

## Abstract (บทคัดย่อ)

---

**Project Code :** RSA5880019

(รหัสโครงการ)

**Project Title :** บทบาทของออโตแทกซินต่อพยาธิกำเนิดของพังผืดตับในโรคท่อน้ำดีตีบตัน  
(ชื่อโครงการ)

**Investigator :** ศาสตราจารย์นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ھرรรษาเวก  
(ชื่อนักวิจัย)

**E-mail Address :** sittisak.h@chula.ac.th

**Project Period :** 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2558      ถึงวันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2561  
(ระยะเวลาโครงการ)

โรคท่อน้ำดีตีบตันเกิดจากความผิดปกติของท่อน้ำดีทำให้เกิดการคั่งของน้ำดีในทารกแรกคลอด สาเหตุของโรคท่อน้ำดีตีบตันยังไม่มีเป็นที่ทราบแน่ชัด วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง ระดับโปรตีนออโตแทกซิน (autotaxin) การแสดงออกระดับ mRNA ระดับ promoter methylation ของยีนออโตแทกซิน ความยาวของเทโลเมียร์ ระดับ global methylation (Alu and LINE-1) และภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) กับอาการทางคลินิก ในผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันภายหลังจากการรักษาด้วยการผ่าตัด จำนวน 130 ราย และกลุ่มควบคุมซึ่งมีสุขภาพดี ผลการศึกษาพบ ระดับโปรตีนออโตแทกซินเพิ่มสูงขึ้นในเลือดของกลุ่มผู้ป่วย และสัมพันธ์กับภาวะตัวเหลือง ภาวะเซลล์ตับถูกทำลาย และค่าพังผืดตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีนออโตแทกซินเพิ่มสูงขึ้นในเลือดและในชิ้นเนื้อตับของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน และมีความสัมพันธ์แปรผกผันกับ DNA methylation บริเวณ promoter ของยีนออโตแทกซินในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนออโตแทกซินในชิ้นเนื้อตับด้วยวิธี immunohistochemistry พบการแสดงออกของโปรตีนออโตแทกซินบริเวณเซลล์บุผิวน้ำดีในตับ (liver bile duct epithelia) และในเซลล์ตับ (hepatocytes) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งสอดคล้องกับระดับโปรตีนออโตแทกซินในเลือด นอกจากนี้ความยาวของเทโลเมียร์ในเลือดของกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันสั้นกว่ากลุ่มควบคุม และสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาความสัมพันธ์ของระดับ global methylation ความยาวของเทโลเมียร์ และภาวะเครียดออกซิเดชัน พบระดับ global methylation ในกลุ่มผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตันต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม ซึ่งสัมพันธ์กับความยาวของเทโลเมียร์ และภาวะเครียดออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่า ระดับโปรตีนออโตแทกซิน การแสดงออกระดับ mRNA ของยีนออโตแทกซิน ระดับ promoter methylation ของยีนออโตแทกซิน ความยาวของเทโล

เมื่อระดับ global methylation และภาวะเครียดออกซิเดชัน มีความสัมพันธ์กับลักษณะอาการทางคลินิกของผู้ป่วยโรคท่อน้ำดีตีบตัน ซึ่งอาจจะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทำนายความรุนแรงของโรคท่อน้ำดีตีบตันโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีพังผืดตับ และช่วยทำให้ความเข้าใจกลไกและพยาธิกำเนิดของการเกิดพังผืดตับในโรคตับเรื้อรังรวมทั้งโรคท่อน้ำดีตีบตันได้ดียิ่งขึ้น

Biliary atresia (BA) is a devastating cholestatic liver disorder in neonates characterized by inflammatory and fibrotic obliteration of the extrahepatic bile ducts. The obstruction of bile flow presents as a triad of jaundice, acholic stool, and hepatosplenomegaly. If left untreated, the most of BA patients will develop severe hepatic fibrosis, biliary cirrhosis, portal hypertension, hepatic failure, and ultimately die by the age of 2 years. Surgical treatment, which remains the standard of care for first line intervention for infants with BA, is the Kasai portoenterostomy. The etiology, pathogenesis, and factors modifying the disease progression remain largely mysterious. However, more recently, it has been generally recognized that BA is perhaps not a single disease entity. Instead, it is proposed that several distinct pathologic mechanisms can lead to a BA phenotype characterized by provoking a stereotypic response comprised of inflammation, autoimmune-mediated bile duct damage, bile duct proliferation, apoptosis, and progressive portal fibrogenesis. Lack of reliable noninvasive diagnostic biomarkers of BA may leads to delayed diagnosis and worse patient outcome. Hence, the identification of noninvasive biomarkers to assess liver fibrosis is desirable. The purpose of this study was to investigate autotaxin (ATX), relative telomere length (RLT), global DNA methylation and oxidative stress whether these biomarkers could be related to liver stiffness and outcome parameters of liver fibrosis in BA. One hundred and thirty postoperative BA patients and age-matched healthy controls were enrolled. We found that BA patients had higher circulating ATX and liver stiffness than controls. Our findings showed that elevated circulating ATX was associated with status of jaundice, hepatic dysfunction, and liver stiffness in postoperative BA. In addition, the current study provides evidences for up-regulation of ATX mRNA expression in liver specimens of BA patients compared to those in controls. The up-regulation of ATX expression in BA liver samples was performed with immunohistochemical detection of ATX within the liver bile duct epithelia and the hepatocytes. ATX mRNA expression was also significantly elevated and correlated with a decrease in ATX promoter methylation in BA patients compared to the controls. Moreover, this study supports the association between RLT in peripheral blood leukocytes and higher risk of liver fibrosis in BA. RLT in blood leukocytes was also

associated with disease severity, showing that BA patients with advanced-stage exhibited excessive telomere shortening. Additionally, this study reported that, independent of risk factors, hypomethylation of retrotransposable DNA elements (Alu and LINE-1) was associated with shorter telomeres, elevated oxidative DNA damage, and a higher risk of liver fibrosis in BA. Based on the aforementioned findings, combinations of circulating ATX levels, hepatic ATX expression, relative telomere length, global DNA methylation, and oxidative DNA damage could serve as possible noninvasive biomarkers reflecting the disease severity and the development of liver fibrosis in the post Kasai BA patients. Autotaxin could play a crucial role in the pathogenesis of liver fibrosis in chronic liver disease including biliary atresia.

**Keywords : Biliary atresia, Autotaxin, Liver fibrosis, Global methylation, Telomere length**  
(คำหลัก)

#### **Executive summary**

This study showed that decreased methylation of specific CpGs were observed at the ATX promoter in BA patients. Subsequent analysis revealed that BA patients with advanced stage had lower methylation levels of ATX promoter than those with early stage. ATX promoter methylation levels were found to be associated with hepatic dysfunction in BA. In addition, ATX expression was significantly elevated and correlated with a decrease in ATX promoter methylation in BA patients compared to the controls. Moreover, promoter hypomethylation and overexpression of ATX were inversely associated with jaundice status, hepatic dysfunction, and liver stiffness in BA patients. These findings suggest that the promoter hypomethylation and overexpression of ATX might play a contributory role in the pathogenesis of liver fibrosis in BA. BA patients had significantly shorter telomeres than healthy controls. The RTL in BA patients with jaundice was significantly lower than that of patients without jaundice. Alu and LINE-1 hypomethylation, and telomere shortening were found to be associated with elevated risk of BA. Furthermore, LINE-1 methylation was associated with liver stiffness in BA patients. Stratified analysis revealed negative correlations between Alu and LINE-1 methylation and 8-OHdG in BA patients. In contrast, positive relationships were identified between Alu and LINE-1 methylation and relative telomere length in BA patients. These findings suggest that retrotransposon hypomethylation is associated with plasma 8-OHdG and telomere length in BA.