sup>a</sup>	7 (30.4%)	19 (57.6%)		
recessive model	TT	4 (17.4%)	5 (15.2%)	1.18 (0.28-4.97)	0.823
	(CT+CC) <sup>a</sup>	19 (82.6%)	28 (84.8%)		

<sup>a</sup>จีโนไทป์หรือแอลลีลที่ใช้อ้างอิงในการวิเคราะห์

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### การสร้างแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกด้วยวิธี Enter พบว่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร มีค่าแสดงดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกด้วยวิธี Enter

ตัวแปร	สัมประสิทธิ์ ของตัวแปร	S.E.	Wald	df	P-value*
fto	-0.186	0.379	0.242	1	0.623
adam374	-0.014	0.333	0.002	1	0.966
adam187	-0.416	0.351	1.399	1	0.237
pvuii	-0.350	0.341	1.055	1	0.304
xbai	-0.940	0.354	7.064	1	0.008*
sex	-1.186	0.719	2.722	1	0.099
age	0.280	0.037	56.100	1	<0.001*
wt	-0.200	0.260	0.594	1	0.441
ht	0.176	0.217	0.652	1	0.419
bmi	0.525	0.628	0.698	1	0.403
ค่าคงที่	-43.977	34.303	1.644	1	0.200

เมื่อตัวแปร fto แทน จีโนไทป์ของ rs8044769, adam374 แทน จีโนไทป์ของ rs3740199, adam187 แทน จีโนไทป์ของ rs1871054, pvuii แทน จีโนไทป์ของ rs2234693, xbai แทน จีโนไทป์ของ rs9340799, sex แทน เพศ, age แทน อายุ, wt แทน น้ำหนัก, ht แทน ส่วนสูง และ bmi แทน ค่าดัชนีมวลกาย

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากตารางที่ 29 สามารถสรุปแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกด้วยวิธี Enter ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$p = \frac{e^{(-43.977 - 0.186fto - 0.014adam374 - 0.416adam187 - 0.350pvuii - 0.940xbai - 1.186sex + 0.280age - 0.200wt + 0.176ht + 0.525bmi)}}{1 + e^{(-43.977 - 0.186fto - 0.014adam374 - 0.416adam187 - 0.350pvuii - 0.940xbai - 1.186sex + 0.280age - 0.200wt + 0.176ht + 0.525bmi)}}$$

โดย เมื่อ p	แทน ค่าความน่าจะเป็นในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม
fto	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs8044769
adam374	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs3740199
adam187	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs1871054
pvuii	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs2234693
xbai	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs9340799
sex	แทน ค่าของข้อมูลเพศ
age	แทน อายุตามจริง
wt	แทน น้ำหนักตามจริง
ht	แทน ส่วนสูงตามจริง
bmi	แทน ค่าดัชนีมวลกายตามจริง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Enter พบว่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร มีค่าแสดงดังตารางที่ 30

ตารางที่ 30 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี

Enter

ตัวแปร	สัมประสิทธิ์ ของตัวแปร	S.E.	Wald	df	P-value*
sex	-0.992	0.702	1.997	1	0.158
age	0.290	0.037	62.784	1	<0.001*
wt	-0.264	0.244	1.172	1	0.279
ht	0.225	0.201	1.253	1	0.263
bmi	0.685	0.588	1.357	1	0.244
ค่าคงที่	-53.988	31.695	2.901	1	0.089

เมื่อตัวแปร sex แทน เพศ, age แทน อายุ, wt แทน น้ำหนัก, ht แทน ส่วนสูง และ bmi แทน ค่าดัชนีมวลกาย

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากตารางที่ 30 สามารถสรุปแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี  
Enter ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$p = \frac{e^{(-53.988 - 0.992sex + 0.290age - 0.264wt + 0.225ht + 0.685bmi)}}{1 + e^{(-53.988 - 0.992sex + 0.290age - 0.264wt + 0.225ht + 0.685bmi)}}$$

โดย เมื่อ p	แทน ค่าความน่าจะเป็นในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม
sex	แทน ค่าของข้อมูลเพศ
age	แทน อายุตามจริง
wt	แทน น้ำหนักตามจริง
ht	แทน ส่วนสูงตามจริง
bmi	แทน ค่าดัชนีมวลกายตามจริง



จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Enter พบว่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร มีค่าแสดงดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Enter

ตัวแปร	สัมประสิทธิ์ ของตัวแปร	S.E.	Wald	df	P-value*
fto	0.016	0.220	0.005	1	0.942
adam374	0.017	0.210	0.007	1	0.935
adam187	-0.470	0.225	4.369	1	0.037*
pvuii	-0.566	0.218	6.757	1	0.009*
xbai	-1.131	0.239	22.391	1	<0.001*
ค่าคงที่	1.529	0.461	11.007	1	0.001*

เมื่อตัวแปร fto แทน จีโนไทป์ของ rs8044769, adam374 แทน จีโนไทป์ของ rs3740199, adam187 แทน จีโนไทป์ของ rs1871054, pvuii แทน จีโนไทป์ของ rs2234693 และ xbai แทน จีโนไทป์ของ rs9340799

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากตารางที่ 31 สามารถสรุปแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว ด้วยวิธี Enter ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$p = \frac{e^{(1.529+0.016fto+0.017adam374-0.470adam187-0.566pvuii-1.131xbai)}}{1 + e^{(1.529+0.016fto+0.017adam374-0.470adam187-0.566pvuii-1.131xbai)}}$$

โดย เมื่อ p	แทน ค่าความน่าจะเป็นในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม
fto	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs8044769
adam374	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs3740199
adam187	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs1871054
pvuii	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs2234693
xbai	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs9340799

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) พบว่าแบบจำลองทำนายที่ดีที่สุดเกิดจากข้อมูลจีโนไทป์ของ rs9340799 (xbai) ข้อมูลเพศ (sex) และอายุ (age) สัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปร มีค่าแสดงดังตารางที่ 32

ตารางที่ 32 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก ด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald)

ตัวแปร	สัมประสิทธิ์ ของตัวแปร	S.E.	Wald	df	P-value*
xbai	-0.928	0.337	7.572	1	0.006*
sex	-1.277	0.609	4.404	1	0.036*
age	0.277	0.036	58.444	1	<0.001*
ค่าคงที่	-16.267	2.163	56.574	1	<0.001*

เมื่อตัวแปร xbai แทน จีโนไทป์ของ rs9340799, sex แทน เพศ และ age แทน อายุ

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากตารางที่ 32 สามารถสรุปแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$p = \frac{e^{(-16.267-0.928xbai-1.277sex+0.277age)}}{1 + e^{(-16.267-0.928xbai-1.277sex+0.277age)}}$$

โดย เมื่อ p	แทน ค่าความน่าจะเป็นในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม
xbai	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs9340799
sex	แทน ค่าของข้อมูลเพศ
age	แทน อายุตามจริง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) พบว่าแบบจำลองทำนายที่ดีที่สุดเกิดจากข้อมูลอายุ (age) เท่านั้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรแสดงดังตารางที่ 33

ตารางที่ 33 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald)

ตัวแปร	สัมประสิทธิ์ ของตัวแปร	S.E.	Wald	df	P-value*
age	0.283	0.035	63.588	1	<0.001*
ค่าคงที่	-17.547	2.138	67.328	1	<0.001*

เมื่อตัวแปร age แทน อายุ

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากตารางที่ 33 สามารถสรุปแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$p = \frac{e^{(-17.547+0.283age)}}{1 + e^{(-17.547+0.283age)}}$$

โดย เมื่อ p แทน ค่าความน่าจะเป็นในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม  
age แทน อายุตามจริง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) พบว่าแบบจำลองทำนายที่ดีที่สุดเกิดจากข้อมูลจีโนไทป์ของ rs1871054 (adam187) rs2234693 (pvuiii) และ rs9340799 (xbai) สัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปร มีค่าแสดงดังตารางที่ 34

ตารางที่ 34 สัมประสิทธิ์ของตัวแปรที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald)

ตัวแปร	สัมประสิทธิ์ ของตัวแปร	S.E.	Wald	df	P-value*
adam187	-0.472	0.223	4.463	1	0.035*
pvuiii	-0.566	0.217	6.764	1	0.009*
xbai	-1.130	0.239	22.379	1	<0.001*
ค่าคงที่	1.557	0.378	16.966	1	<0.001*

เมื่อตัวแปร adam187 แทน จีโนไทป์ของ rs1871054, pvuiii แทน จีโนไทป์ของ rs2234693 และ xbai แทน จีโนไทป์ของ rs9340799

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากตารางที่ 34 สามารถสรุปแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว ด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) ได้ตั้งสมการต่อไปนี้

$$p = \frac{e^{(1.557-0.472adam187-0.566pvuii-1.130xbai)}}{1 + e^{(1.557-0.472adam187-0.566pvuii-1.130xbai)}}$$

โดย เมื่อ p	แทน ค่าความน่าจะเป็นในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม
adam187	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs1871054
pvuii	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs2234693
xbai	แทน ค่าของจีโนไทป์ของ rs9340799

นอกจากนี้ ผลจากการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก สามารถประเมินค่า sensitivity และ specificity ของแบบจำลองทำนายได้ดังตารางที่ 35

ตารางที่ 35 ค่า sensitivity และ specificity ของแบบจำลองทำนาย

วิธีการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก	ข้อมูลที่ใช้สร้างแบบจำลองทำนาย	ค่า sensitivity (%)	ค่า specificity (%)
วิธี Enter	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก	82.2	91.3
	สร้างจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว	81.2	92.9
	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว	57.4	84.9
วิธี Forward Stepwise (Wald)	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก	82.2	91.3
	สร้างจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว	80.2	94.4
	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว	57.4	84.9

### การประเมินแบบจำลองทำนาย

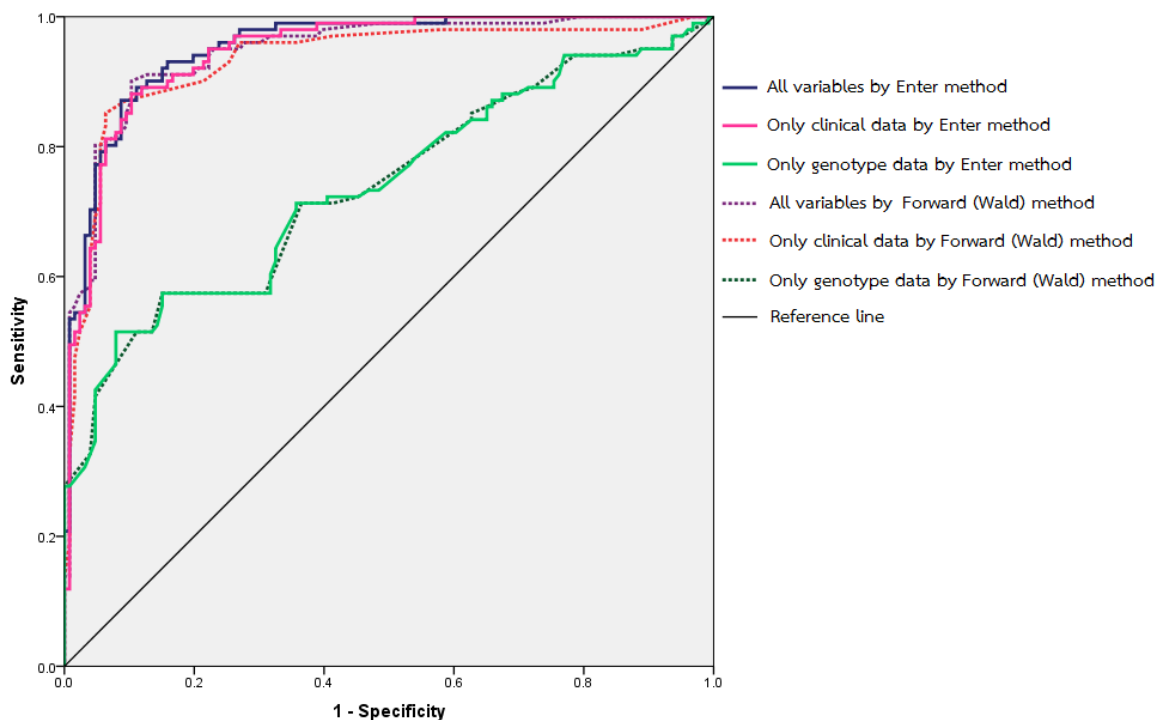
จากการทดสอบ Hosmer and Lemeshow test พบว่า แบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกด้วยวิธี Enter และวิธี Forward Stepwise (Wald) กับแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) แสดงให้เห็นว่า ผลที่ได้จากการทำนายไม่แตกต่างจากข้อมูลตามจริงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 36)

ตารางที่ 36 Hosmer and Lemeshow test ของแบบจำลองทำนาย

วิธีการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก	ข้อมูลที่ใช้สร้างแบบจำลองทำนาย	$\chi^2$	df	P-value*
วิธี Enter	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก	7.058	8	0.530
	สร้างจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว	18.751	8	0.016*
	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว	18.855	8	0.016*
วิธี Forward Stepwise (Wald)	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก	8.020	8	0.432
	สร้างจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว	12.905	8	0.115
	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว	31.053	7	<0.001*

\*มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

กราฟ receiver operating characteristic (ROC) ถูกสร้างขึ้นจากการวิเคราะห์ค่าความน่าจะเป็นที่ได้จากการใช้แบบจำลองทำนายแต่ละแบบ (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 กราฟ receiver operating characteristic (ROC) ของแบบจำลองทำนายทั้งหมด  
 ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC สามารถประเมินความสามารถในการทำนายของแต่ละแบบจำลอง  
 ทำนายได้ (ตารางที่ 37) โดยค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากแบบจำลองทำนายทั้งหมดมีความแตกต่างกับค่า  
 อ้างอิงที่เท่ากับ 0.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 37 ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC ของแบบจำลองทำนาย

วิธีการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก	ข้อมูลที่ใช้สร้างแบบจำลองทำนาย	ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC (95% CI)	S.E.	P-value*
วิธี Enter	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก	0.952 (0.927-0.978)	0.013	<0.001*
	สร้างจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว	0.946 (0.918-0.973)	0.014	<0.001*
	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว	0.737 (0.671-0.804)	0.034	<0.001*
วิธี Forward Stepwise (Wald)	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก	0.945 (0.916-0.974)	0.015	<0.001*
	สร้างจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว	0.932 (0.896-0.968)	0.018	<0.001*
	สร้างจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว	0.737 (0.671-0.804)	0.034	<0.001*

\*ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC มีความแตกต่างกับค่า 0.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการเปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC ของแบบจำลองทำนายที่ละคู่ แสดงดังตารางที่ 38 พบว่าค่าพื้นที่ใต้กราฟของแบบจำลองจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวมีความแตกต่างจากค่าพื้นที่ใต้กราฟของแบบจำลองที่มาจากข้อมูลอีกสองแบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Enter และวิธี Forward Stepwise (Wald) ในขณะที่ค่าพื้นที่ใต้กราฟของแบบจำลองจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก ไม่มีความแตกต่างจากค่าพื้นที่ใต้กราฟของแบบจำลองที่มาจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Enter และวิธี Forward Stepwise (Wald)



ตารางที่ 38 ทดสอบความแตกต่างของค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC ด้วย Z-test

ค่า Z (P-value*)	2	3	4	5	6
1	0.871 (0.384)	6.162 (<0.001*)	0.645 (0.519)	0.038 (0.970)	6.151 (<0.001*)
2		5.217 (<0.001*)	1.288 (0.198)	1.043 (0.297)	5.208 (<0.001*)
3			6.560 (<0.001*)	5.711 (<0.001*)	0.002 (0.998)
4				0.523 (0.601)	6.548 (<0.001*)
5					5.701 (<0.001*)

เมื่อ (1) แทน แบบจำลองจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก (วิธี Enter)

(2) แทน แบบจำลองจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว (วิธี Enter)

(3) แทน แบบจำลองจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว (วิธี Enter)

(4) แทน แบบจำลองจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก (วิธี Forward (Wald))

(5) แทน แบบจำลองจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว (วิธี Forward (Wald))

(6) แทน แบบจำลองจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว (วิธี Forward (Wald))

\*ค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการศึกษา

ในการศึกษานี้ มีบางตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไม่สามารถระบุจีโนไทป์ได้ครบทุกเครื่องหมายพันธุกรรม เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างเหล่านั้นมีอยู่น้อย จึงไม่เพียงพอต่อการระบุจีโนไทป์ให้ครบทั้ง 7 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ถูกระบุจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรมมีจำนวนไม่น้อยกว่า 150 ตัวอย่างต่อกลุ่ม โดยวิธีการระบุจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายพันธุกรรมถูกทำด้วยวิธี HRM หรือวิธี PCR-RFLP ซึ่งวิธี HRM มีพื้นฐานการระบุจีโนไทป์มาจากการทำ real-time PCR ทำให้สามารถระบุจีโนไทป์ได้อย่างรวดเร็ว เหมาะสมกับการศึกษาประชากรที่มีขนาดใหญ่ แต่วิธีนี้จำเป็นต้องใช้โปรแกรมเฉพาะสำหรับการวิเคราะห์ melt profile ในขณะที่วิธี PCR-RFLP เป็นวิธีการที่ไม่จำเป็นต้องใช้โปรแกรมเฉพาะใด ๆ ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ แต่ข้อเสียของวิธีการนี้ คือ เป็นวิธีที่ต้องลงทุนด้วยแรงและเวลาเป็นอย่างมาก จึงไม่เหมาะสมกับการศึกษาประชากรที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากวิธี HRM มีความไวสูง มีความสามารถในการระบุความแตกต่างของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียงนิวคลีโอไทด์เดียวได้ (Reed et al., 2007) ข้อเสียเปรียบของวิธีการนี้คือ วิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับการระบุจีโนไทป์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มี SNP หลายตำแหน่งอยู่ด้วยกัน เพราะความแตกต่างของ SNP หลายตำแหน่งที่อยู่ใกล้กัน อาจส่งผลให้รูปแบบ melt profile ที่ได้มีความซับซ้อนและยากต่อการแปลผลจีโนไทป์ ในขณะที่วิธี PCR-RFLP สามารถระบุจีโนไทป์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มี SNP หลายตำแหน่งอยู่ด้วยกันได้ภายในปฏิกิริยาเดียว ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้วิธี double digestion ข้อเสียเปรียบของวิธี double digestion คือ การออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถให้ผลที่ชัดเจนจากการบ่มเอนไซม์สองชนิด และความซับซ้อนของการแปลผลจีโนไทป์ (Chuang et al., 2008) ซึ่งอุปสรรคในการระบุจีโนไทป์ตำแหน่ง rs2234693 และ rs9340799 คือ การระบุจีโนไทป์ TTAG เนื่องจากวิธีเจลิเล็กโทรโฟรีซิสไม่สามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอขนาด 443 และ 488 bp ออกจากกันได้ ทำให้เกิดความไม่ชัดเจนของการแปลผลระหว่างจีโนไทป์ TTAA และ TTAG ดังนั้นจึงควรบ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI กับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์อีกครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันผลการระบุจีโนไทป์ของตำแหน่ง rs9340799

จากการทดสอบสมดุสาร์ดี-ไวน์เบิร์ก พบว่ามีเพียงการกระจายของจีโนไทป์ของ rs143383 และ rs12901499 ที่เบี่ยงเบนไปจากสมดุสาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ในขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรมอื่น ๆ อยู่ในสมดุสาร์ดี-ไวน์เบิร์กตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ จึงมีความเป็นไปได้ว่า การเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้นอาจมี

สาเหตุมาจากความผิดพลาดของการระบุจีโนไทป์ในเครื่องหมายพันธุกรรมนั้น ๆ มากกว่าการที่ประชากรมีเงื่อนไขแตกต่างไปจากเงื่อนไขของสมดุล (Hosking et al., 2004) การเบี่ยงเบนออกจากสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก อาจบอกเป็นนัยว่า การระบุจีโนไทป์ควรได้รับการตรวจสอบหรือทำซ้ำ ก่อนการนำข้อมูลไปทดสอบทางสถิติอื่น ๆ ต่อไป

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน *ADAM12* ตำแหน่ง rs1871054 ไม่พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมนี้กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศหญิง พบว่าจีโนไทป์ CT สัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 0.56, 95% CI = 0.31-0.99, P = 0.048) ในทางกลับกัน จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตำแหน่ง rs3740199 เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบว่าแอลลีล C (OR = 2.48, 95% CI = 1.14-5.37, P = 0.022) และจีโนไทป์ CC (OR = 4.89, 95% CI = 1.05-22.84, P = 0.044) มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เพิ่มขึ้นเฉพาะในเพศชายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการวิเคราะห์ความเป็นอิสระต่อกันของตำแหน่ง rs1871054 กับ rs3740199 พบว่าทั้งสองตำแหน่งเป็นอิสระต่อกัน จึงมีความเป็นไปได้ที่เครื่องหมายพันธุกรรมทั้งสองตำแหน่งแสดงความสัมพันธ์กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในเพศที่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าทั้งสองตำแหน่งจะอยู่ในยีนเดียวกัน

ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน *ESR1* ตำแหน่ง rs2234693 และ rs9340799 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรทั้งหมด พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมทั้งสองตำแหน่งสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมทั้งสองตำแหน่งมีความสัมพันธ์แบบเดียวกันนี้เฉพาะในเพศหญิงเท่านั้น โดยเครื่องหมายพันธุกรรมทั้งสองตำแหน่งอยู่ในอินทรอนที่หนึ่งของยีน *ESR1* ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบรายงานว่าเครื่องหมายพันธุกรรมทั้งสองมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *ESR1* ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม อย่างไรก็ตาม รายงานก่อนหน้านี้พบว่าอินทรอนแรกของยีน *COL2A1* มีบริเวณจดจำของ transcription factor ที่มีบทบาทต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน *COL2A1* (Yasuda, Oh, Chen, Crombrughe, and Kim, 2017) และจากการศึกษาของจาก Weickert และคณะ พบว่าจีโนไทป์ CC ของเครื่องหมายพันธุกรรมตำแหน่ง rs2234693 สัมพันธ์กับระดับ mRNA ของยีน *ESR1* ที่ต่ำลงในส่วนคอร์เทกซ์กลีบหน้าผากส่วนหน้า (prefrontal cortex) ของผู้ป่วยโรคจิตเภท (schizophrenia) (Weickert et al., 2008) จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่เครื่องหมายพันธุกรรมตำแหน่ง rs2234693 อาจมีบทบาทต่อการแสดงออกของยีน *ESR1* ที่อาจ

ส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ อย่างไรก็ตามบทบาทของเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวควรได้รับการศึกษาในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมต่อไป

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตำแหน่ง rs8044769 พบว่าจีโนไทป์ CT มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในเพศชาย (OR = 3.62, 95% CI = 1.06-12.31, P = 0.039) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Wang และคณะที่ไม่พบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมตำแหน่ง rs8044769 กับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Wang และคณะไม่มีการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตำแหน่งนี้เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง (Wang et al. (2012)

ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมตำแหน่ง rs1871054 rs2234693 rs9340799 และ rs8044769 ที่พบในการศึกษานี้แตกต่างไปจากผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณ อาจมีสาเหตุมาจากในการวิเคราะห์ห่อภิมาณส่วนใหญ่ ไม่ได้มีข้อมูลของประชากรไทยถูกรวบรวมในการวิเคราะห์ จึงมีความเป็นไปได้ว่า ความแตกต่างที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากภูมิหลังทางพันธุกรรม (genetic background) ที่แตกต่างกัน ซึ่งการกระจายของจีโนไทป์และความถี่แอลลีลที่ต่างกัน อาจส่งผลให้ประชากรมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันได้ ในขณะที่ความสัมพันธ์ของตำแหน่ง rs3740199 ที่พบในการศึกษานี้ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ห่อภิมาณที่มีมาก่อนหน้านี้ นักวิจัยหลายกลุ่มทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตำแหน่ง rs3740199 โดยมีการศึกษาของประชากรไทย (Poonpet et al., 2016) ถูกรวบรวมไว้ในการวิเคราะห์ห่อภิมาณด้วย (Hu, Sun, and Wang, 2017; Ren et al., 2017) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในประชากรไทยที่ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ประชากรไทยมีแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรมที่สามารถนำไปใช้พัฒนาแบบจำลองทำนายการวินิจฉัยและการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมที่มีความจำเพาะและเหมาะสมกับประชากรไทยในอนาคต

ลักษณะความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมที่พบได้เฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง ไม่ได้มีเพียงแค่เครื่องหมายพันธุกรรมในการศึกษานี้เท่านั้น ก่อนหน้านี้ยังมีการรายงานพบความสัมพันธ์ของ rs12107036 ในยีน *tumor protein p63 (TP63)* และ rs4836732 ในยีน *astrotactin 2 (ASTN2)* กับการเกิดโรคข้อเสื่อมเฉพาะในเพศหญิง และความสัมพันธ์ของ rs10948172 ในยีน *SUPT3H* กับการเกิดโรคข้อเสื่อมเฉพาะในเพศชาย (Zeggini et al., 2012) สาเหตุของความแตกต่างของการเกิดและการพัฒนาของโรคข้อเข่าเสื่อมในแต่ละเพศยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด รวมไปถึงบทบาทของเครื่องหมายทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในแต่ละเพศที่ควร

ได้รับการศึกษาเชิงหน้าที่เพิ่มเติมต่อไป ความแตกต่างดังกล่าวอาจมีสาเหตุมาจากที่โรคข้อเข่าเสื่อม เป็นโรคที่เกิดจากพหุปัจจัย ซึ่งอาจรวมไปถึงความแตกต่างทางกายภาพของข้อเข่า การบาดเจ็บของข้อเข่าที่มีมาก่อนหน้านี้ (Hame and Alexander, 2013) นอกจากนี้ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของแต่ละประชากร เช่น รูปแบบการใช้ชีวิต อาหาร การประกอบอาชีพ หรือการออกกำลังกายที่แตกต่างกัน ก็อาจส่งผลต่อการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมได้ (Haidich, 2010)

เมื่อนำข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกมาสร้างแบบจำลองทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อม พบว่า การวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติกด้วยวิธี Enter ทำให้แบบจำลองทำนายที่ได้มีทุกตัวแปรที่ใช้ในการวิเคราะห์ โดยในการศึกษานี้ใช้ข้อมูลในการสร้างแบบจำลองทำนายทั้งหมด 3 แบบ คือ ใช้ข้อมูลจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิก ใช้ข้อมูลจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว และใช้ข้อมูลจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว ผลจากการทดสอบสัมประสิทธิ์ของตัวแปรของแบบจำลองที่ได้จากวิธี Enter ด้วย Wald  $\chi^2$  statistics พบว่ามีเพียงสัมประสิทธิ์ของบางตัวแปรเท่านั้นที่มีนัยสำคัญต่อแบบจำลองทำนาย ซึ่งสอดคล้องกับตัวแปรของแบบจำลองทำนายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald)

จากการประเมินความสามารถของแบบจำลองทำนาย พบว่าแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC มากที่สุด รองลงมาคือแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว โดยผลจากการทดสอบความแตกต่างของค่าพื้นที่ใต้กราฟ ROC ด้วย Z-test แสดงให้เห็นว่าค่าพื้นที่ใต้กราฟของแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกไม่แตกต่าง กับค่าพื้นที่ใต้กราฟของแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียว ซึ่งแบบจำลองทำนายทั้งสองมีค่าพื้นที่ใต้กราฟมีค่ามากกว่า 0.9 จัดได้ว่ามีความสามารถในการทำนายอยู่ในเกณฑ์ดีมาก และแบบจำลองที่มีความสามารถในการทำนายน้อยที่สุดของการศึกษานี้คือ แบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม พื้นที่ใต้กราฟของแบบจำลองนี้ มีค่าเท่ากับ 0.737 ซึ่งจัดได้ว่ามีความสามารถในการทำนายอยู่ในเกณฑ์ปานกลาง (Hanley and McNeil, 1983) อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบ Hosmer and Lemeshow test พบว่า มีเพียงแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกด้วยวิธี Enter และวิธี Forward Stepwise (Wald) กับแบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางคลินิกเพียงอย่างเดียวด้วยวิธี Forward Stepwise (Wald) เท่านั้นที่เหมาะสมต่อการใช้ทำนายการเกิดโรค

การศึกษานี้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย และได้พัฒนาแบบจำลองที่มีความสามารถในการทำนายการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมอยู่ในเกณฑ์ดีมาก การศึกษาต่อไปในอนาคต ควรเพิ่มขนาดประชากรให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครอบคลุมประชากรไทยมากขึ้น และเพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของเครื่องหมายพันธุกรรมที่พบในการศึกษานี้ รวมไปถึงการรวบรวมผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เริ่มเป็นโรคตั้งแต่อายุยังน้อย (early-onset case) นอกจากนี้ แบบจำลองทำนายจากข้อมูลทางพันธุกรรมและข้อมูลทางคลินิกของการศึกษานี้ ควรได้รับการทดสอบโดยข้อมูลของประชากรไทยกลุ่มอื่น เพื่อเป็นการยืนยันความสามารถในการทำนายของแบบจำลองที่ถูกรสร้างขึ้นนี้ รวมไปถึงควรมีการศึกษาทวิเชิงการทำงานที่เชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมกับเพศ และการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมต่อไป เพราะผลการศึกษาระดับโมเลกุลที่ได้ในการศึกษานี้ ยังจำเป็นต้องมีข้อมูลยืนยันที่ละเอียดและชัดเจน เนื่องจากปัจจัยการเกิดโรคข้อเสื่อมมีมากมายและหลากหลาย



## บรรณานุกรม

- Aghili, K., et al. 2018. Association of *GDF-5* rs143383 polymorphism with radiographic defined knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. Journal of Orthopaedics 15: 945-951.
- Bergink, A.P., et al. 2003. *Estrogen receptor  $\alpha$*  gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. Arthritis & Rheumatism 48: 1913-1922.
- Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A., and Jordan, K.P. 2010. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. Osteoarthritis and Cartilage 18: 24-33.
- Blanco, F.J., et al. 2015. Improved prediction of knee osteoarthritis progression by genetic polymorphisms: the Arthrotest Study. Rheumatology 54: 1236-1243.
- Borgonio-Cuadra, V.M., González-Huerta, C., Duarte-Salazar, C., de los Angeles Soria-Bastida, M., Cortés-González, S., and Miranda-Duarte, A. 2012. Analysis of *estrogen receptor alpha* gene haplotype in Mexican mestizo patients with primary osteoarthritis of the knee. Rheumatology International 32: 1425-1430.
- Brandt, K.D., Dieppe, P., and Radin, E.L. 2008. Etiopathogenesis of osteoarthritis. Rheumatic Disease Clinics of North America 34: 531-559.
- Chapman, K., et al. 2008. A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of *GDF5* with osteoarthritis susceptibility. Human Molecular Genetics 17: 1497-1504.
- Cho, H.J., et al. 2011. Gender and prevalence of knee osteoarthritis types in elderly Koreans. The Journal of Arthroplasty 26: 994-999.
- Ciocca, D.R., and Vargas Roig, L.M. 1995. Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. Endocrine Reviews 16: 35-62.
- Claassen, H., Schünke, M., and Kurz, B. 2005. Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. Cell and Tissue Research 319: 439-445.

- Deshpande, B.R., et al. 2016. The number of persons with symptomatic knee osteoarthritis in the United States: impact of race/ethnicity, age, sex, and obesity. Arthritis Care & Research 68: 1743-1750.
- Edwards, C.J., and Francis-West, P.H. 2001. Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. Seminars in Arthritis and Rheumatism 31: 33-42.
- Fawcett, K.A., and Barroso, I. 2010. The genetics of obesity: *FTO* leads the way. Trends in Genetics 26: 266-274.
- Ferguson, C.M., Schwarz, E.M., Reynolds, P.R., Puzas, J.E., Rosier, R.N., and O'Keefe, R.J. 2000. Smad2 and 3 mediate transforming growth factor- $\beta$ 1-induced inhibition of chondrocyte maturation. Endocrinology 141: 4728-4735.
- Francis-West, P.H., et al. 1999. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. Development 126: 1305-1315.
- Fransen, M., Bridgett, L., March, L., Hoy, D., Penserga, E., and Brooks, P. 2011. The epidemiology of osteoarthritis in Asia. International Journal of Rheumatic Diseases 14: 113-121.
- Gardiner, B.S., et al. 2016. Predicting knee osteoarthritis. Annals of Biomedical Engineering 44: 222-233.
- Haidich, A.B. 2010. Meta-analysis in medical research. Hippokratia 14: 29-37.
- Hao, Z., Li, X., Dai, J., Zhao, B., and Jiang, Q. 2017. Genetic effects of rs3740199 polymorphism in *ADAM12* gene on knee osteoarthritis: a meta-analysis. Journal of Orthopaedic Surgery and Research 12: 94-100.
- Honsawek, S., Malila, S., Yuktanandana, P., Tanavalee, A., Deepaisarnsakul, B., and Parvizi, J. 2013. Association of MMP-3 (-1612 5A/6A) polymorphism with knee osteoarthritis in Thai population. Rheumatology International 33: 435-439.
- Hu, X., Sun, G., and Wang, W. 2017. Association of *ADAM12* polymorphisms with the risk of knee osteoarthritis: meta-analysis of 5048 cases and 6848 controls. Rheumatology International 37: 1659-1666.



- Jin, S.Y., et al. 2004. *Estrogen receptor- $\alpha$*  gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population. Arthritis Research & Therapy 6: R415-R421.
- Kellgren, J.H., and Lawrence, J.S. 1957. Radiological assessment of osteo-arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 16: 494-502.
- Kuptniratsaikul, V., Tosayanonda, O., Nilganuwong, S., and Thamalikitkul, V. 2002. The epidemiology of osteoarthritis of the knee in elderly patients living an urban area of Bangkok. Journal of the Medical Association of Thailand 85: 154-161.
- Kveiborg, M., Albrechtsen, R., Rudkjær, L., Wen, G., Damgaard-Pedersen, K., and Wewer, U.M. 2006. ADAM12-S stimulates bone growth in transgenic mice by modulating chondrocyte proliferation and maturation. Journal of Bone and Mineral Research 21: 1288-1296.
- Lee, Y.J., et al. 2003. Effect of estrogen on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, and MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in osteoarthritis chondrocytes. Rheumatology International 23: 282-288.
- Liyang, J., et al. 2013. A *SMAD3* gene polymorphism is related with osteoarthritis in a Northeast Chinese population. Rheumatology International 33: 1763-1768.
- Lotz, M., et al. 2013. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. Annals of the Rheumatic Diseases 72: 1756-1763.
- Lv, Z.T., Liang, S., Huang, X.J., Cheng, P., Zhu, W.T., and Chen, A.M. 2017. Association between *ADAM12* single-nucleotide polymorphisms and knee osteoarthritis: a meta-analysis. BioMed Research International 2017: 5398181-5398181.
- Martin, D.F. 1994. Pathomechanics of knee osteoarthritis. Medicine & Science in Sports & Exercise 26: 1429-1435.
- Miyamoto, Y., et al. 2007. A functional polymorphism in the 5' UTR of *GDF5* is associated with susceptibility to osteoarthritis. Nature Genetics 39: 529-533.
- Panoutsopoulou, K., et al. 2014. The effect of *FTO* variation on increased osteoarthritis risk is mediated through body mass index: a mendelian randomisation study. Annals of the Rheumatic Diseases 73: 2082-2086.

- Pereira, D., et al. 2017. Potential role of age, sex, body mass index and pain to identify patients with knee osteoarthritis. International Journal of Rheumatic Diseases 20: 190-198.
- Petersson, I.F. 1996. Occurrence of osteoarthritis of the peripheral joints in European populations. Annals of the Rheumatic Diseases 55: 659-661.
- Poonpet, T., Honsawek, S., Tammachote, N., Kanitnate, S., and Tammachote, R. 2013a. *ADAMTS14* gene polymorphism associated with knee osteoarthritis in Thai women. Genetics and Molecular Research 12: 5301-5309.
- Poonpet, T., Honsawek, S., Tammachote, N., Kanitnate, S., and Tammachote, R. 2013b. Association study of the *MMP1* gene polymorphism with knee osteoarthritis in Thais by high resolution melting (HRM) analysis. Thai Journal of Genetics 6: 181-192.
- Poonpet, T., Tammachote, R., Tammachote, N., Kanitnate, S., and Honsawek, S. 2016. Association between *ADAM12* polymorphism and knee osteoarthritis in Thai population. The Knee 23: 357-361.
- Ren, K., et al. 2017. Association of *ADAM12* gene polymorphisms with knee osteoarthritis susceptibility. Oncotarget 8: 77710-77721.
- Richette, P., et al. 2007. Oestrogens inhibit interleukin 1 $\beta$ -mediated nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes through nuclear factor- $\kappa$ B impairment. Annals of the Rheumatic Diseases 66: 345-350.
- Rodriguez, S., Gaunt, T.R., and Day, I.N.M. 2009. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for mendelian randomization studies. American Journal of Epidemiology 169: 505-514.
- Sato, T., et al. 2006. Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. Arthritis & Rheumatism 54: 808-817.
- Shin, M.-H., et al. 2012. Genetic association analysis of *GDF5* and *ADAM12* for knee osteoarthritis. Joint Bone Spine 79: 488-491.
- Sinusas, K. 2012. Osteoarthritis: diagnosis and treatment. American Family Physician 85: 49-56.

- Sowers, M.R., McConnell, D., Jannausch, M., Buyuktur, A.G., Hochberg, M., and Jamadar, D.A. 2006. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism 54: 2481-2487.
- Stachowiak, G.W., Wolski, M., Woloszynski, T., and Podsiadlo, P. 2016. Detection and prediction of osteoarthritis in knee and hand joints based on the X-ray image analysis. Biosurface and Biotribology 2: 162-172.
- Syed, F., and Khosla, S. 2005. Mechanisms of sex steroid effects on bone. Biochemical and Biophysical Research Communications 328: 688-696.
- Takahashi, H., Nakajima, M., Ozaki, K., Tanaka, T., Kamatani, N., and Ikegawa, S. 2010. Prediction model for knee osteoarthritis based on genetic and clinical information. Arthritis Research & Therapy 12: R187-R187.
- Tawonsawatruk, T., Changthong, T., Pingsuthiwong, S., Trachoo, O., Sura, T., and Wajanavisit, W. 2011. A genetic association study between *growth differentiation factor 5 (GDF5)* polymorphism and knee osteoarthritis in Thai population. Journal of Orthopaedic Surgery and Research 6: 47.
- Tawonsawatruk, T., et al. 2009. Association of estrogen receptor-alpha single-nucleotide polymorphism (codon 594 G→A) and Thai patients affected by knee osteoarthritis. Journal of the Medical Association of Thailand 92: S45-50.
- Untergasser, A., et al. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40: e115-e115.
- Ushiyama, T., Ueyama, H., Inoue, K., Ohkubo, I., and Hukuda, S. 1999. Expression of genes for estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in human articular chondrocytes. Osteoarthritis and Cartilage 7: 560-566.
- Valdes, A.M., Spector, T.D., Doherty, S., Wheeler, M., Hart, D.J., and Doherty, M. 2009. Association of the *DWVA* and *GDF5* polymorphisms with osteoarthritis in UK populations. Annals of the Rheumatic Diseases 68: 1916-1920.
- Valdes, A.M., et al. 2010. Genetic variation in the *SMAD3* gene is associated with hip and knee osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism 62: 2347-2352.

- Valdes, A.M., et al. 2006. Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. Arthritis & Rheumatism 54: 533-539.
- Verrier, S., Hogan, A., McKie, N., and Horton, M. 2004. ADAM gene expression and regulation during human osteoclast formation. Bone 35: 34-46.
- Wang, Q., Yan, X.B., Sun, Q.Q., Hu, A.M., Liu, H.L., and Yin, Y.W. 2015. Genetic polymorphism of the *estrogen receptor alpha* gene and susceptibility to osteoarthritis: evidence based on 15,022 subjects. Current Medical Research and Opinion 31: 1047-1055.
- Wang, Y., et al. 2016. No association of the single nucleotide polymorphism rs8044769 in the *fat mass and obesity-associated* gene with knee osteoarthritis risk and body mass index: a population-based study in China. Bone & Joint Research 5: 169-174.
- Yao, J.Y., et al. 2003. Mutation analysis of the *Smad3* gene in human osteoarthritis. European Journal of Human Genetics 11: 714-717.
- Yau, M.S., et al. 2017. Genome-wide association study of radiographic knee osteoarthritis in North American Caucasians. Arthritis & Rheumatology 69: 343-351.
- Yin, Y.W., Sun, Q.Q., Hu, A.M., Wang, Q., and Liu, H.L. 2015. Association of rs9340799 polymorphism in *estrogen receptor alpha* gene with the risk of osteoarthritis: evidence based on 8,792 subjects. Molecular Genetics and Genomics 290: 513-520.
- Yoo, T.K., Kim, D.W., Choi, S.B., Oh, E., and Park, J.S. 2016. Simple scoring system and artificial neural network for knee osteoarthritis risk prediction: a cross-sectional study. PLOS ONE 11: e0148724.
- Zeggini, E., et al. 2012. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. The Lancet 380: 815-823.
- Zhan, D., Thumtecho, S., Tanavalee, A., Yuktanandana, P., Anomasiri, W., and Honsawek, S. 2017. Association of adiponectin gene polymorphisms with knee osteoarthritis. World Journal of Orthopedics 8: 719-725.

Zhang, R., et al. 2015. A comprehensive meta-analysis of association between genetic variants of *GDF5* and osteoarthritis of the knee, hip and hand. Inflammation Research 64: 405-414.

อัศวินท์ แจ้งสว่าง. 2558. ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพหุสัณฐานของยีน *Similar to Mothers Against Decapentaplegic type 3* กับความไวในการเกิดโรคข้อเข่าเสื่อมในประชากรไทย. โครงการปริญญาบัณฑิต, ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวจุฑามาศ สิทธิกรไพบูลย์
วัน เดือน ปี เกิด	25 พฤศจิกายน 2536
สถานที่เกิด	นนทบุรี
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	45/66 ม.5 ต.ท่าข้าม อ.สามพราน จ.นครปฐม 73110
ผลงานตีพิมพ์	-
รางวัลที่ได้รับ	-



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY