

บทวิจารณ์

กลุ่มอาการและอาการแสดงThyrotoxic hypokalemia periodic paralysis

เป็นโรคที่พบบ่อยในชาวเอเชียและเพศชายกลุ่มประชากรที่ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงระยะเวลา 3 ปีและนำมาศึกษาพบว่าเป็นเพศชายทั้งหมดและสาเหตุของโรคที่ทำให้เกิดภาวะไทรอยด์คือGraves' diseaseช่วงอายุที่พบบ่อยอยู่ในระหว่าง 40-60 ปีซึ่งไม่ต่างจากโรคไทรอยด์เป็นพิษในเพศชายทั่วไปสิ่งที่พบเป็นสาเหตุปัจจัยเสี่ยงคือการออกกำลังกายหนักและการทานอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงในการศึกษาได้คัดเลือกกลุ่มควบคุมมาจากผู้ป่วยชายที่มีภาวะไทรอยด์เป็นพิษแต่ไม่พบอาการอ่อนแรงและระดับโพแทสเซียมต่ำเพื่อเป็นการลดconfounding factors ที่อาจจะมีจากการเกิดภาวะไทรอยด์เป็นพิษและเป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของสาเหตุทางพันธุกรรมที่ทำให้มีอาการและอาการแสดงของhypokalemic periodic paralysis เท่านั้น

การศึกษาเพื่อหาสาเหตุทางพันธุกรรมของโรคTHPP ด้วยวิธีGWAS-pooled DNA

การศึกษาด้วยวิธีPooled DNA analysis เป็นวิธีที่ประหยัดและทำได้ง่ายจากการศึกษาที่ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าผลจากการคำนวณหาestimated allele frequencies เทียบกับactual frequencies ไปในทิศทางเดียวกันกล่าวคือมีค่า allele frequencies ของallele T ที่ตำแหน่งrs749120= 0.44ใน THPP case และ 0.61 ใน control เปรียบเทียบกับ 0.43 และ 0.66 ใน actual frequencies ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่6วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ประหยัดและเหมาะสมสำหรับหาestimated allele frequencies อย่างไรก็ดีเมื่อนำมาคำนวณหาความแตกต่างของallele frequencies เพื่อหาพื้นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคพบว่าไม่แม่นยำนักดังในผลการแสดงที่พบว่าเมื่อทำการ individual genotyping ในประชากร 156 คน ค่าความแตกต่างของ allele frequencies ไม่ต่างกันระหว่าง 2 กลุ่มการทดลอง ต่างจากที่คำนวณได้ใน pooled DNA analysis ดังแสดงในตารางที่ 8ที่ได้มีการ ขยายขอบเขตของ SNPs ที่นำมาทดสอบเป็น tagging SNPs ก็ไม่พบความสัมพันธ์ แสดงถึงผลบวกหลงที่เกิดจาก Pooled-DNA analysisสาเหตุอาจจะเกิดได้จากการทำpooled DNA analysis เดิมนั้นโดยมากทำกันบนAffymetrix 100K arrays platforms(86-87)การศึกษานำร่องโดยคณะผู้วิจัยได้ใช้ 10K Mapping GeneChip array XBA2.0 ทดสอบใน Pooled genomic DNA(88)ดังบทคัดย่อในเอกสารภาคผนวก 1 โดยเป็นการศึกษาคนไข้โรค THPP 50 คน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษชายไทยแต่ไม่มีอาการผิดปกติทางระบบประสาท 50 คน หลังจากได้รับการเซ็นยินยอมให้ทำการวิจัยแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาด้วยวิธีเปรียบเทียบความถี่ของ SNPs ด้วยวิธีตรวจสอบบน 10K Mapping GeneChip array XBA2.0 ด้วยเครื่อง AffyMetrix microarray ในการตรวจสอบนี้เป็นการตรวจสอบ SNPs ทั้งจีโนมเช่นกัน แต่ด้วยความถี่ไม่มากกล่าวคือประมาณ 10,000 SNPs ต่อ 1 GeneChip ในการศึกษา นำร่องนี้ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค Pooled DNA นั่นคือรวม DNA 50 คนจากกลุ่ม THPP ทดสอบบน 1 Chip และ 50 คนจากกลุ่มควบคุม ทดสอบบน 1 Chip และทำการทดสอบเช่นนี้ 2 ครั้ง (Duplication) จากผลการศึกษา ทำให้เราสามารถพบความสัมพันธ์ของ SNPs ที่อยู่บน chromosome X ใกล้กับยีน GABRA3

และยังสามารถพิสูจน์ความถูกต้องของการประมาณค่า SNP allele frequencies จาก Pooled DNA

เปรียบเทียบกับค่า Actual allele frequencies ที่ได้จากการตรวจในผู้ป่วยแต่ละคน

แต่ในการศึกษานี้เพื่อให้ได้จำนวน SNPs ที่จะนำมาคัดกรองทดสอบมากขึ้น ผู้วิจัยใช้ 500K arrays ซึ่งค่าความคลาดเคลื่อนของการอ่าน signal อาจจะมีมากกว่า อันจะนำไปสู่ estimated allele frequencies มีความผิดพลาดมากกว่าที่ทำการศึกษาใน 10K arrays อีกสาเหตุหนึ่งอาจจะเกิดจากการใช้ algorithm ในการหาความแตกต่างของ estimated allele frequencies ผู้วิจัยใช้ค่าความต่างของ RASav ที่มีค่า SD ต่ำที่สุด จากวารสารทางการแพทย์ที่มีมาก่อนหน้านี้ใช้โปรแกรม genepool(89)

ผลการศึกษา genetic association study ของยีนด้วยวิธี candidate ion channel genes

เนื่องจากทฤษฎีความเชื่อที่ว่า ความผิดปกติของ THPP น่าจะอยู่ใกล้เคียงกับตำแหน่งของ ion channel genes เนื่องจากอาการแสดงที่คล้ายคลึงกับโรค Familial HypoK PP ซึ่งเป็นโรคที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ mendelian ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ ion channel genes และการศึกษาที่มีมาในอดีตเป็นทดสอบโดยใช้ candidate gene mutation screening นั่นคือเลือกเฉพาะ known mutation ที่มีรายงานใน Familial HypoK PP มาทดสอบใน THPP ซึ่งส่วนมากให้ผลลบนั้น ผู้วิจัยมีความเห็นว่าอาจจะมีความผิดพลาดในการคัดกรองความสัมพันธ์ของยีนเหล่านี้และโรค THPP เป็นไปได้ที่อาจจะมีความสัมพันธ์ของยีน และ THPP แบบ linkage disequilibrium ดังนั้นจึงได้ออกแบบการศึกษาโดยทำการคัดกรองโดย genotyping tagging SNPs จำนวนทั้งสิ้น 116 SNPs ที่อยู่ใกล้ candidate ion channel genes ได้แก่ *SCN4A*, *CACNA1S*, *GLRA1*, และ *GABRA3* genotyped ในผู้เข้าร่วมวิจัย 156 คน เพื่อหาความสัมพันธ์กับโรค THPP โดยใช้ candidate gene approach ดังในรายละเอียดตารางที่ 8 พบว่า allele frequencies และ genotype frequencies ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม THPP case และ กลุ่มควบคุม ในทุก model analysis ผลการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้(59, 61, 90) ที่มีรายงานพบการกลายพันธุ์ของยีน *CACNA1S*, *KCNE3*, และ *SCN4A* ใน THPP นั้น Lane AH และคณะได้รายงาน(91)การพบการกลายพันธุ์ R672S transition ที่ยีน *SCN4A* ซึ่งสร้างโปรตีน voltage-gated sodium channel ของกล้ามเนื้อลายในครอบครัวชาวฝรั่งเศสครอบครัวหนึ่ง ผู้ป่วยชาวฝรั่งเศสรายนี้มีประวัติ Familial HypoK PP ในครอบครัว ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าคนไข้ที่รายงานเป็นผู้ป่วยที่มี 2 ภาวะได้แก่ THPP และ FHPP เนื่องจากผู้วิจัยหลักไม่ได้รายงานอาการแสดงของผู้ป่วยหลังจากที่หายจากภาวะไทรอยด์เป็นพิษ ว่ามีอาการของ hypokalemic periodic paralysis กลับซ้ำเองหรือไม่ กรณีของการพบการกลายพันธุ์ R83H ของยีน *KCNE3* ที่สร้างโปรตีน voltage-gated potassium channel, *MIRP2* ในผู้ป่วยโรค THPP ชาวโปรตุเกสที่พบโดย Dias da Silva MR (92) ในปี คศ. 2002 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับที่พบใน FHPP รายงานโดย Abbott GW (61) นั้น ในปี คศ. 2003 Sternberg D. (93) รายงานพบ genetic variants เดียวกันในประชากรปกติที่ไม่มีอาการอ่อนแรง และกลับมพบความสัมพันธ์ของ R83H ที่ *KCNE3* และโรค FHPP

การอนุมานว่าความผิดปกติของ THPP จะคล้าย FHPP นั้นอาจจะไม่ถูกต้องเนื่องจาก 2 โรคนี้ยังมีความแตกต่างกัน กล่าวคือ อาการอ่อนแรงเป็นพักๆของ THPP จะหายไปและไม่เกิดอีกเลยเมื่อภาวะ ไท

อรยต์เป็นพิษหายขาด ซึ่งต่างจากโรค FHPP ที่มีอาการตั้งแต่เด็กและเป็นตลอดชีวิต ดังนั้น ผลการศึกษาที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าไม่มีความผิดปกติของ ion channel เหล่านี้ใน THPP ชาวไทย และกลไกการเกิดโรค THPP และ FHPP น่าจะแตกต่างกัน

ผลการศึกษา Fine mapping ด้วย SNPs ที่ใกล้ intron3 ของ GABRA3 โดย genetic association study

เนื่องจากคณะผู้วิจัยได้รายงานก่อนหน้านี้(88) ถึงความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ของ GABRA3 และโรค THPP โดยใช้ DNA pooling genotyped บน Affymetrix 10K GeneChip microarray ซึ่งประกอบด้วย 10204 SNPs ระยะห่างระหว่าง SNPs มีค่าเฉลี่ย 113 Mb ในการศึกษาดังกล่าวเราพบความสัมพันธ์ของ rs750841 และ rs12688628 ซึ่งอยู่ที่ intron ของยีน GABRA3 บนโครโมโซม X. ในการศึกษาที่ต้องการลดระยะห่างระหว่าง SNPs โดย genotyping ด้วยเทคนิค multiplex allele specific PCR และใช้ Invader assay platform ซึ่งเป็นวิธีการ genotyping ที่รวดเร็ว เชื่อถือได้ สามารถทำปฏิกิริยา PCR ได้ครั้งละ 3-11 คู่ของ primers. ในงานวิจัยนี้ได้รับรวมผู้ป่วยมากขึ้นกว่าที่มีรายงานในวารสารเดิม และได้ทำการคัดเลือก htSNPs 55 SNPs และพบว่ามี 25 htSNPs ระหว่างตำแหน่ง 151216374 และ 151274256 บนโครโมโซม X ใกล้ intron3 ของยีน GABRA3 สัมพันธ์กับการเกิดโรค THPP และผลการทำ direct sequencing exon 2,3, 4 ของยีน GABRA3 ไม่พบความผิดปกติที่ exon เหล่านี้ เป็นการยืนยันความสัมพันธ์ที่พบเดิม

ยีน GABRA3 สร้างโปรตีน GABA receptor $\alpha 3$ subunit บนโครโมโซม Xq28 ที่ตำแหน่ง 151,087,188-151,370,486 bp (Build 36.3). จากการที่ยีนที่พบมีความสัมพันธ์นี้อยู่บนโครโมโซม X เป็นสิ่งที่อาจจะอธิบายว่าเหตุใด THPP จึงพบมากในผู้ป่วยชาย และเป็นไปได้ที่การแสดงออกของ THP เป็นชนิด recessive อย่างไรก็ดีในปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายได้ว่าเหตุใด ความเปลี่ยนแปลงที่ GABRA3 ยีนจึงมีผลต่อการอ่อนแรงและระดับโปแทสเซียมเข้าเซลล์ Puia G และ Losi G(94) ได้ทำการทดลองให้ ฮอร์โมนไทรอยด์ T3 และ T4 พบว่ามีผลต่อการทำงานของ ระบบการทำงานของ GABA neurotransmission ในสมองส่วน hippocampus. แต่จวบจนปัจจุบันไม่มีรายงานของ GABA ในการทำงานของกล้ามเนื้อลายการที่พบความสัมพันธ์ของ genetic variant ที่ intron อาจจะมียับยั้งต่อการแสดงออกของยีนที่เรียกว่า intron-mediated regulation of gene expression(95). ซึ่ง intron เหล่านี้มีคุณสมบัติพิเศษคือมักอยู่ใกล้ transcribed sequences และ SNPs ที่เราพบว่ามีความสัมพันธ์กับ THPP นั้นอยู่ที่ intron 3 ใกล้ regulatory part ของ GABRA3 ยีนที่ exon 1

ผลการศึกษา genetic association study ของโรค THPP ด้วยวิธี GWAS

การศึกษานี้เป็นการศึกษา GWAS แรกที่ทำในโรค THPP และทำให้เรา พบ SNP rs623011 ที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค THPP ผลการวิเคราะห์จากการรวมทั้ง 2 กลุ่มการศึกษา (test และ replication cohort) ทำให้ความสัมพันธ์ของ SNP นี้และโรค THPP มีค่า p value ต่ำถึง $P = 3.71 \times 10^{-12}$ ซึ่งเป็น genome wide significant และได้รับการยืนยันผลที่ได้ใน replication cohort

เร็วๆนี้ในปี คศ 2010 Ryan และคณะ(96)ได้รายงานการพบการกลายพันธุ์ ของยีน *KCNJ18* ซึ่งเป็นยีนใหม่ที่พบว่าสร้างโปรตีน inwardly rectifying potassium (Kir) channel, Kir2.6 ยีนนี้ถูกค้นพบ โดยการคัดกรองหา potassium channel ที่มีแสดงออกที่กล้ามเนื้อลายและมีลักษณะ basepairs ที่เรียกว่า thyroid hormone response elements (TREs) ที่ตำแหน่ง promoter ทำให้พบว่ามียีน *KCNJ18* บนโครโมโซม 17 ซึ่งพบมีลักษณะ basepairs คล้าย *KCNJ12* ถึง 99% คณะผู้วิจัยได้ทำการ direct sequence ยีนนี้ในผู้ป่วยโรค THPP 269 คนจากหลายเชื้อชาติ ได้แก่ คอรัเคเซียน ได้แก่ ฝรั่งเศส และ อเมริกา บราซิล ฮังการี สิงคโปร์ และ ไทยและพบ 5 missense mutations (R205H, T354M, K366R, R399X, และ Q407X) และ 1 frameshift mutation ที่นำไปสู่การเกิด stop codon ที่ตำแหน่ง amino acid 144 (I144fs) อย่างไรก็ดี mutation เหล่านี้โดยมากรายงานในชาวบราซิลและ คอรัเคเซียน และไม่พบ mutation ดังกล่าวเลยในประชากรไทยและพบ mutation เพียง 33% ของผู้ป่วยชาวคอรัเคเซียนและ บราซิล (5/30) จากการค้นพบ การกลายพันธุ์ของ *KCNJ18* ความสัมพันธ์ของ *GABRA3* และโรค THPP บ่งชี้ถึงภาวะ genetic heterogeneity สำหรับผู้ป่วยไทยที่เข้าร่วมการศึกษาของ Ryan และคณะจำนวน 31 คน เป็นส่วนหนึ่งของประชากรที่อยู่ใน การศึกษา

SNP rs623011 ที่พบมีความสัมพันธ์กับโรค THPP นั้นอยู่ที่ตำแหน่ง -75 Kb downstream จาก ยีน *KCNJ2* ของโครโมโซม 17 ยีนดังกล่าวสร้างโปรตีน Inward-rectifying K⁺ channel Kir2.1, ซึ่งแสดงออกมากที่กล้ามเนื้อลายและหัวใจ which is highly expressed in cardiac and skeletal muscle. เนื่องจาก SNPs อยู่ใกล้ *KCNJ2* ผู้วิจัยได้ทำการตรวจ direct sequencing ของยีน *KCNJ2* ในผู้ป่วยทุกคนและไม่พบความผิดปกติ ซึ่งได้มีรายงานมาก่อนหน้าที่ที่มีผู้พยายาม screen mutation ใน *KCNJ2* (97)และไม่พบความผิดปกติเช่นกัน แม้จะยังไม่ทราบผลของ SNP rs623011 และการเกิด THPP แต่พบว่ายีนดังกล่าวนี้น่าสนใจ มีรายงานการเกิดการกลายพันธุ์ของ *KCNJ2* ทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า Andersen-Tawil syndrome (ATS หรือ Andersen syndrome) โรคนี้มีการถ่ายทอดแบบ autosomal dominant ทำให้เกิดกลุ่มอาการ 3 อย่างได้แก่หัวใจเต้นผิดจังหวะ อาการอ่อนแรง periodic paralysis, และหน้าตาที่ผิดปกติไป ทั้งนี้ผู้ป่วยแต่ละคนไม่จำเป็นต้องมีอาการแสดงผิดปกติครบทั้งหมดความน่าจะเป็นของ rs623011 ต่อการแสดงออกของยีน *KCNJ2* ในผู้ป่วยไทรอยด์เป็นพิษ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงาน ภาวะ ไทรอยด์เป็นพิษในผู้ป่วย ATSSyndrome

เนื่องจาก SNP นี้อยู่ห่างจาก *KCNJ2* ถึง 75 Kb การที่ SNP จะมีผลต่อการแสดงออกของยีนจะเป็นลักษณะที่เรียกว่า “long range regulator” เนื่องจากมีรายงานพบ regulatory elements สามารถอยู่ห่างจากยีนได้มากแม้กระทั่งอยู่บนคนละโครโมโซม (98). มีรายงานค้นพบในหนู transgenic mice พบมี enhancer “H” อยู่ที่ตำแหน่ง 75 kb หนัาต่อ 5'UTR ของ olfactory receptor gene cluster(99).

ผลการศึกษา functional study บนเซลล์ C2C12

- เนื่องจากการแสดงออกของโรค THPP โดยมากเป็นความผิดปกติของ เซลล์กล้ามเนื้อลาย ดังนั้นการเลือก C2C12 จัดเป็นเซลล์ที่เหมาะสม อย่างไรก็ดีการทำ primary cell culture ด้วยเซลล์กล้ามเนื้อจากผู้ป่วยโรค THPP โดยตรงจะให้ผลที่น่าเชื่อถือและใกล้เคียงความเป็นจริงที่สุด ซึ่งในทางปฏิบัติทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจาก เพราะอาการอ่อนแรงของโรคหายได้เองเมื่อ ไปแช่แข็งแยกออกจาก

เซลล์ ดังนั้นการทำ Muscle biopsy จะไม่เอื้อประโยชน์ในการรักษาโรคเท้าดันัก ทำให้ผู้ป่วยโดยมากไม่ยินยอม

- จากการศึกษาพบว่า การให้ฮอร์โมนไทรอยด์ในขนาดสูงโดยตรงไม่มีผลต่อการทำงานของเซลล์ แสดงว่าระดับฮอร์โมนไทรอยด์ที่สูงมากไม่มีผลต่อการเติบโต การหดตัว และการแสดงออกของ *GABRA3* ที่เซลล์กล้ามเนื้อโดยตรง หรืออาจจะเป็นไปได้ที่ T_4 ไม่สามารถไปกระตุ้นและจับกับ thyroid hormone receptor ในเซลล์ได้เนื่องจากตามปกติเซลล์ต้องมีการเปลี่ยน T_4 เป็น T_3 เพื่อจับกับตัวรับ ดังนั้นควรจะมี อีก 1 กลุ่มทดสอบที่เป็นกลุ่มที่ได้รับ T_3

- จากการศึกษา พบว่า การให้อินซูลินในขนาดสูงไม่มีผลต่อการทำงานของเซลล์ C2C12 โดยตรงแสดงว่าการให้อินซูลินปริมาณมากในเซลล์ปกติจะไม่มีผลต่อการเติบโต การหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อ และการแสดงออกของยีน *GABRA3* ที่เซลล์ C2C12

- อย่างไรก็ตามการศึกษา functional study นี้มีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ การเลือกเซลล์ mouse myoblast แทนที่ human THPP skeletal muscle cells, การที่ไม่สามารถวัดระดับ โพแทสเซียมในเซลล์ การศึกษาการทำงานของ ion channels ด้วยวิธี ion channel channelopathy.