

บทนำ

ลักษณะทางคลินิกของโรค thyrotoxic periodic paralysis (THPP)

ภาวะ Thyrotoxic Hypokalemic Periodic Paralysis (THPP) เป็นกลุ่มอาการที่มีลักษณะอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อพร้อมกับระดับโพแทสเซียมลดต่ำ อาการเหล่านี้จะปรากฏเป็นๆหายๆ โดยจะมีอาการทั้งที่แขนและขา อาการอ่อนแรงแม้จะมาปรากฏหลังตื่นนอน ตอนเช้า โดยมีประวัติการออกกำลังกายอย่างหนักในคืนก่อนเข้านอน และจะกลับมาเป็นปกติในเวลาเป็นชั่วโมงถึงเป็นวัน มักพบมีสิ่งกระตุ้นให้เกิดอาการ (1-2) ได้แก่ การรับประทานอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง, การดื่มสุรา, การออกกำลังกายอย่างหนัก, ภาวะเครียด, อากาศที่เปลี่ยนแปลง นี่เป็นที่รู้จักกันมานาน มีรายงานครั้งแรกโดยนายแพทย์ชาวญี่ปุ่น(3) อุบัติการณ์การเกิดโรคสูงถึง 1.8-8.8% ในชาวเอเชีย ได้แก่ จีน(4-5), ญี่ปุ่น และฮ่องกง(6) พบรายงานประปรายในประเทศแถบละตินอเมริกาเช่นชิลี, เม็กซิโก(7-9) และจากรายงานคณะวิจัย Mayo Clinic ประเทศสหรัฐอเมริกา พบโรคนี้เพียง 0.1-0.2% ในผู้ป่วยชาวตะวันตก (10-11) ช่วงอายุที่มีรายงานมากที่สุดอยู่ระหว่าง 30-50 ปี(1-2, 5) โดยพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงเป็นสัดส่วน 11:1.2 (12) โดยพบเป็นโรคนี้ประมาณ 13% ของผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษเพศชาย ขณะที่พบเพียง 0.17% ของผู้ป่วยหญิงเท่านั้น สาเหตุของโรคไทรอยด์เป็นพิษนั้นไม่จำเพาะเจาะจง พบมีรายงานร่วมกับ Graves' disease มากที่สุด (13) นอกจากนี้พบมีรายงานในผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษจากเนื้องอกต่อมไธรมองที่หลังฮอร์โมน Thyrotropin (TSH producing tumor)(14-15) และผู้ป่วยที่ทานยาไทรอยด์ฮอร์โมนมากเกินไป (16-17) การดำเนินโรคของTHPP นี้โดยมากอาการอ่อนแรงแม่้เกิดขึ้นพร้อมกับอาการไทรอยด์เป็นพิษ (2, 18) ผู้ป่วยจะมีอาการปวด, เป็นเหน็บ, หรือเกร็งของกล้ามเนื้อเป็นอาการเตือนก่อนจะมีอาการอ่อนแรง ความรุนแรงของการอ่อนแรงแม่้แตกต่างกันไปในแต่ละคน ผู้ป่วยบางรายมีอาการเฉพาะที่กล้ามเนื้อขาในขณะที่บางรายเป็นทั้งร่างกาย บางรายมีความรุนแรงมากจนจำเป็นต้องใช้เครื่องช่วยหายใจ เนื่องจากการทำงานของกล้ามเนื้อหายใจล้มเหลว(19-21) อาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้ออาจไม่สมมาตร ระยะเวลาของการอ่อนแรงแม่้ใช้เวลาหลายชั่วโมงจนถึงเป็นวันจึงจะกลับมาเป็นปกติ ความผิดปกติของเกลือแร่ขณะมีอาการอ่อนได้แก่ ระดับโพแทสเซียมต่ำ นอกจากนี้อาจพบฟอสเฟตและแมกนีเซียมต่ำร่วมด้วย (22-24) ผลของระดับเกลือแร่ที่เปลี่ยนไปทำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของกล้ามเนื้อลายและกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้มีผลต่อการเดินหัวใจ มีรายงานความรุนแรง(25) ตั้งแต่ หัวใจเต้นช้า (sinus bradycardia, AV block) จนถึงการเต้นหัวใจผิดจังหวะชนิด ventricular tachycardia และ ventricular fibrillation (20-21, 25-27) ซึ่งเป็นอันตรายถึงชีวิต(28) โดยทั่วไปการรักษา(2, 29) โรคนี้ประกอบด้วย การเลือกรักษาภาวะไทรอยด์เป็นพิษด้วยวิธีทำให้หายขาด (Ablative therapy) ได้แก่ การกลืนไอโอดีนกัมมันตรังสี 131I, หรือการผ่าตัด นอกจากนี้ที่สำคัญผู้ป่วยจำเป็นต้องหลีกเลี่ยงภาวะที่เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค ตลอดจนทดแทนเกลือโพแทสเซียมในระหว่างที่เกิดอาการ ทั้งนี้การทดแทนโพแทสเซียมนั้นต้องให้ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากภาวะ THPP นี้ผู้ป่วยไม่ได้ขาดโพแทสเซียมโดยตรง มีโอกาสเกิดภาวะโพแทสเซียมเพิ่มสูงหลังได้รับการรักษา (30-31) (Rebound hyperkalemia) ดังที่มีรายงานมาแล้วในวารสารทางการแพทย์ นอกจากนี้มีข้อสังเกตว่ายา

กลุ่ม Nonselective beta-adrenergic receptor blocking agent เช่น propranolol มีประโยชน์ทำให้อาการดังกล่าวหายเป็นปกติเร็วขึ้นและป้องกันการกลับเป็นซ้ำได้ (18, 32-37)

เนื่องจากอาการทางคลินิกที่เด่นชัดในผู้ป่วยกลุ่มนี้คือระดับโพแทสเซียมในเลือดต่ำ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงมุ่งความสนใจไปยังสาเหตุการเกิด Hypokalemia จากการศึกษาโดย Shisume และคณะวิจัยชาวญี่ปุ่น (38-41) พบว่ากลไกการเกิดการเปลี่ยนแปลงของเกลือแร่ในร่างกายของผู้ป่วย THPP นั้นเกิดจากการเคลื่อนที่ของโพแทสเซียมและฟอสเฟตจากกระแสเลือดเข้าสู่ในเซลล์ (Intracellular shift) ในสภาวะปกติ 98% ของปริมาณโพแทสเซียมในร่างกายพบในเซลล์ (intracellular) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์กล้ามเนื้อลาย, เม็ดเลือดแดง, ตับและสมอง(42) หน้าที่หลักใหญ่ของโพแทสเซียมเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำกระแสประสาท action potential และการคงสภาพ resting membrane potential (ปกติ -80- -90 mV ในเซลล์กล้ามเนื้อ) (43) การเกิด action potential เริ่มจากการที่กระแสประสาทเหนี่ยวนำให้โซเดียมเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ผ่าน Sodium channel ทำให้เกิดภาวะ Depolarization โพแทสเซียมภายในเซลล์จะถูกขับออกนอกเซลล์ผ่าน Potassium channels เกิดภาวะ Repolarization ที่ผนังเซลล์ ปริมาณโพแทสเซียมในเซลล์ลดน้อยลงขณะที่ปริมาณโซเดียมเพิ่มมากขึ้น ต่อมาเซลล์จะปรับกลับสู่สมดุลโดยอาศัยเอนไซม์ Na^+ , K^+ -ATPase ที่อยู่ที่ผิวเซลล์ นำโพแทสเซียมกลับเข้าสู่เซลล์และขับโซเดียมออกจากเซลล์โดยใช้พลังงานจากการสลาย ATP ทำให้กลับสู่ภาวะ resting stage จากการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาของเซลล์ (cell physiology) ใน THPP และผู้ป่วย Familial Hypokalemic periodic paralysis (FAMILIAL HYPOKPP) ซึ่งมีอาการและอาการแสดงคล้าย THPP ต่างกันคือเป็นโรคที่ถ่ายทอดกันในครอบครัวเป็นชนิด Autosomal dominance และไม่พบร่วมกับภาวะไทรอยด์เป็นพิษ พบว่าระดับ resting membrane potential ในผู้ป่วยทั้งสองภาวะจะสูงกว่าคนปกติ (-78mV) และจะยิ่งลดต่ำลงจนอยู่ในระดับ depolarization stage (-50 mV) ในขณะที่มีการอ่อนแรง ทำให้การเหนี่ยวนำกระแสประสาท (action potential) เกิดไม่ได้ตามปกติ(44) เป็นเหตุให้เกิดอาการอ่อนแรง นอกจากนี้จากการศึกษาหาปริมาณโซเดียมและโพแทสเซียมในเซลล์กล้ามเนื้อลายของผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษทั่วไป โดย Satoyochi E และคณะ (45) พบว่าปริมาณโซเดียมในเซลล์เพิ่มสูงมากกว่าคนปกติเกือบ 100% ขณะที่ปริมาณโพแทสเซียมในเซลล์ลดลง 9% มีการศึกษารายงานผลการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ Na^+ - K^+ ATPase เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย THPP, ผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษที่ไม่มีอาการอ่อนแรง และอาสาสมัครปกติโดย Chan A และคณะ(46-49) พบว่าการทำงานของเอนไซม์นี้ในผู้ป่วย THPP เพิ่มมากกว่าผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษที่ไม่มีอาการอ่อนแรง และมากกว่าคนปกติ ทั้งนี้การทำงานของเอนไซม์จะกลับมาสู่ระดับปกติเมื่อได้รับการรักษาโรคไทรอยด์เป็นพิษจนหายดีแล้ว และผู้วิจัยในกลุ่มเดียวกันยังได้ศึกษาถึงผลการดื่มน้ำตาล (oral glucose tolerant test) และวัดระดับ insulin ในผู้ป่วย THPP (50) พบว่ามีภาวะ Hyperinsulinemia และ Insulin resistance ในผู้ป่วย THPP มากกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งเชื่อว่าภาวะการทำงานของ Na^+ - K^+ ATPase และ insulin resistance นี้ทำให้โพแทสเซียมมีแนวโน้มจะเข้าสู่เซลล์มากกว่าปกติและเสี่ยงต่อการเกิดโรค Layzer RB อายุรแพทย์ระบบประสาทชาวอเมริกัน(51) จึงได้ตั้งสมมติฐานว่า การเกิดโรคทั้งใน THPP และ FAMILIAL HYPOKPP น่าจะมีพยาธิกำเนิดคล้ายกันกล่าวคือ มีความผิดปกติของขบวนการแพร่ผ่าน

(passive transport) ของโซเดียมและโพแทสเซียมเข้าออกผ่านเยื่อเซลล์ ตลอดจนการทำงานของ Na^+/K^+ ATPase นำไปสู่การเกิดความผิดปกติของ action potential

ต่อมาได้มีการศึกษาลงในรายละเอียดเกี่ยวกับ Ion channel เนื่องจากการแพร่ผ่านเซลล์ของ Sodium และ Potassium มีหลายวิธีได้แก่ active transport และ passive transport(52) Sodium จะแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์โดย active transport ผ่านทาง Voltage-gated sodium channels และโพแทสเซียมจะแพร่ผ่านออกนอกเซลล์โดยวิธี passive transport ผ่าน potassium channels ได้แก่ inwardly rectifying potassium channel ซึ่งทำหน้าที่ในการคงสภาพ resting membrane potential และ Voltage-gated potassium channel ทำให้เกิด repolarization นอกจากนี้ยังมี calcium-sensitive potassium channel และ ATP-sensitive potassium channel เป็นต้น(53) ดังนั้นสมมติฐานที่เกิดขึ้นคือความผิดปกติของ Ion channels เหล่านี้ตลอดจน Na^+/K^+ ATPase อาจนำไปสู่ภาวะ Hypokalemia

ข้อสรุปจากการดำเนินโรค อาการและอาการแสดงทางคลินิกตลอดจนการศึกษาทางสรีรวิทยาทำให้เกิดการตั้งสมมติฐานที่ว่า ภาวะโพแทสเซียมต่ำที่เกิดขึ้นเกิดจากการเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์มากขึ้น ทั้งนี้พื้นฐานความผิดปกติอาจจะเกี่ยวข้องกับหลายกลไกได้แก่ การทำงานที่ผิดปกติของ Sodium, potassium ion channels, Na^+/K^+ ATPase, hyperinsulinemia และ beta-adrenergic receptor overstimulation

การศึกษา Genetic analysis ของโรค THPP

ด้วยเหตุที่พบว่าโรค THPP พบบ่อยในชาวเอเชีย และในประเทศไทยเรานับเป็นประเทศหนึ่งที่พบโรคนี้ได้บ่อย โดยพบมากที่สุดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพบบ่อยในเพศชาย ขณะที่โรคไทรอยด์เป็นพิษโดยทั่วไปพบมากในเพศหญิง ประกอบกับมีรายงานการเกิดโรคนี้หลายคนในบางครอบครัว(29, 54-55) จึงมีผู้ตั้งสมมติฐานว่าความผิดปกติดังกล่าวนี้จะมีสาเหตุทางพันธุกรรมบางอย่างและโดยปกติจะไม่มีอาการ ต่อเมื่อผู้ป่วยมีภาวะไทรอยด์เป็นพิษทำให้ความผิดปกตินี้เด่นชัดขึ้น กลไกการเกิดโรคนี้น่าจะมีคามผิดปกติระดับ gene โดยความผิดปกติจะอยู่ที่ gene ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเกลือแร่ Hypokalemia และภาวะไทรอยด์เป็นพิษ แต่จวบจนปัจจุบันยังไม่มีคามผิดปกติของยีนใดที่เป็นที่ยอมรับว่าทำให้เกิด หรือเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค THPP การศึกษาทางพันธุกรรมที่อาจเป็นสาเหตุของ THPP เริ่มจากการศึกษาโดยนายแพทย์ชาวญี่ปุ่น(56) ตั้งสมมติฐานจากพื้นฐานที่ว่าภาวะไทรอยด์เป็นพิษที่พบร่วมกับ THPP มักเกิดจาก Graves' Disease ซึ่งเกิดจากการที่ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเนื้อเยื่อตนเอง (autoimmune disease) จึงได้หาความสัมพันธ์ของโรค THPP นี้กับ Human Leukocyte Antigen (HLA) มีรายงานความสัมพันธ์กับ DRW8 ในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น และพบความสัมพันธ์กับ A2BW22 และ AW19B17 ในผู้ป่วยชาวจีน (57) ต่อมาพบว่าสาเหตุของโรคไทรอยด์ที่พบร่วมกับ THPP ไม่ได้จำกัดเฉพาะกับโรค Graves' disease เท่านั้น บ่งชี้ว่าภาวะไทรอยด์ฮอร์โมนที่มากเกินไปน่าจะเป็นเพียงสิ่งกระตุ้นให้เกิดอาการอ่อนแรง ในผู้ป่วยที่มีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรค

ทฤษฎีความผิดปกติที่ Ion channel genes ที่เกี่ยวข้องกับภาวะโพแทสเซียมในกลุ่มโรค hypokalemic periodic paralysis ได้รับการพิสูจน์ โดยเริ่มจากการศึกษาในโรค Familial HypoKPP ซึ่งเป็น

โรคทางพันธุกรรม ที่มีการถ่ายทอดภายในครอบครัวแบบ Autosomal dominance พบมากในชาวตะวันตกผู้ป่วยมีอาการคล้าย THPP ในปัจจุบันพบความผิดปกติของ Ion channel genes 3 ชนิด โดยเริ่มมีรายงานในปี 1994 ด้วยวิธี genetic linkage analysis (58) Ptacek LJ และคณะพบความผิดปกติ 3 แบบที่ Voltage dependent calcium channel gene, Alpha-1S subunit (CACNA1S) ได้แก่ R528H, R1239H และ R1239G นับเป็น ion channel แรกที่ถูกค้นพบว่าเป็นสาเหตุของโรค FAMILIAL HYPOKPP ต่อมาในปี 1999 Bulman DE. และคณะ(59) ได้รายงาน mutation R669H ที่ gene ของ Skeletal muscle voltage-gated sodium channel, alpha subunit (SCN4A) และที่ channel เดียวกันนี้ Jurkat-Rott K. และคณะ(60) ได้พบ mutations เพิ่มเติมคือ R672H และ R672G ในผู้ป่วย Familial HypoKPP อย่างไรก็ตามความผิดปกติที่ Calcium และ Sodium channels เหล่านี้ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการเกิดภาวะโพแทสเซียมต่ำได้ทั้งหมด และผู้ป่วย Familial HypoKPP อีกมากที่ยังไม่พบความผิดปกติของ Ion channels ตามที่มีรายงานมาก่อน ในปีค.ศ. 2001 Abbott GW และคณะ(61) ค้นพบ Voltage-gated potassium channels subtype Kv 3.4 ซึ่งเป็น potassium channels ชนิดใหม่ โดยพบมากในเซลล์กล้ามเนื้อลายและต้องทำงานร่วมกับโปรตีนที่เรียกว่า Mink related peptide 2 (MiRP2) ซึ่งโปรตีนนี้สร้างจากยีน KCNE3 เขาพบว่า MiRP2 จะรวมตัวกับโปรตีน Kv 3.4 เพื่อทำหน้าที่เป็น voltage-gated potassium channels ของกล้ามเนื้อลาย คณะผู้วิจัยได้ทำการสำรวจผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางระบบประสาทอ่อนแรงเป็นพักๆ (episodic muscle disorder) 100 คน ซึ่งทุกคนไม่มีความผิดปกติที่ SCN4A, และ CACNL1A3 จากการศึกษาเบื้องต้นทำให้พบมีรายงาน mutation G340A transition ที่ KCNE3 ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนแปลง arginine เป็น histidine ที่ตำแหน่ง 83 ของโปรตีน MiRP2 ในผู้ป่วย Familial HypoKPP นอกจากนี้ล่าสุดมีรายงานความผิดปกติของการทำงานของ Potassium channels อื่นในผู้ป่วย Familial HypoKPP ที่มีความผิดปกติของ calcium channel gene CACNA1S กล่าวคือ Tricarico D. และคณะ(62-63) ได้ทำการศึกษาวงจรระดับเซลล์ของเซลล์กล้ามเนื้อลายในผู้ป่วย 3 รายพบว่าการแพร่ของโปแตสเซียมออกผ่าน ATP sensitive potassium channel (KATP) ลดลงเมื่อเทียบกับคนปกติ

เนื่องจากโรคในกลุ่ม Familial hypokalemic periodic paralysis นี้มีลักษณะคล้ายกับ THPP อย่างมาก ทำให้แพทย์ชาวต่างชาติหลายท่านได้พยายามหาความผิดปกติที่เกิดที่ Ion channel genes ใน Familial HypoKPP มาตรวจสอบในผู้ป่วยไทยอยู่เป็นพิษที่มีอาการอ่อนแรง โดยเริ่มจากปี 2001 นายแพทย์ Dias da Silva MR. และคณะ(64) รายงานการตรวจหาความผิดปกติทางรหัสพันธุกรรมของ CACNA1S ในผู้ป่วย THPP ชาวบราซิล 15 ราย และในเวลาไล่เลี่ยกัน Chen L. และคณะได้ทำการตรวจสอบ gene เดียวกันนี้ในผู้ป่วยชาวจีน 5 ราย(65) ทั้ง 2 กลุ่มไม่พบความผิดปกติที่ gene นี้ใน THPP ด้วยเหตุนี้ Dias da Silva MR และคณะจึงทำการตรวจวิเคราะห์ KCNE3 ในผู้ป่วย THPP ด้วยวิธี Direct Sequencing เพิ่มเติม และพบผู้ป่วย THPP 1 ราย จาก 15 ราย มีความผิดปกติ G340A transition ที่ KCNE3 เช่นกันกับ Familial HypoKPP ที่รายงานโดย Abbott GW และคณะ ในการศึกษา นักวิทยาศาสตร์หลายคนได้ให้ความเห็นว่า ผู้ป่วย THPP ดังกล่าวอาจจะมีมีความผิดปกติของ KCNE3 ชนิด Familial HypoKPP ที่ถ่ายทอดในครอบครัว เนื่องจากมีญาติพี่น้องในครอบครัวเดียวกันกับผู้ป่วย

มีอาการอ่อนแรงร่วมกับเกลือแร่โพแทสเซียมต่ำ ทั้งที่ไม่มีอาการของไทรอยด์เป็นพิษร่วมด้วยเลย ต่อมา ในปี 2004 Kung AW และคณะผู้วิจัยชาวฮ่องกงได้ทำการตรวจสอบ ยีน CACNA1S, KCNE3, และ SCN4A ตลอดจน microsatellite markers บนโครโมโซม 1 ที่ใกล้กับ Na⁺/K⁺-ATPase subunits alpha1, alpha2, และ beta1 พบว่าเฉพาะ nucleotide (nt) -476, intron 2 nt 57, และ intron 26 nt 67 ของ CACNA1S สัมพันธ์กับการเกิดโรค THPP ในการคัดกรองชาวจีนที่มี THPP 97 รายเปรียบเทียบกับผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษ Graves' disease 77 คนและอาสาสมัครปกติ 100 คนอย่างมีนัยสำคัญ(66) ทั้งนี้ ไม่พบ mutation ที่มีรายงานใน Familial HypoKPP ในผู้ป่วย THPP เลย ความสัมพันธ์ที่พบทั้งหมดนี้ กับโรค THPP ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการเกิดโรคได้แน่ชัด เนื่องจาก Genetic variants ที่พบนั้นไม่เปลี่ยนแปลงอะมิโนแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจว่า mutation ที่พบนี้อยู่ใกล้กับบริเวณที่ เรียกว่า thyroid hormone responsive element จึงเป็นไปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงของ nucleotide ที่ ตำแหน่งนี้มีผลต่อการเกาะจับของฮอร์โมนไทรอยด์ และอาจจะมีผลทำให้การทำงานของ ion channel นี้ เปลี่ยนแปลงไป ในปี 2006 นี้เอง ผู้วิจัยกลุ่มเดียวกัน(67) ได้ศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหา mutation ของบริเวณ ที่เป็น 1500 nucleotide จาก 5' untranslated regions ของ ยีนที่สร้าง Na/K-ATPase subunit ต่างๆ 5 ยีนที่พบมากในกล้ามเนื้อลาย ได้แก่ ATP1A1, ATP1A2, ATP1B1, ATP1B2 และ ATP1B4, และ ความสัมพันธ์ของ SNPs ที่อาจจะพบในผู้ป่วยกลุ่มเดียวกันโดยวิธี direct sequencing ซึ่งผลการศึกษา กลับไม่พบความผิดปกติใดๆ นอกจากนี้ Kim TY และผู้วิจัยชาวเกาหลี(68). ได้ทำการศึกษาหา ความสัมพันธ์ของ polymorphism Arg16Gly ของ ยีน ADRB2 ที่สร้าง β 2-adrenergic receptor และ เช่นเดียวกันผลการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์กับโรค THPP

จากการศึกษาที่มีมาเป็นการศึกษาที่เลือกศึกษาในยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค THPP โดยอ้างอิงจากการศึกษาพื้นฐานทางสรีรวิทยา การดำเนินโรค และยีนที่มีรายงานในกลุ่มโรคที่ คล้ายกันแต่กลับไม่พบความผิดปกติที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์และอธิบายการเกิดโรค THPP ได้

การศึกษาหา ยีนที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคกลุ่ม Complex genetic diseases ด้วยวิธี Genome-wide association study

เนื่องจากเมื่อพิจารณาถึงอาการและอาการแสดงทางคลินิกของโรค THPP พบว่าลักษณะเด่น ของโรคคือ พบบ่อยในชาวเอเชีย เพศชาย และ มีปัจจัยกระตุ้นที่จำเพาะ ทำให้มีความเป็นไปได้ว่าโรคนี้ เกิดจากความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องมากกว่า 1 ยีน และอาจจะมีลักษณะทางสิ่งแวดล้อมเข้ามา เกี่ยวข้อง ในปัจจุบันการศึกษาที่มีในโรค THPP นี้เป็นการวิจัยถึงความสัมพันธ์ของยีนที่คาดว่าจะ เป็นสาเหตุของโรค (candidate gene) ยังคงเป็นการหาความสัมพันธ์ของความแปรผัน (polymorphisms) ของ candidate gene เพียงทีละยีนเดียว (single polymorphism-single candidate gene approach or genetic approach) ซึ่งพบว่า ผลการศึกษามักไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค หรือ อาจเป็นเพียง polymorphism ที่ link ไปกับ causative allele ที่เป็นผลมาจากการมีภาวะ linkage disequilibrium ภายในยีน ไม่ได้เป็น allele ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอย่างแท้จริง ดังนั้น การศึกษาที่ดีกว่าครอบคลุมทุกยีนโดยไม่ยึดเอากลไกการเกิดโรคจากการศึกษาทางสรีรวิทยามา พิจารณา การศึกษาวิธีนี้คือ genome-wide association study ที่เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของ

genetic markers ในทุกโครโมโซม ที่พบสัมพันธ์กับการเกิดโรค THPP มากกว่ากลุ่มควบคุม สำหรับรูปแบบการศึกษานั้นจากการคำนวณทางสถิติของนัก genetic statisticians Risch N. และ Merikangas K (69) ในวารสาร Science ในปี ค.ศ. 1996 อ้างว่า Genetic association study บนพื้นฐานของ Linkage disequilibrium จะเป็นวิธีทางสถิติที่ดีในการหาพื้นที่เป็นสาเหตุหรือปัจจัยเสี่ยงของโรค complex genetic disease และความน่าเชื่อถือจะมากขึ้นถ้าสามารถทำการศึกษาในอาสาสมัครจำนวนมาก ร่วมกับถ้ามีการทำการศึกษายืนยันในประชากร อื่นๆร่วมด้วย (Independent cohort study)

ในปัจจุบันวิธีการศึกษานิต Genome-wide scan นั้นเป็นไปได้มากขึ้นเนื่องจากเครื่องมือและเทคโนโลยีที่รองรับทำให้เราสามารถตรวจสอบ SNPs ได้พร้อมกันทีเดียวเป็นจำนวนมาก (High-throughput platform) เช่น Microarray (70) ซึ่งใช้หลักการของ Single primer DNA hybridization ในปัจจุบันเครื่อง Microarray เองก็มีหลายชนิดให้เลือกใช้ในการศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์ เพื่อให้สามารถตรวจสอบ SNPs ปริมาณมากพร้อมกันครอบคลุมได้หมดทั้งจีโนม Affymetrix GeneChip Mapping 500K array มีความเหมาะสมในการศึกษาเพื่อ genome wide study เนื่องจากมีจำนวน ~500,000 SNPs ต่อ 1 Chip ทั้งนี้เป็น SNPs ที่ปรากฏอยู่บน Hapmap project ถึง 70% เป็นอย่างน้อย ค่าเฉลี่ยของระยะห่างระหว่าง SNP มีค่า 2.5 kb. ได้มีผู้ทำการศึกษายืนยันพบว่า genotyping บน 500K Chip นี้สามารถตรวจสอบอ่าน SNPs ได้ถึง 98.8%, reproducibility มากกว่า 99.9%, และความถูกต้องแม่นยำมากกว่า 99.5%(71). ทั้งนี้ในการ genotyping 1 ครั้ง จะประกอบด้วย 250K array 2 arrays, โดยที่ Chip แรกต้องใช้ Nsp I restriction enzyme สามารถตรวจสอบได้ประมาณ 262,000 SNPs และ chip ที่ 2 ใช้เอนไซม์ Sty I ตรวจสอบได้ประมาณ 238,000 SNPs และด้วยความรู้ทาง Genetic epidemiology ที่มากขึ้นทำให้มีการพัฒนาสถิติในการวิเคราะห์จำนวน SNPs ที่มากเหล่านี้ให้นำมาใช้ได้ง่ายขึ้น ได้แก่ BRLMM Analysis Tool มีมาพร้อมโปรแกรมในเครื่อง Affymetrix microarray หรือ SNIper-HD (72) ที่มีในเว็บไซต์สามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลในปริมาณมากได้ high-density Illumina Human 610-Quad microarray เป็น microarray อีกชนิดที่มีจุดเด่นคือ SNPs ที่อยู่บน array เป็น Haplotyped tagging SNPs ที่คัดเลือกมาจาก Hapmap database ดังนั้น SNP แต่ละจุดจะเป็นตัวแทนของ haplotype block แต่ละตำแหน่ง

อย่างไรก็ตามด้วยวิธี genome wide study ที่กล่าวมาข้างต้นต้องใช้ทุนสูงมาก ได้มีกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ทำการศึกษา High-throughput association study ใน Pooled genomic DNA ด้วยวัตถุประสงค์เพื่อการลดเวลา แรงงานและเงินทุน โดยยังคงความแม่นยำถูกต้องเชื่อถือได้ (73). Craig DW. และคณะ และ Butcher และคณะ (74-78) ได้ทำการการศึกษาเพื่อทดสอบความถูกต้องแม่นยำของการทำ Genotyping เปรียบเทียบ estimated SNP allele frequencies จาก Pooled Genomic DNA และ actual allele frequencies จาก individual genotyping ในประชากรที่ทำการศึกษา ด้วยการทำ Genotyping บน 10K และ 100K GeneChip DNA array ตามลำดับพบว่าได้ค่า Correlation = 0.97 ซึ่งแสดงถึงความแม่นยำของการใช้ Microarray platform บน Pooled genomic DNA นอกจากนี้พบว่าถ้าเป็นการศึกษาเปรียบเทียบ Estimated allele frequencies ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้ Pooled DNA จากทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าค่าเฉลี่ยความผิดพลาดมีเพียง 1-2%. และ power ของการศึกษา



เปรียบเทียบ association study ที่ทำบน Pooled DNA ไม่แตกต่างจาก case control ปกติ(79) ได้มีตัวอย่างโรคที่ทำการศึกษาดังวิธี genome wide association study ใน Pooled DNA เปรียบเทียบกลุ่มที่เป็นโรคและกลุ่มควบคุม(80-83) ประสบผลสำเร็จมาแล้วหลายโรค ได้แก่โรคมะเร็งหลอดอาหาร โรคทางจิตเวช โรคข้ออักเสบ Rheumatoid arthritis เป็นต้น ตลอดจนการพัฒนาวิธีการทางระบาดวิทยา และสถิติที่จะนำมาหา estimated allele frequencies มีมากขึ้น(75, 84) และใช้ง่ายขึ้นมีการทำเป็นโปรแกรมที่ใช้สะดวกได้แก่ Pool DNA analyzer(85)

จากการพัฒนาการทางด้าน Genetic epidemiology ประกอบกับการพัฒนาของ Human genome project และ HAPMAP database ร่วมกับความรู้อันเกี่ยวกับ SNPs ใน genome ความสัมพันธ์ของ SNPs ในแบบ Linkage disequilibrium นำไปสู่การศึกษาโดยใช้ Dense genetic markers genome wide association study ในการศึกษาหาโรคที่เกี่ยวข้องกับ Complex diseases มากขึ้น ตลอดจนการพัฒนาทั้งเทคนิคการทำ High throughput genotyping และวิธีการศึกษาบน Pooled DNA เพื่อคัดกรองหาโรคที่เป็นสาเหตุของโรค ผู้วิจัยเล็งเห็นว่าโรค THPP นี้เป็นโรคที่พบบ่อยในประเทศแถบเอเชียมากกว่าในชนผิวดำยุโรป อเมริกา ประกอบกับการศึกษาโดยใช้วิธี Genome-wide association study และ Pooled DNA analysis ในโรคนี้นี้ไม่เคยมีมาก่อน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีขึ้นเพื่อหาโรค หรือ SNPs ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ของ Single Nucleotide Polymorphisms ของยีน Calcium, Sodium และ Potassium ion channel ที่พบมากที่กล้ามเนื้อลายและ Na⁺-K⁺ ATPase subtype ต่างๆ โดยวิธีเทียบความแตกต่างของ SNPs allele frequencies และ Haplotype frequencies ระหว่างผู้ป่วย THPP และกลุ่มควบคุม

2. เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ของ Single Nucleotide Polymorphisms ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค THPP (นอกเหนือจาก ion channel genes และ Na⁺-K⁺ ATPase subtype ต่างๆ) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่ของ SNPs allele frequencies และ Haplotype frequencies ระหว่างผู้ป่วย THPP และกลุ่มควบคุม

3. เพื่อศึกษาหาความผิดปกติของยีน (Mutation screening) ที่อยู่ใกล้กับ SNPs ที่สัมพันธ์กับโรค THPP ที่ได้จาก Whole genome scan ด้วยวิธี direct sequencing ทั้งบริเวณ exons, exon-intron boundary และ promoter เพื่อหาสาเหตุทางพันธุกรรมโดยตรงหรือเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค THPP

โดยรูปแบบการศึกษาเป็นการตรวจสอบหาความสัมพันธ์ของความถี่ของ SNPs ที่พบในผู้ป่วย THPP เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ GWAS approach การศึกษานี้ผู้วิจัยวางแผนการศึกษาเป็น 2 รูปแบบเปรียบเทียบกัน ได้แก่

1. การตรวจสอบหาความสัมพันธ์ของ SNPs ทั้งจีโนมด้วยวิธี Whole-genome pooled DNA analysis โดยการตรวจสอบด้วยเครื่องมือ DNA microarray platform ได้แก่ AffyMetrix GeneChip

500K array ซึ่งเป็นการตรวจหา SNPs 500,000 SNPs ทั้งจีโนมใน 2 กลุ่มของ DNA pooled แต่ละกลุ่มการศึกษา

2. การตรวจสอบหาความสัมพันธ์ของ SNPs ทั้งจีโนมด้วยวิธี Individual genome-wide association study (GWAS) ด้วย Illumina microarray platform ได้แก่ Illumina Human-Hap610 Genotyping BeadChip (San Diego, CA) ซึ่งเป็นการตรวจหา SNPs 610,000 SNPs ทั้งจีโนมใน 2 กลุ่มการศึกษา

และเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผลการศึกษาชนิดผลบวกหลงและผลลบหลงดังที่พบในการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยได้วางแผนทำการศึกษาใน 2 กลุ่มประชากรที่เรียกว่า test cohort และ replication cohort ผลที่ได้จากการศึกษา GWAS ของ test cohort จะนำมาทดสอบใน replication cohort และสุดท้ายเมื่อได้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคแล้วจะทำการทดสอบหน้าที่ของยีนหรือ SNPs นั้นต่อไป