



การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *UGT3A1* ในตัวแทนประชากรมุสลิม
ในจังหวัดสงขลา

**The Study of *UGT3A1* Polymorphism in Representative Muslim Population at
Songkhla Province**

พิชญา หอยสังข์

Pichaya Hoisang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *UGT3A1* ในตัวแทนประชากรมุสลิม
ในจังหวัดสงขลา

**The Study of *UGT3A1* Polymorphism in Representative Muslim Population at
Songkhla Province**

พิชญา หอยสังข์

Pichaya Hoisang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *UGT3A1* ในตัวแทน
 ประชากรมุสลิมในจังหวัดสงขลา
 ผู้เขียน นางสาวพิชญา หอยสังข์
 สาขาวิชา เกษษวิชา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันดี อุคมอักษร)

.....ประธานกรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร. วีรวรรณ อุชายภีชาติ)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันดี อุคมอักษร)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา สุขเกษศิริ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรวิทยา

.....
 (ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ศักดิ์ ฟ้ารุ่งสว่าง)
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคล
ที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผศ. ดร. วันดี อุดมอักษร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวพิชญา หอยสังข์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวพิชญา หอยสังข์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน <i>UGT3A1</i> ในตัวแทนประชากรมุสลิมในจังหวัดสงขลา
ผู้เขียน	นางสาวพิชญา หอยสังข์
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการ Phase II drug metabolism ในปัจจุบัน UGTs จะแบ่งได้เป็น 4 families หลัก คือ UGT1, UGT2, UGT3 และ UGT8 โดย UGT3 จะมี 2 ชนิด คือ UGT3A1 และ UGT3A2 โดย UGT3A1 มี substrates หลัก คือ ursodeoxycholic acid (UDCA) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม bile acids และ 7 β -hydroxycholesterol ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของ oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) ที่ก่อให้เกิด plaque ในหลอดเลือด ดังนั้นการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ที่มีผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งอาจก่อให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดน้ำดี ส่งผลให้เกิดโรคนิ่วในถุงน้ำดีและอาจทำให้มีความเสี่ยงในการเกิด atherosclerosis ได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในประชากรชาวมุสลิมในจังหวัดสงขลา เพื่อตรวจหาความถี่แอลลีลในการเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมในบริเวณ promoter exon 1 และ exon 4 ในตัวอย่างเลือดจากสายสะดือของทารกแรกเกิดที่คลอดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา เป็นจำนวน 97 ตัวอย่าง โดยทำการออกแบบ primer และ polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนที่ต้องการแล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนยีน ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis และส่งตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) เพื่อตรวจสอบตำแหน่งการกลายพันธุ์

ผลการศึกษาพบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ทั้งหมด 2 ตำแหน่งคือ novel SNPs บริเวณ โปรโมเตอร์ (-219A>G) 1 ตำแหน่ง และ known SNPs บริเวณ exon4 (361T>G) (C121G) 1 ตำแหน่ง โดยในตำแหน่ง exon 4 มีความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) ของ homozygous mutation อยู่ที่ 0.044 และมีความถี่ของ heterozygous mutation อยู่ที่ 0.332 สำหรับในตำแหน่งการกลายพันธุ์ -219A>G มีความถี่จีโนไทป์ของ homozygous mutation อยู่ที่ 0.011 และความถี่แอลลีล (allele frequency) ของการกลายพันธุ์ทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยเรียงลำดับจากความถี่สูงไป

ตำแหน่งนี้ 361T>G (0.21) และ -219A>G (0.01) จากการวิเคราะห์สมมูลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของยีน *UGT3A1* ทั้ง 2 แบบ พบว่าการกลายพันธุ์ในตำแหน่งซึ่งอยู่ในบริเวณ exon 4 (361T>G) เป็นไปตามกฎของฮาร์ดีไวน์เบิร์กและในตำแหน่งบริเวณโปรโมเตอร์ (-219A>G) ไม่เป็นไปตามกฎของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

สามารถสรุปได้ว่าความถี่แอลลีลของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ที่ตำแหน่ง 361T>G (allele frequency (0.21)) ในทารกแรกเกิดที่คลอดที่โรงพยาบาลสงขลา มีความใกล้เคียงกับคนเอเชียอื่น เช่น ญี่ปุ่นและจีน (allele frequency (0.249)) โดยการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ที่ตำแหน่งดังกล่าวทำให้เอนไซม์ไม่ทำงาน ทำให้ไม่สามารถกำจัดกรดยูริกได้ จึงอาจส่งผลให้เกิดภาวะคั่งของน้ำดีได้ง่ายกว่าคนที่มียีนปกติ อีกทั้งอาจจะเป็นตัวบ่งชี้ในการทำงานความเสี่ยงของการเกิด atherosclerosis อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจยีน *UGT3A1* ก่อนการรักษาด้วยยาที่เป็น substrate ของเอนไซม์ *UGT3A1* เพื่อป้องกันผลอันไม่พึงประสงค์จากยา ซึ่งอาจทำให้อาการคั่งของน้ำดีมีความรุนแรงขึ้น

Thesis Title	The study of <i>UGT3A1</i> polymorphism in representative muslim population at Songkhla province.
Author	Miss Pichaya Hoisang
Major Program	Pharmacology
Academic Year	2018

ABSTRACT

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are the important enzymes in phase II drug metabolism. UGTs are currently divided into 4 families: UGT1, UGT2, UGT3 and UGT8. There are two types of UGT3: UGT3A1 and UGT3A2. The main substrates of UGT3A1 are ursodeoxycholic acid (UDCA), a bile acids and 7 β -hydroxycholesterol, the main component of oxLDL which is the cause of plaque in arterial blood vessels. Thus, the mutation of the *UGT3A1* gene may lead to abnormalities in the metabolism of bile acids, then may cause gallstones in the gallbladder and may increase the risk of artherosclerosis. Therefore, this study aims to investigate the mutation of *UGT3A1* gene in muslim population in Songkhla province. To detect the allele frequency in the genetic variation in promoter, exon 1 and exon 4 area in 97 samples of neonates umbilical cord blood who was born at Songkhla Hospital, Songkhla province. The primer and PCR were used to increase the numbers of gene fragments and to determine the size of gene fragments by 1.5% agarose gel electrophoresis and DNA sequencing to detect the mutation.

The results of the study revealed two mutations in the *UGT3A1* gene: 1 novel SNPs at promoter region (-219A> G) and 1 known SNPs at exon 4 region (361T> G) (C121G). The mutation in exon 4 has genotype frequency of homozygous mutation (0. 044) and heterozygous mutation (0. 332) and the mutation at -219A> G, the genotype frequency of homozygous mutation is 0.011. Allele frequency of the two mutations, ranging from high to low are 361T> G (0.21) and -219A> G (0.01) . Based on the analysis of the Hardy–Weinberg equilibrium of both *UGT3A1* mutation, the mutation in exon 4 (361T> G) was followed to the Hardy–Weinberg equilibrium and at the promoter (- 219A>G) was not followed to the Hardy–Weinberg equilibrium.

It can be concluded that the allele frequency of *UGT3A1* gene mutation at 361T> G (allele frequency (0.249)) in neonates born at Songkhla Hospital was not differences from other Asian people such as Japan and China (allele frequency (0.20)). The mutation of the *UGT3A1* gene at this location causes an inactive enzyme. So the elimination of bile acid is abolished. This may result in congestion of the bile more easily than people who have normal gene. It may also be an indicator of arteriosclerosis risk. However, *UGT3A1* gene should be screened before treatment with a substrate of UGT3A1 to prevent adverse effects which may cause worsening of gallstone.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยการให้ความช่วยเหลือแนะนำของ ผศ. ดร. วันดี อุดมอักษร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำข้อคิดเห็น ตรวจสอบ และแก้ไขร่างวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ผู้เขียนจึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. วีรวรรณ อุชายภิกขิต ประชานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ และ ผศ. ดร. วนิตา สุขเกษศิริ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ท่านได้กรุณาชี้แนะแนวทาง และคำแนะนำตลอดจนข้อสังเกตต่าง ๆ ทำให้ผู้เขียนได้พัฒนาแนวความคิดและได้ระดมปัญหาต่าง ๆ ได้อย่างรอบคอบมากยิ่งขึ้นจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่ให้ทุนในการสนับสนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอบคุณเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท สาขาเภสัชวิทยาทุกคน ซึ่งเป็นเพื่อนและน้องที่น่ารักที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณในความห่วงใยและกำลังใจของครอบครัว ที่ส่งเสริมสนับสนุนให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสศึกษาต่อระดับปริญญาโทและคอยให้กำลังใจทั้งคอยช่วยเหลือสนับสนุนในทุก ๆ ด้านตลอดมาจนกระทั่งงานวิจัยครั้งนี้บรรลุผลสำเร็จ

พิชญา หอยสังข์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(5)
ABSTRACT.....	(7)
กิตติกรรมประกาศ.....	(9)
สารบัญ.....	(10)
รายการตาราง.....	(11)
รายการภาพประกอบ.....	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ.....	(13)
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการศึกษา.....	45
บทที่ 3 ผลการศึกษา.....	55
บทที่ 4 อภิปรายผลการศึกษา.....	65
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา.....	69
เอกสารอ้างอิง.....	71
ภาคผนวก.....	74
ก สำเนาหนังสือรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน จากเวชระเบียนและสิ่งส่งตรวจจากร่างกายมนุษย์.....	75
ข วิธีสุ่มตัวอย่างโดยไม่ซ้ำกันจากโปรแกรม Microsoft Excel.....	76
ค การคำนวณและวิธีการเตรียมสาร.....	77
ประวัติผู้เขียน.....	78

รายการตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปฏิกิริยาการแปรรูปยาชนิดต่าง ๆ ใน phase II reaction.....	5
2	substrates ของ UGT3A1.....	16
3	ความผิดปกติที่เกิดขึ้นของ <i>UGT3A1</i>	28
4	ข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับความถี่การกลายพันธุ์ของยีน <i>UGT3A1</i>	40
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน <i>UGT3A1</i> ที่ตำแหน่ง promoter exon 1 และ exon 4 ในประชากรไทยภาคใต้	49
6	Reaction mixture สำหรับการทำให้ PCR.....	51
7	ผลการวิเคราะห์สมดุสฮาร์ดีไวน์เบิร์กของการกลายพันธุ์ของยีน <i>UGT3A1</i> ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา (n=97).....	63
8	ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน <i>UGT3A1</i> กับเพศของทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา.....	63

รายการภาพประกอบ

ภาพ		หน้า
1	ตำแหน่งที่พบเอนไซม์ในกระบวนการ drug metabolism.....	6
2	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ drug metabolism.....	7
3	Phylogenetic tree ของ UDP-glycosyltransferase (UGTs) ที่พบในมนุษย์.....	8
4	โครงสร้างทางเคมีของสารและตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา glucuronidation.....	9
5	การทำงานของ UDP-glycosyltransferase.....	10
6	องค์ประกอบของยีน <i>UGT3</i>	11
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>UGT3A1</i> บนตำแหน่ง promoter และบริเวณ ที่มีการแปลรหัสของ exon1 ถึง 7.....	15
8	ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ <i>UGT3A1</i>	15
9	กรดน้ำดีที่พบในมนุษย์.....	20
10	วงจรของกรดน้ำดีในตับและลำไส้เล็ก.....	21
11	การสังเคราะห์ bile acids.....	22
12	โครงสร้างของ 7-oxo-cholesterol และ 7 β -hydroxycholesterol.....	24
13	การเกิดก่อตัวของ atherosclerotic plaques.....	25
14	ขั้นตอนในการทำ PCR (Polymerase Chain Reaction).....	33
15	PCR cycle ของการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของยีน <i>UGT3A1</i>	52
16	1.5% agarose gel electrophoresis ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>UGT3A1</i>	57
17	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>UGT3A1</i> บนตำแหน่ง promoter และบริเวณ ที่มีการแปลรหัสของ exon 1 ถึง 7.....	58
18	Electropherograms ของการกลายพันธุ์ของยีน <i>UGT3A1</i> ในบริเวณ promoter	60
19	Electropherograms ของการกลายพันธุ์ของยีน <i>UGT3A1</i> ในบริเวณ exon 4.....	62

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

%	=	percentage
7 β CH	=	7 β -hydroxycholesterol
7OxCH	=	7-oxocholesterol
ATF3	=	activating transcription factor 3
bp	=	base pair
CA	=	cholic acid
CDCA	=	chenodeoxycholic acid
cDNA	=	complementary DNA
Co.,ltd	=	Company Limited
CYP	=	cytochrome P450
DCA	=	deoxycholic acid
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxynucleoside triphosphate
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphate
DME	=	drug metabolizing enzymes
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
et al.	=	et alli (and others)
etc.	=	Et chtera
FMOs	=	flavin-containing monooxygenases
GCA	=	glycocholic acid
GCDCA	=	glycochenodeoxycholic acid
GLCA	=	glycolithocolic acid
GUDCA	=	glycoursodeoxycholic acid
Inc.	=	Incorporate
kb	=	kilo base pair
kDa	=	kilodaltons
LCA	=	lithocolic acid
LDL	=	low-density lipoprotein

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

Mg ⁺	=	magnesium ion
NaCl	=	sodium chloride
°C	=	degree Celsius
oxLDL	=	Oxidized low-density lipoprotein
<i>p</i>	=	<i>p</i> - value
PBREM	=	phenobarbital-responsive enhancer module
PCR	=	polymerase chain reaction
pH	=	potential of Hydrogen ion
REST	=	RE1 silencing transcription factor
RNA	=	ribonucleic acid
ROS	=	reactive oxygen/nitrogen species
RXRA	=	retinoid X receptor alpha
rpm	=	revolution per minute
S.E.	=	standard error of mean
SNP	=	single nucleotide polymorphism
SP1	=	specificity protein 1
<i>Taq</i> polymerase	=	<i>Thermus aquaticus</i> polymerase
TCA	=	taurocholic acid
TCDCA	=	taurochenodeoxycholic acid
TLCA	=	tauroolithocolic acid
TUDCA	=	tauroursodeoxycholic acid
UDCA	=	ursodeoxycholic acid
UDPGA	=	uridine diphosphate glucuronic acid
UDP-Glc	=	UDP-glucose
UDP-GlcA	=	UDP-glucuronic acid
UDP-GlcNAc	=	UDP- <i>N</i> -acetylglucosamine
UGT	=	UDP- glycosyltransferase
ZBTB33	=	transcriptional regulator Kaiso

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

Nucleotide

A	=	adenine
C	=	cytosine
G	=	guanine
T	=	thymine

Amino acid codes

One letter code	Three letter code	Amino acid	Possible codons
A	Ala	Alanine	GCA, GCC, GCG, GCT
B	Asx	Asparagine or Aspartic acid	AAC, AAT, GAC, GAT
C	Cys	Cysteine	TGC, TGT
D	Asp	Aspartic acid	GAC, GAT
E	Glu	Glutamic acid	GAA, GAG
F	Phe	Phenylalanine	TTC, TTT
G	Gly	Glycine	GGA, GGC, GGG, GGT
H	His	Histidine	CAC, CAT
I	Ile	Isoleucine	ATA, ATC, ATT
K	Lys	Lysine	AAA, AAG
L	Leu	Leucine	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
M	Met	Methionine	ATG
N	Asn	Asparagine	AAC, AAT
P	Pro	Proline	CCA, CCC, CCG, CCT
Q	Gln	Glutamine	CAA, CAG
R	Arg	Arginine	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGT
S	Ser	Serine	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
T	Thr	Threonine	ACA, ACC, ACG, ACT
V	Val	Valine	GTA, GTC, GTG, GTT
W	Trp	Tryptophan	TGG

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

One letter code	Three letter code	Amino acid	Possible codons
X	X	any codon	NNN
Y	Tyr	Tyrosine	TAC, TAT
Z	Glx	Glutamine or Glutamic acid	CAA, CAG, GAA, GAG
*	*	stop codon	TAA, TAG, TGA

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กระบวนการเปลี่ยนแปลงของยา (drug metabolism) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีของโมเลกุลยาให้มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี เป็นโมเลกุลที่มีขั้วและถูกขับออกทางปัสสาวะและน้ำดีได้ง่าย โดยกระบวนการ drug metabolism โดยใช้เอนไซม์ แบ่งออกเป็น 2 phases คือ phase I metabolism และ phase II metabolism (Larson et al., 2010) โดย phase I จะมีกระบวนการที่สำคัญคือ oxidation, reduction และ hydrolysis ซึ่งมีเอนไซม์ cytochrome P450 เป็นเอนไซม์หลัก ในการเติมหมู่ฟังก์ชันให้โมเลกุล และ phase II จะเกิดกระบวนการ conjugation ซึ่งเอนไซม์ที่พบมากที่สุดคือ phase II นี้คือ UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) ทำให้เกิดการควบจับกับ co-substrate ทำให้ได้ผลผลิตที่ละลายน้ำได้ดี (Evans & Relling, 1999)

ในปัจจุบัน UGTs จะแบ่งได้เป็น 4 families หลัก คือ UGT1, UGT2, UGT3 และ UGT8 (Mackenzie et al., 2008) UGT3 จะมี 2 ชนิด คือ UGT3A1 และ UGT3A2 สำหรับ UGT3A1 เป็นเอนไซม์ใน Phase II metabolism reaction ซึ่งจำเป็นต้องมี co-substrate เข้ามาช่วยในการทำงาน โดยจะมีการควบจับหมู่ น้ำตาลจาก UDP-sugar ไปยังโมเลกุลตัวรับต่าง ๆ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า UGT3A1 จะใช้ co-substrate เป็น UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) และจะไม่ทำปฏิกิริยากับ co-substrate ตัวอื่น เช่น UDP glucuronic acid (UDP-GlcUA), UDP glucose (UDP-Glc), UDP-galactose (UDP-Gal) และ UDP xylose (UDP-Xyl) โดย UGT3A1 จะมีหน้าที่เป็น UGTs (O-GlcA forming) ในการถ่ายโอน glucuronyl (GlcA) ของ co-substrate ไปยัง substrate เพื่อที่จะให้ substrate นั้นอยู่ในรูปของ glucuronides form จึงจะสามารถถูกขับออกนอกร่างกายได้ จากงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งศึกษาเกี่ยวกับ substrate ของ UGT3A1 นั้น พบว่า substrate หลักของ UGT3A1 ที่ใช้ co-substrate เป็น UDP-GlcNAc คือ ursodeoxycholic acid (UDCA) ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ bile acids โดยจัดเป็น กรดน้ำดีตติยภูมิ (tertiary bile acids) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงกรดน้ำดีทุติยภูมิภายในลำไส้เล็ก แต่พบว่าจะไม่เกิดปฏิกิริยากับกรดน้ำดีปฐมภูมิ (primary bile acids) (Meech, Lewis, Miners, & Mackenzie, 2012)

กรดน้ำดี (bile acids) เป็นสเตียรอยด์ที่สังเคราะห์จากโคเลสเตอรอลในตับโดยจะประกอบด้วยคาร์บอน 24 อะตอมที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่แอลฟาคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (3 α -hydroxysteroid) ในโมเลกุลของกรดน้ำดีจะมีทั้งบริเวณที่มีขั้วและบริเวณที่ไม่มีขั้วในโมเลกุล

เดียวกัน (amphipathic molecules) (Sombatheera, Proungvitaya, & Proungvitaya, 2014) กรดน้ำดีที่พบมากที่สุดคือ กรดคิโนดีออกซิโคลิก (chenodeoxycholic acid; CDCA) และ กรดโคลิก (cholic acid; CA) (Sombatheera et al., 2014) การสังเคราะห์กรดน้ำดีจากตับทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโคเลสเตอรอลในชีวิตประจำวันในมนุษย์ การขับออกของน้ำดีจะช่วยในการขับออกของไขมันออกจากร่างกายอีกทั้งยังมีส่วนช่วยในการขับออกของสารอื่น เช่น endogenous metabolites และ xenobiotics ในน้ำดีเมื่อไขมันและวิตามินที่ละลายในไขมัน (วิตามิน A, E, D และ K) จับตัวกับกรดน้ำดีและจะเกิดเป็นอนุภาคที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ออกมาในลำไส้เล็กหลังการกินอาหาร กรดน้ำดีส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมใน ileum และส่งกลับไปตับเข้าไปในถุงน้ำดี (Li & Chiang, 2014) การทำงานของ UGT3A1 ต่อกรดน้ำดีนั้นค่อนข้างอธิบายยาก เนื่องจากปฏิกิริยา glycosidation ของกรดน้ำดีนั้นเป็นปฏิกิริยารองในสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามในแง่ของโรค เช่น ภาวะการคั่งของน้ำดี (cholestasis) โดยหลังจากได้รับการรักษาด้วย UDCA ระดับของ bile acid glycosides จะเพิ่มขึ้นอย่างมากในพลาสมาและปัสสาวะ เนื่องจากการเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 121 จะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ (Meech et al., 2012) จึงอาจทำให้เกิดการสะสมของน้ำดีและเกิดเป็นนิ่วในถุงน้ำดีได้ แต่สำหรับ 7 β -hydroxycholesterol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม steroids เป็นอีก substrate หนึ่งที่ทำปฏิกิริยากับ UGT3A1 ได้ดี จะพบว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการออกซิเดชันของคอเลสเตอรอล (cholesterol oxidation) โดย oxysterols มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์และทำให้เกิดการเสียหายใน monocytes เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cells) และเซลล์ของเยื่อผนัง (endothelial cells) ก่อให้เกิด apoptosis ที่เกิดจาก oxysterols อาจเกี่ยวข้องกับการเกิด fragmentation ของ caspases หรือ DNA การเพิ่มขึ้นของ 7 β -hydroxycholesterol มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของโรคหลอดเลือดหัวใจ (atherosclerosis) โดยสารตัวนี้อาจทำให้กระตุ้นการเกิด plaque บริเวณเส้นเลือด ซึ่งอาจจะทำให้ UGT3A1 สามารถทำนายการเกิดโรค atherosclerosis ได้ (Meech et al., 2012) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าในการเกิดความแปรผันทางพันธุกรรมของยีน *UGT3A1* ในตำแหน่งต่าง ๆ จะทำให้การทำงานของเอนไซม์ UGT3A1 เปลี่ยนแปลงไป เช่น หากเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 121 โดยเปลี่ยนจาก TGT (cysteine) เป็น GGT (glycine) จะทำให้โปรตีนที่ถูกสร้างออกมานั้นไม่สามารถทำงานได้ (inactive) (Meech et al., 2012) จากรายงานที่ผ่านมาการเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งนี้เกิดขึ้นกับประชากรในกลุ่ม Asian และ Caucasians ประมาณ 20% (Miner & Mackenzie, 1991) จากข้อมูลดังกล่าวมาทางผู้วิจัยจึงตระหนักถึงความสำคัญของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ซึ่งอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาซึ่งถูกเมแทบอลิซึมด้วยเอนไซม์ที่ผิดปกติ หรืออาจเกิดความผิดปกติในกระบวนการสร้างน้ำดีหรืออาจจะใช้ยีนนี้เป็น marker ของการทำนายการเกิดโรค

atherosclerosis ในอนาคต อีกทั้งยังไม่มียาวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *UGT3A1* ในประชากรมุสลิมในจังหวัดสงขลา เพื่อดูความถี่ในการเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมนำข้อมูลไปใช้ในการอธิบายการเกิดพยาธิสภาพเกี่ยวกับกระบวนการขับออกของน้ำดี อีกทั้งอาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา UDCA และในอนาคตคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันหรือหลีกเลี่ยงหรือลดความเสี่ยงในการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาที่ถูกเมแทบอลิซึมด้วยเอนไซม์ *UGT3A1* ที่ผิดปกติได้

บทตรวจเอกสาร

1. เภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics)

เภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) เป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาของร่างกายที่ทำหน้าที่จัดการกับสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายซึ่งยาที่รวมอยู่ด้วยในนั้นซึ่งมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของยาในร่างกาย โดยความแรงและระยะเวลาการออกฤทธิ์ของยาจะขึ้นกับความเข้มข้นของยา ณ ตำแหน่งออกฤทธิ์ ปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดความเข้มข้นของยาในร่างกาย คือ ปริมาณยาที่ใช้ (dose) รูปแบบของยา (dosage form) และวิธีการให้ยา (route of administration) นอกจากนี้ กระบวนการต่าง ๆ ของร่างกายที่มีผลกระทบบ่อยกว่า เภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) หรือ drug disposition ซึ่งจะประกอบด้วย การดูดซึมยา (drug absorption) การกระจายตัวของยา (drug distribution) การเปลี่ยนแปลงยา (drug metabolism) และการขับถ่ายยา (drug excretion) ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งมีความสำคัญในการเป็นตัวกำหนดความเข้มข้นของยาในร่างกาย

เภสัชจลนศาสตร์ ยังรวมถึงการนำหลักการคณิตศาสตร์มาวิเคราะห์กระบวนการต่าง ๆ ของร่างกาย ทำให้สามารถหาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetic parameters) เช่น ค่าครึ่งชีวิต (half-life) หรือ elimination rate constant clearance ของยา เป็นต้น การประเมินหาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์จะตรวจสอบความแปรปรวนของความเข้มข้นของยาและ / หรือสาร metabolites ในของเหลวของร่างกายที่สามารถตรวจสอบได้ง่าย เช่น พลาสมาและปัสสาวะ โดยค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์จะค่าจำเพาะของยาแต่ละตัวและสามารถนำหลักการเหล่านี้ไปใช้ในการเฝ้าระวังระดับยาและผลในการรักษาของยา (therapeutic drug monitoring) โดยการปรับเปลี่ยนขนาดและความถี่ของการให้ยา เพื่อให้ระดับยาในเลือดอยู่

ในช่วงที่ให้ผลในการรักษา (therapeutic range) ให้นานที่สุดและหลีกเลี่ยงระดับยาในช่วงที่ทำให้เกิดพิษ (toxic range) (ยศวริศ, 2017)

2. การแปรรูปยา (drug metabolism)

การเมแทบอลิซึมยา (drug metabolism) เป็นกระบวนการในการกำจัดยาออกจากร่างกาย โดยเกิดกระบวนการแปรสภาพและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยา ทำให้ยามีคุณสมบัติความเป็นขั้วสูงขึ้นและกำจัดออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น โดยทั่วไปแล้วการ metabolism ยามักทำให้เกิดสารเมแทโบไลต์ที่ไม่มีฤทธิ์ทางการรักษา อย่างไรก็ตามมีหลายกรณีพบว่า สาร metabolize ของยาบางชนิดยังคงแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอยู่หรือบางชนิดกลับปรากฏความเป็นพิษขึ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องได้เป็นสาร metabolize ที่มีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างไปจากเดิมขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิกิริยาเคมีที่เร่งให้เกิดขึ้นได้โดยเอนไซม์ในกลุ่มต่าง ๆ

การ metabolism ยาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งออกได้เป็นสองเฟส (phase) หลักคือ เฟส I (phase I หรือ functionalization) และเฟส II (phase II หรือ conjugation)

โดย phase I ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของยาได้โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) รีดักชัน (reduction) และไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในขณะที่ phase II เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยา conjugation ระหว่างยาหรือสาร metabolize ที่ได้ จาก phase I กับสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในร่างกาย เช่น กลูคูโรนิกแอซิด (glucuronic acid) ซัลเฟต (sulfate) ในขณะที่ phase II เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยา conjugation ระหว่างยาหรือสาร metabolize ที่ได้ จาก phase I กับสารต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติเป็น co-substrate ในร่างกาย เช่น กลูคูโรนิกแอซิด (glucuronic acid) ซัลเฟต (sulfate) กลูตาไธโอน (glutathione) เป็นต้น ปฏิกิริยาใน phase II แสดงในตาราง 1

โดยทั่วไปยาส่วนใหญ่มักเกิดการแปรสภาพใน phase I โดยปฏิกิริยา oxidation ประเภทต่าง ๆ เช่น ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) อีพอกซิเดชัน (epoxidation) เอ็นดีอัลคิลเลชัน (N-dealkylation) และ เอ็น-ออกซิเดชัน (N-oxidation) เป็นต้น สาร metabolize ที่ได้อาจไม่มีฤทธิ์และเข้าสู่การ metabolism ใน phase II แล้วกำจัดออกจากร่างกายต่อไปหรือบางตัวอาจมีฤทธิ์หรือความเป็นพิษมากขึ้น โดยจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของสาร metabolize ที่ได้ (ปนัดดาและคนาวรรณ, 2004)

ตาราง 1

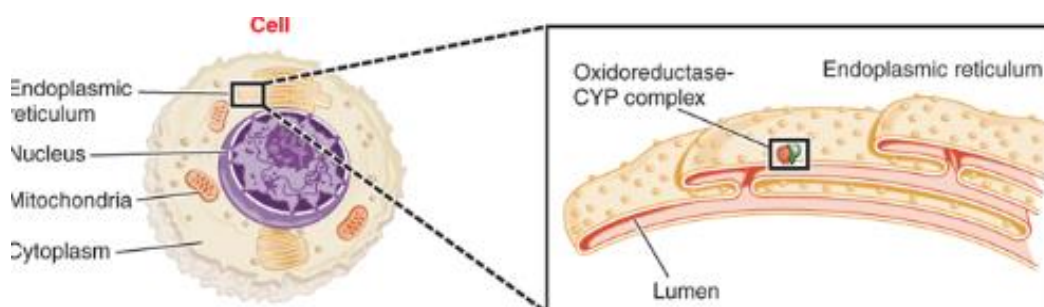
ปฏิกิริยาการแปรรูปยาชนิดต่าง ๆ ใน phase II reaction (Taxak and Bharatam, 2014)

Conjugated Group	Endogenous Cofactor	Enzyme	Drugs
Glucuronidation	UDP glucuronic acid	UDP-glucuronosyltransferase	Chloramphenicol, morphine, paracetamol, salicylic acid, fenoprofen, desipramine, meprobamate, cyproheptadiene
Sulphation	Sulphate	Sulfotransferases	Paracetamol, salbutamol
Glycine/Glutamine conjugation	Glycine/glutamine	N-acyl transferases	Cholic acid, salicylic acid, nicotinic acid, phenylacetic acid
Glutathione conjugation	Glutathione	Glutathione S-transferases	Paracetamol, ethacrynic acid
Acetylation	Acetyl-CoA	N-acetyl transferases	Histamine, mescaline, procainamide, p-amino salicylic acid, isoniazid, phenelzine, hydralazine, dapsone
Methylation	S-adenosyl-L-methionine	Methyl transferase	Morphine, norephedrine, nicotine, histamine, isoprenaline, propylthiouracil

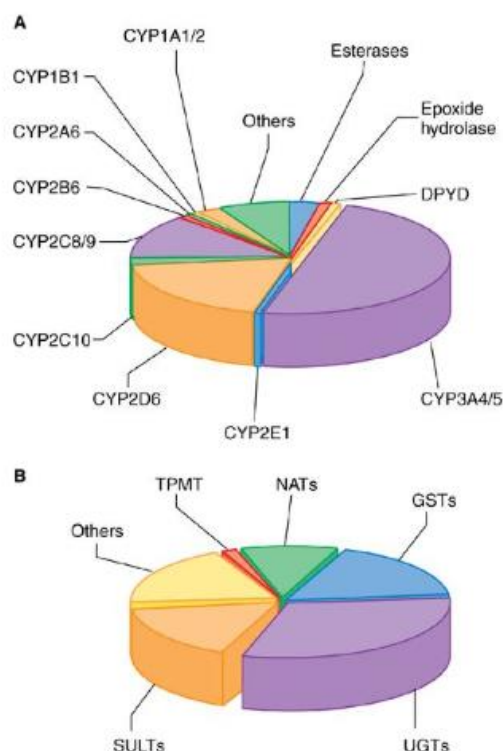
3. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา (drug metabolizing enzymes, DME)

ปฏิกิริยาในกระบวนการ metabolism ของยาภายหลังเข้าสู่ร่างกายสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 phases คือ phase I จะเป็นปฏิกิริยา oxidation, reduction และ hydrolysis ซึ่งจะเป็นการเปลี่ยนแปลงให้ยามีความเป็นขั้วมากขึ้น และ phase II จะเป็นกระบวนการควบจับ ยา กับสารที่มีคุณสมบัติเป็น co-substrates ได้แก่ glucuronic acid, sulfate, acetyl หรืออื่น ๆ (conjugation phase) กระบวนการ metabolism ยา ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ตับ และสามารถพบที่อวัยวะอื่นได้ด้วย เช่น ปอด ไต เลือด สมอง ผิวหนัง และลำไส้เล็ก เป็นต้น ซึ่งบริเวณที่พบ drug metabolism มากในระดับออร์แกเนล คือ endoplasmic reticulum และ cytosol รวมทั้งใน mitochondria, nuclear envelope และ plasma โดย enzymes ใน phase I จะอยู่ใน endoplasmic reticulum (ภาพ 1) โดย cytochrome

P450 system จัดเป็น enzyme ที่มีความสำคัญในการ metabolize ของ phase I drug metabolism และเป็นระบบที่สำคัญ เนื่องจากขามีการ metabolize ผ่านระบบนี้เป็นจำนวนมาก cytochrome P450 system เป็นกลุ่มของ enzyme หรือ isozyme อยู่ที่ผนังเซลล์ของ endoplasmic reticulum แต่ละ P450 enzyme จะประกอบด้วย protein และ heme อย่างละตัว ขณะที่ phase II conjugation enzymes จะมี UDP- glycosyltransferase (UGTs) เป็นเอนไซม์หลักพบมากที่ cytosol และมีเอนไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ใน phase II เช่น glutathione S-transferases (GSTs), sulfotransferases (SULTs) และ N-acetyltransferases (NATs) ส่วนใหญ่จะอยู่ที่ cytosol โดยจะพบกระบวนการทั้ง 2 phase ได้ในเซลล์เดียวกัน ปัจจุบัน isozyme มีการแบ่งประเภทและเรียกชื่อเป็น family และ subfamily ต่าง ๆ โดยอาศัยความเหมือนของ amino acid sequence ที่ซ้ำกัน โดยทั่วไปหากมีส่วนร่วมของ amino acid > 40% จะจัดเป็น family เดียวกัน และหากมีส่วนร่วมของ amino acid sequence > 55% จะจัดเป็น subfamily (ภาพ 2) (Coleman, 2010)



ภาพ 1. ตำแหน่งที่พบเอนไซม์ในกระบวนการ drug metabolism โดยบริเวณที่พบ drug metabolism activating มากคือที่ endoplasmic reticulum และ cytosol รวมทั้งใน mitochondria, nuclear envelope และ plasma ก็พบได้ enzymes ใน phase I จะอยู่ใน endoplasmic reticulum ขณะที่ phase II conjugation enzymes ส่วนใหญ่จะอยู่ที่ cytosol (Gonzalez, Coughtrie, & Tukey, 2014)



ภาพ 2. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ drug metabolism เอนไซม์ cytochromes P450 (CYPs) และ flavin-containing monooxygenases (FMOs) เป็นเอนไซม์หลักใน phase I (ภาพ A) ขณะที่ใน phase II มี UDP- glycosyltransferase (UGTs) เป็นเอนไซม์หลักและมีเอนไซม์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ใน phase II เช่น glutathione S-transferases (GSTs), sulfotransferases (SULTs) และ N-acetyltransferases (NATs) (ภาพ B) (Gonzalez et al., 2014)

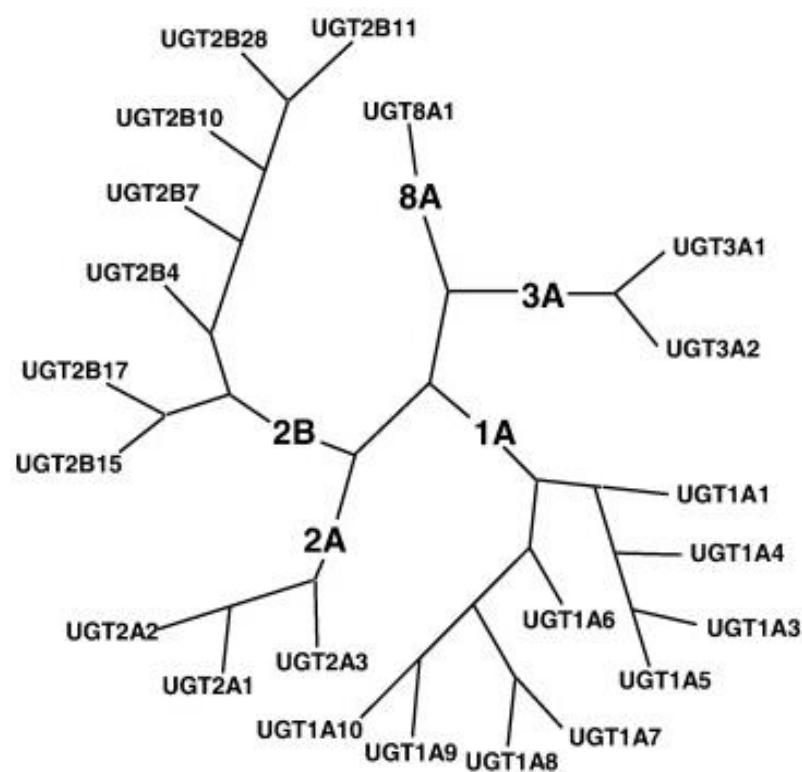
4. Nomenclature of *UGT* gene

ยีน *UDP-glycosyltransferase (UGTs)* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีทั้งหมด 117 ชนิด โดยในมนุษย์สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ *UGT1*, *UGT2*, *UGT3* และ *UGT8* ตามความเหมือนของลำดับเบสของยีน โดยแต่ละกลุ่มจะแบ่ง subtypes ได้ทั้งหมด 9 ชนิด 10 ชนิด 2 ชนิด และ 1 ชนิด ตามลำดับ (ภาพ 3)

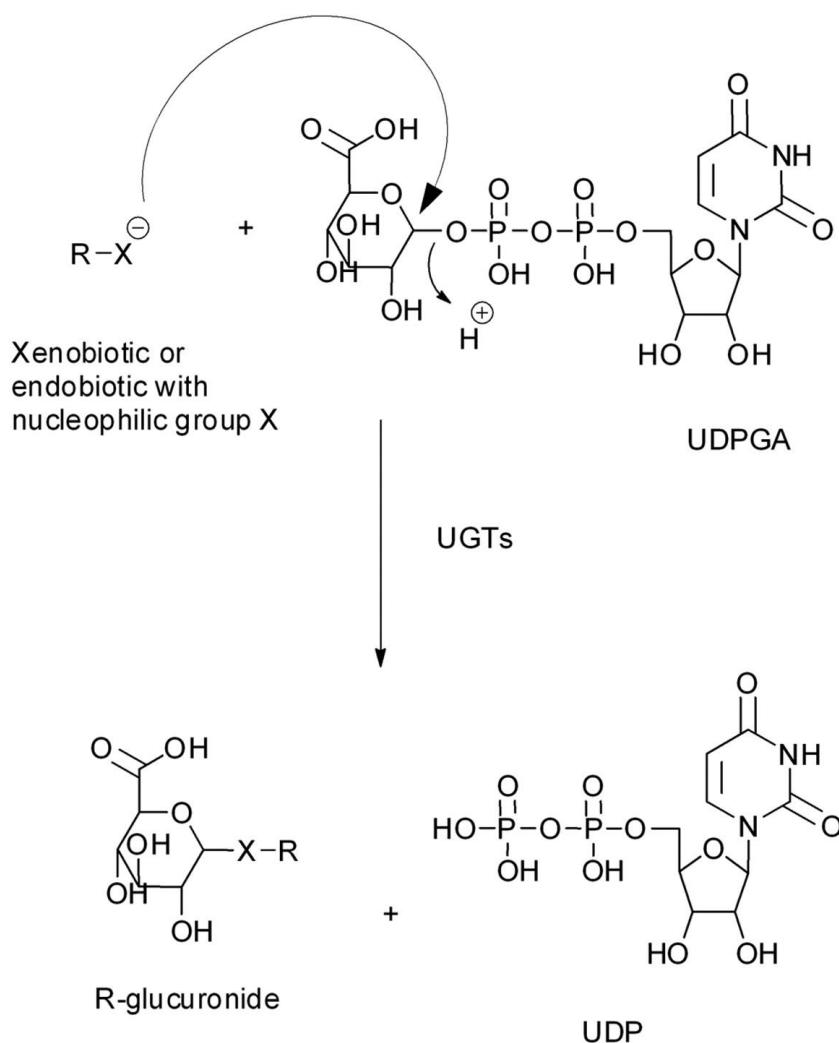
การทำงานของ *UDP-glycosyltransferase* ทำหน้าที่ในการเชื่อมหมู่ glycosyl (เช่น glucose, glucuronic acid, xylose, galactose และอื่น ๆ) เข้ากับ substrate ที่ละลายในไขมันได้ดี โดยมี UDP-activated sugar เป็น co-substrate พบว่าเอนไซม์ *UGT1* และ *UGT2* families ส่วนใหญ่จะใช้ UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA) เป็น co-substrate ในกระบวนการ glycosylation ส่วน

UGT3A1 จะใช้ co-substrate เป็น UDP-GlcNAc และ UGT3A2 จะใช้ co-substrate เป็น UDP-glucose (UDP-Glc) (ภาพ 4)

ยีน *UDP-glycosyltransferase 3* หรือ *UGT3* ในปัจจุบันมีการรายงานว่ามี 2 subtypes คือ *UGT3A1* และ *UGT3A2* ตำแหน่งที่พบยีนนี้จะพบที่โครโมโซมคู่ที่ 5 ตำแหน่งที่ p13.2 ทั้ง *UGT3A1* และ *UGT3A2* จะประกอบด้วย 7 exons (ภาพ 6) ซึ่งสมาชิกของแต่ละยีนใน *UGT3* families จะไม่มีการใช้ exon ร่วมกัน แต่จะพบว่ามี ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT3A1* และ *UGT3A2* ประมาณ 80% (Meech et al., 2012)



ภาพ 3. Phylogenetic tree ของ UDP-glycosyltransferase (UGTs) ที่พบในมนุษย์ (Mazerska, Mróz, Pawlowska, & Augustin, 2016)



where,

R = alkyl or aryl group in a molecule

X = O (alcohol, phenol), COOH (carboxylic acid),

N (primary, secondary or tertiary amine),

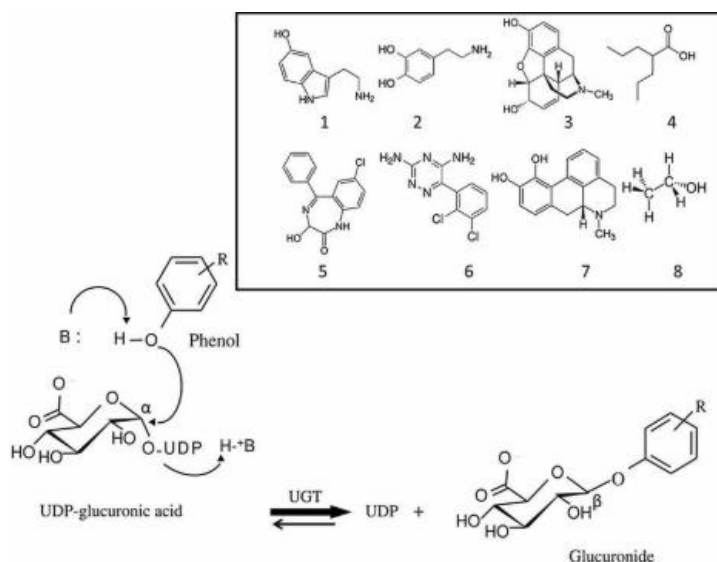
S (thiol), Se (selenide), C (acidic carbon)

ภาพ 4. โครงสร้างทางเคมีของสารและตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา glucuronidation โดย uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA) จะควบจับกับ substrate โดยอาศัยเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferases (UGT) ในการเร่งปฏิกิริยา ทำให้ได้สารกลูคูโรไนด์ (glucuronide) ที่ละลายน้ำได้ดีและจะถูกขับออกจากร่างกายต่อไป (Manevski, 2013)

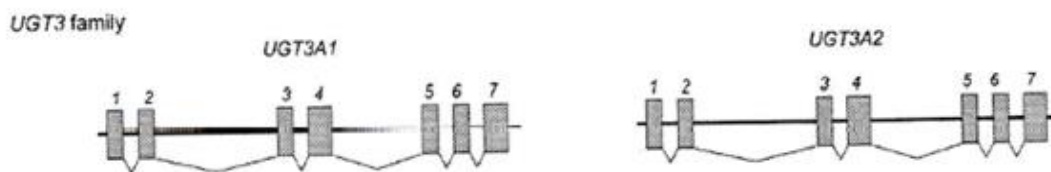
5. เอนไซม์ Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase (UDP-glucuronosyltransferase, UGTs)

UDP- glycosyltransferase (UGTs) เป็นเอนไซม์ที่พบใน phase II reaction ในกระบวนการ drug metabolism ทำหน้าที่ควบจับหมู่ น้ำตาลจาก UDP-sugar ไปยังโมเลกุลตัวรับต่าง ๆ โดยจะถ่ายโอน glucuronyl ส่วนหนึ่ง (GlcA) จาก UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA) ไปยัง O-center functional group ของ substrates เช่น ฮอร์โมน (hormone) สารกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoid) ซาโปนิน (saponin) และสารแปลกปลอมของร่างกาย (xenobiotics) เพื่อสร้าง 4-O-glucuronides หลังจากนั้น substrate ที่อยู่ในรูปของ glucuronide form จะมีความเสถียรมากขึ้น เพิ่มสมบัติการละลายน้ำ หรือลดความเป็นพิษลงและขับออกได้ง่ายกว่าโมเลกุลของสารตั้งต้น (ภาพ 5)

โครงสร้างของเอนไซม์ UGTs ประกอบด้วย 2 domains ได้แก่ carboxy-terminal domain และ amino-terminal domain โดยในส่วนของ carboxy-terminal domain เป็นบริเวณที่จะจับกับ UDPGA ซึ่งเป็น co-substrate ในกระบวนการ และส่วน glucuronidation amino-terminal domain เป็นบริเวณที่จะจับกับ aglycone หรือ substrate โดยมวลของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ทางด้าน lumenal side ของเยื่อหุ้ม endoplasmic reticulum และ carboxy-terminal tail จะอยู่ทางด้าน cytosolic side (Rowland, Miners, & Mackenzie, 2013)



ภาพ 5. การทำงานของ UDP-glycosyltransferase ทำหน้าที่ในการเชื่อมหมู่ glycosyl (เช่น glucose, glucuronic acid, xylose, galactose และอื่น ๆ) เข้ากับ substrate ที่ละลายในไขมันได้ดี โดยมี UDP-activated sugar เป็น co-substrate (Ouzzine et al., 2014)



ภาพ 6. องค์ประกอบของยีน *UGT3* โดยจะพบที่โครโมโซมคู่ที่ 5 ตำแหน่งที่ p13.2 ทั้ง *UGT3A1* และ *UGT3A2* จะประกอบด้วย 7 exons โดยทั้ง 2 ชนิดจะไม่ใช่ exon ร่วมกัน (Meech et al., 2012)

6. เอนไซม์ Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase 3 family A1 (UDP-glucuronosyltransferase3A1, UGT3A1)

ข้อมูลของเอนไซม์ UGT3A1 ได้ถูกตีพิมพ์ครั้งแรกในปี ค.ศ. 2008 (Mackenzie et al., 2008) โดยได้ให้ข้อมูลไว้ว่าเอนไซม์ UGT3A1 ใช้ UDP-*N*-acetylglucosamine เป็น co-substrate ในการเกิดปฏิกิริยา glycosidation กับ substrates เช่น ursodeoxycholic acid (UDCA), 7 β -hydroxycholesterol, 17 β -estradiol, 4-nitrophenol และ 4-methylumbelliferone เป็นต้น

6.1 โครงสร้างและลักษณะของยีน *UGT3A1*

ยีน *UGT3A1* ตำแหน่งที่พบยีนนี้จะพบที่โครโมโซมคู่ที่ 5 ตำแหน่งที่ p13.2 ประกอบด้วย 7 exon ที่มีการแปลรหัสโปรตีนมีจำนวน 1,572 bps.; exon 1 (94 bps.) exon 2 (102 bps.) exon 3 (115 bps.) exon 4 (532 bps.) exon 5 (232 bps.) exon 6 (220 bps.) และ exon 7 (277 bps.) ยีนนี้มี GC box เป็นโปรโมเตอร์ [GCGCAGCCCAGGCTG] สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT3A1* (ภาพ 7) ยีน *UGT3A1* และ *UGT3A2* มีจำนวน exon 7 exons โดยทั้ง 2 ชนิดจะไม่ใช่ exon ร่วมกัน

ยีน *UGT3A2* ตั้งอยู่เหนือต้นของยีน *UGT3A1* เมื่อเทียบกับทิศทางของการถอดรหัส (5' – 3') เอนไซม์ UGT3A1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 523 ตัว (จาก uniprot number: Q6NUS8 มวลโมเลกุล 59,151 Da) (ภาพ 8) ที่มีลักษณะเฉพาะด้านโครงสร้างต่างกับของ UGT อื่น ๆ สมาชิกของ UGT3A เป็นสาขาที่แยกจากกันของ UGT อื่นและมีความสัมพันธ์กับสมาชิกของ UGT1 และ UGT2 น้อยกว่าสมาชิกในกลุ่มอื่น (ภาพ 3) การเปรียบเทียบโปรตีน UGT3A กับ UGT1A1 และ UGT2B7 แสดงให้เห็นถึงอัตลักษณ์ลำดับโดยรวมเพียง 28-30% เท่านั้น

6.2 การควบคุมการแสดงออกของยีน *UGT3A1*

บริเวณ upstream หรือ phenobarbital-responsive enhancer element module (PBREM) ขนาด 264 bp ตั้งแต่ -359 ถึง -95 จะมีองค์ประกอบที่สำคัญ 12 องค์ประกอบ คือ TAF1, RXRA, MAX, REST, RAD21, YY1, SP1, JUND, ATF3, POLR2A, ZBTB33 และ HNF4A (ข้อมูลจาก GeneCard® HUMAN GENE DATABASE และ JASPAR CORE 2018 vertebrates) แต่ละส่วนของ promoter จะทำหน้าที่ดังนี้

1) TAF1 (TATA-box binding protein associated factor 1) จะจับกับโปรตีนที่เรียกว่า Transcription Factor IID (TFIID) โปรตีนนี้มีบทบาทในเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วร่างกายซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอ โดยมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกิจกรรมของยีนส่วนใหญ่

2) RXRA (retinoid X receptor alpha) จะจับตัวเป็น heterodimers กับ trans หรือ 9-cis retinoic และควบคุมการแสดงออกของยีนในกระบวนการทางชีวภาพต่าง ๆ

3) MAX (MYC Associated Factor X) จะสามารถจับกับสมาชิกของ basic helix-loop-helix leucine zipper (bHLHZ) โดยจะสามารถสร้าง homodimers และ heterodimers กับสมาชิกอื่น ๆ รวมถึง Mad, Mxi1 และ Myc โดย Myc เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ cell proliferation, differentiation และ apoptosis

4) REST (RE1 silencing transcription factor) เป็นตัวยับยั้งการถอดรหัสที่ยับยั้งยีนของเซลล์ประสาทในเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่เนื้อเยื่อ

5) RAD21 โปรตีนที่ encoded กับส่วนนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับโปรตีน Schizosaccharomyces pombe rad21 ซึ่งยีน RAD21 จะเกี่ยวข้องกับการซ่อมแซม DNA double-strand breaks รวมถึงการยึดเกาะของ chromatid ระหว่าง mitosis

6) YY1 (Yin & Yang 1) โดยโปรตีนที่ได้จะมีส่วนเกี่ยวข้องในการยับยั้งและกระตุ้นจำนวนของโปรโมเตอร์ YY1 อาจตั้งให้ histone deacetylases และ histone acetyltransferases กับโปรโมเตอร์เพื่อกระตุ้นหรือยับยั้ง promoter ดังนั้นจึงมีผลต่อการปรับเปลี่ยน histone ในการทำงานของ YY1

7) SP1 (specificity protein 1) จะเกี่ยวข้องในกระบวนการของเซลล์หลายอย่าง เช่น cell differentiation, cell growth, apoptosis, immune responses, response to DNA damage หรือ chromatin remodeling

8) JUND (JunD Proto-Oncogene) โปรตีนที่เข้ารหัสโดยยีนตัวนี้เป็นสมาชิกของ JUN family และเป็นส่วนประกอบที่มีบทบาทใน AP1 transcription factor complex โดยโปรตีนที่ได้ี้จะมีหน้าที่ในการป้องกันเซลล์จากการชราภาพและการตายของเซลล์ของ p53

9) ATF3 (activating transcription factor 3) เป็นองค์ประกอบของการกระตุ้นการทำงานของ transcription factor และ cAMP responsive element-binding (CREB) จะได้รับการกระตุ้นสัญญาณที่หลากหลาย เช่นในเซลล์มะเร็งและมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการในการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์

10) POLR2A (RNA Polymerase II Subunit A) ยีนนี้จะทำหน้าที่ในการจับกับ RNA polymerase II ซึ่งเป็นโพลีเมอเรสที่รับผิดชอบในการสังเคราะห์สาร RNA ในยูคาริโอต โปรตีนที่ได้ี้ประกอบด้วย carboxy terminal domain ของ heptapeptide ที่ซ้ำกัน ซึ่งจำเป็นสำหรับกิจกรรมของ polymerase

11) ZBTB33 (transcriptional regulator Kaiso) ส่วนนี้ จะ encoded transcriptional regulator โดยมีความเฉพาะเจาะจงในการจับคู่ DNA แบบ bimodal ซึ่งจะจับกับ CGCG (methylated) และ KAISO-binding site TCCTGCNA (non-methylated) จะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิด endothelium ที่เกี่ยวกับหลอดเลือด

12) HNF4A (Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha) โปรตีนที่ encoded โดยยีนนี้เป็นปัจจัยการถอดรหัสพันธุกรรมที่เชื่อมโยง DNA เป็น homodimer โปรตีนที่ encoded จะควบคุมการแสดงออกของยีนหลาย ๆ ชนิดรวมถึง hepatocyte nuclear factor 1 alpha ซึ่งเป็นการถอดรหัสที่ควบคุมการแสดงออกของ several hepatic genes โดยยีนนี้อาจมีบทบาทในการพัฒนาตับไต และลำไส้ (ข้อมูลจาก GeneCard® HUMAN GENE DATABASE)

- Exon 6 (1,076-1,295)

Ctcaccccagcatccgtctttttgtcactcatgggtgggcagaaacagcgtaatggaggccatccgtcatgggtgcccattgggtgggatt
accagtcfaatggagaccagcatggaacatgggtccgagtagtagccaaaattatgggtgtctctatccggttgatcaggtcacagc
cgacacactgacacttacaatgaaacaagtcataagaagacaagag

- Exon 7 (1,286-1,572)

gtacaagtcggcagtggtggcagccagtgcatcctgcactctcagccctgagccccgcacagcggctgggtgggctggatcgacc
acatcctccagactgggggagcgaecacctcaagccctatgccttcagcagccttggcatgagcagctaccattgatgtctttgt
gtttctgtggggctcactctgggcactatgtggctttgtgggaagetgtgggtgtgggtggccaggtggctgctggggccaggaag
gtgaagaagacaTGA

ภาพ 7. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT3A1* บนตำแหน่ง promoter และบริเวณที่มีการแปลรหัส
ของ exon 1 ถึง 7 (NCBI Reference Sequence: NC_000005.10)

10	20	30	40	50
MVGQRVLLLV	AFLLSGVLLS	EAAKILTIST	LGGSHYLLLD	RVSQILQEHG
60	70	80	90	100
HNVTMLHQSG	KFLIPDIKEE	EKSQVIRWF	SPEDHQKRIK	KHFDSYIETA
110	120	130	140	150
LDGRKESEAL	VKLMEIFGTQ	CSYLLSRKDI	MDSLKNENYD	LVFVEAFDFC
160	170	180	190	200
SFLIAEKLVK	PFVAILPTTF	GSLDFGLPSP	LSYVPVFPSL	LTDHMDFWGR
210	220	230	240	250
VKNFLMFFSF	SRSQWDMQST	FDNTIKEHFP	EGSRPVLSHL	LLKAELWFVN
260	270	280	290	300
SDFAFDFARP	LLPNTVYIGG	LMEKPIKPVP	QDLDFIANF	GDAGFVLVAF
310	320	330	340	350
GSMLNTHQSQ	EVLKKMHNAF	AHLPQGVIWT	CQSSHWRPDV	HLATNVKIVD
360	370	380	390	400
WLPQSDLLAH	PSIRLFVTHG	GQNSVMEAIR	HGVPMVGLPV	NGDQHGNMVR
410	420	430	440	450
VVAKNYGVSI	RLNQVTADTL	TLTMKQVIED	KRYKSAVVAA	SVILHSQPLS
460	470	480	490	500
PAQRLVGWID	HILQTGGATH	LKPYAFQQPW	HEQYLIDVFV	FLLGLTLGTM
510	520			
WLCGKLLGVV	ARWLRGARKV	KKT		

ภาพ 8. ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ *UGT3A1* (จาก uniprot number: Q6NUS8)

ตาราง 2

substrates ของ UGT3A1 โดยมี co-substrates คือ UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), UDP-glucose (UDP-Glc), UDP-Xylose (UDP-Xyl) และ UGT3A2 โดยมี co-substrates คือ UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), UDP-glucose (UDP-Glc), UDP-Xylose (UDP-Xyl) (Meech et al., 2012)

Substrate	UGT3A1	UGT3A2	UGT3A2
	pmol/min/mg UDP-GlcNAc	pmol/min/mg UDP-Glc	pmol/min/mg UDP-Xyl
Prototypic substrates			
4-Methylumbelliferone	9	958	686
1-Hydroxypyrene	14	865	462
7-Hydroxycoumarin	50	760	301
1-Naphthol	32	570	205
4-Nitrophenol	62	225	82
(-)-Borneol	80	0	ND
Bioflavones			
Genistein	215	659	523
Chrysin	68	402	352
Biochanin A	113	278	246
Formononetin	32	100	ND
2'-hydroxyflavanone	94	33	ND
4'-hydroxyflavanone	61	39	ND
Steroids			
17 α -Estradiol	74	32	ND
17 β -Estradiol	29	86	ND
17 α -Ethinylestradiol	163	104	ND
Estrone	57	44	ND
Testosterone	16	0	ND
Dihydrotestosterone	0	0	ND
7 β -Hydroxycholesterol	161	ND	ND
Bile acids			
Ursodeoxycholic acid	309	0	ND
Chenodeoxycholic acid	0	0	ND
Lithocholic acid	0	0	ND
Hyodeoxycholic acid	0	0	ND

7. Substrates ของเอนไซม์ UGT3A1 และผลของความผิดปกติของยีน UGT3A1 ต่อปฏิกิริยา glucuronidation ของสารต่าง ๆ

จากงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับ substrate ของ UGT3A1 พบว่า substrate หลักของ UGT3A1 ที่ใช้ co-substrate เป็น UDP-GlcNAc คือ UDCA ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ bile acids โดยจัดเป็นกรดน้ำดีตติยภูมิ (tertiary bile acids) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงกรดน้ำดี ทุติยภูมิ ภายในลำไส้เล็ก แต่พบว่าจะไม่เกิดปฏิกิริยากับกรดน้ำดีปฐมภูมิ (primary bile acids) นอกจากนั้น UGT3A1 ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่น เช่น 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, 4-nitrophenol และ

4-methylumbelliferone เป็นต้น (Mackenzie et al., 2008) สำหรับ UGT3A2 นั้น พบว่า จะมี substrates หลักที่แตกต่างออกไปจาก UGT3A1 โดย substrate หลักของ UGT3A2 จะเป็น 4-methylumbelliferone (4-MU) (Mackenzie et al., 2011) ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการทดลองเท่านั้น แต่จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่มของ bile acids (ตาราง 2) โดยในตารางจะแสดงค่าของ maximum velocity (V_{max}) ของสารต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ UGT3A1 และ UGT3A2 โดยมี co-substrates ทั้ง 3 ชนิด

นอกจากนี้งานวิจัยยังศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* กับ การทำงานของเอนไซม์ในการควบคุมจับกับ substrate ในกลุ่มของ bile acids ซึ่งก็คือ UDCA เนื่องจาก UDCA ถือเป็น substrate หลักของเอนไซม์ UGT3A1 โดยดูจากค่า V_{max} ซึ่งค่า V_{max} คือความเร็วสูงสุดของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยากับสารนั้น หาก V_{max} มีค่าสูงแสดงว่าการเกิดปฏิกิริยาที่เร่งโดยใช้เอนไซม์นั้นกับ substrate ดำเนินไปอย่างรวดเร็ว (ตาราง 2) อีกทั้งในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับการเกิดการกลายพันธุ์ของ *UGT3A1* กับ UDCA พบว่าหากเกิดการกลายพันธุ์ของยีนนี้ ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 121 จะส่งผลให้เอนไซม์ที่สร้างออกมานั้นไม่ทำงาน อีกทั้ง UDCA ยังเป็นสารในกลุ่มของ bile acids ซึ่งเป็นสารที่อยู่ภายในร่างกาย โดยปกติแล้ว bile acids จะขับออกนอกร่างกายผ่านทางอุจจาระ แต่เมื่อยีนเกิดการกลายพันธุ์จะส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ จึงอาจก่อให้เกิดการคั่งของกรดน้ำดีและเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจึงอาจทำให้เกิดนิ่วได้ อีกทั้งในปัจจุบันได้มีการนำ UDCA มาใช้ในทางการแพทย์ โดยการนำมารักษานิ่วในถุงน้ำดีและบำบัดอาการตับแข็งจากท่อน้ำดีถูกทำลาย (primary biliary cirrhosis) จึงอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาได้ และสารกลุ่ม steroid คือ 7- β CH โดยจากงานวิจัยของ Meech และคณะในปี 2012 กล่าวว่าหากเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* อาจส่งผลให้มีความเสี่ยงในการเกิด atherosclerosis เนื่องจาก 7- β CH เป็นองค์ประกอบในการกระตุ้น atherosclerosis plaques ภายในหลอดเลือดซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลอดเลือดตีบ

7.1 Ursodeoxycholic acid (UDCA)

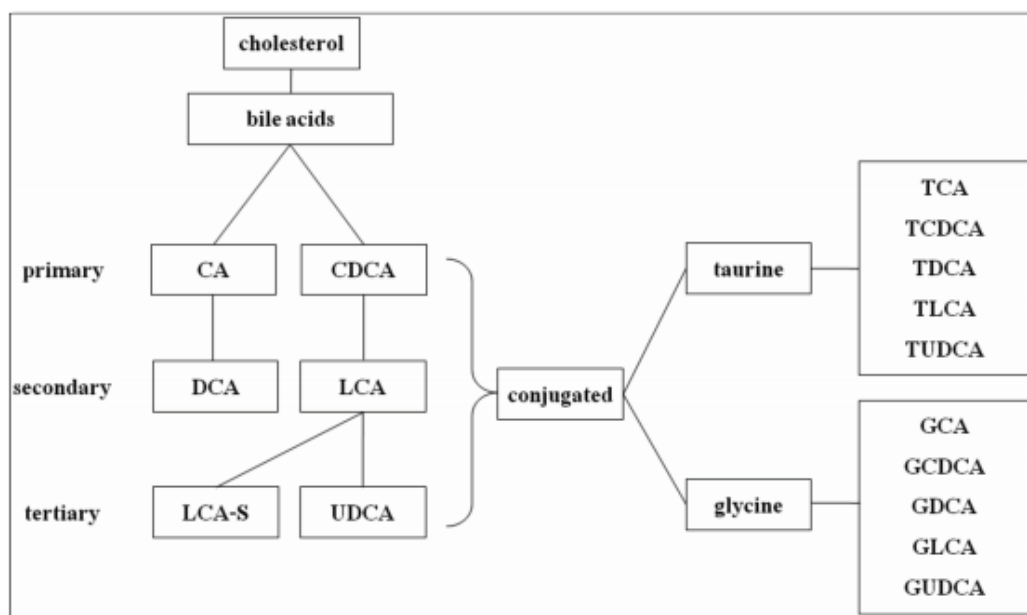
กรดน้ำดี (bile acids) เป็นสารที่ประกอบด้วยคาร์บอน 24 อะตอมที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่แอลฟาคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (3 α -hydroxysteroid) สังเคราะห์จากโคเลสเตอรอลในตับโดยอาศัยเอนไซม์ประมาณ 17 ชนิด (Sombatheera et al., 2014) โมเลกุลของกรดน้ำดีเป็นแบบ amphipathic molecules คือมีทั้งบริเวณที่มีขั้วและบริเวณที่ไม่มีขั้วในโมเลกุลเดียวกัน ซึ่งเมื่อไขมันและวิตามินที่ละลายในไขมัน (วิตามิน A, E, D และ K) จับตัวกับกรดน้ำดีจะเกิดเป็นอนุภาคที่

เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ในมนุษย์กรดน้ำดีที่พบมากที่สุด คือ chenodeoxycholic acid (CDCA) และ cholic acid (CA) เมื่อกรดน้ำดีถูกหลั่งสู่ลำไส้เล็กแล้วจะถูกดูดซึมกลับที่บริเวณลำไส้เล็กส่วน ileum ประมาณ 95% โดยโปรตีนขนส่ง active sodium-dependent apical bile acid transporter (ASBT) กรดน้ำดีบางส่วนนั้นจะถูกจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กเปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีทุติยภูมิ (secondary bile acid) ซึ่ง CA จะถูกเปลี่ยนเป็น deoxycholic acid (DCA) และ CDCA จะถูกเปลี่ยนเป็น lithocolic acid (LCA) ซึ่งเป็นกรดน้ำดีทุติยภูมิ (tertiary bile acid) (ภาพ 9) กรดน้ำดีทุติยภูมินี้ก็ถูกดูดซึมกลับโดยลำไส้ใหญ่ (ภาพ 10) โดยปริมาณการดูดซึมกลับของกรดน้ำดีจะมีผลต่ออัตราการสังเคราะห์กรดน้ำดีในตับ กรดน้ำดีบางส่วนไม่ถูกดูดซึมกลับจะถูกขับออกทางอุจจาระ อีกทั้งกรดน้ำดียังมีบทบาทในการกำจัดโคเลสเตอรอลออกจากร่างกายผ่านทางอุจจาระ (Sombatheera et al., 2014) โดยตับจัดเป็นเป็นอวัยวะสำคัญที่ทำหน้าที่กำจัดกรดน้ำดีออกจากเลือด ซึ่งในสภาวะปกติ ความเข้มข้นของกรดน้ำดีในซีรัมจะอยู่ในระดับไม่เกิน 10 ไมโครโมลต่อลิตร การพบระดับกรดน้ำดีในซีรัมสูงขึ้นอาจหมายถึงตับ มีการทำงานบกพร่องซึ่งอาจพบในโรคตับ เช่น โรคตับแข็ง (cirrhosis) การอุดตันท่อน้ำดี (cholestasis) ท่อน้ำดีอักเสบ (cholangitis) เป็นต้น (Sombatheera et al., 2014)

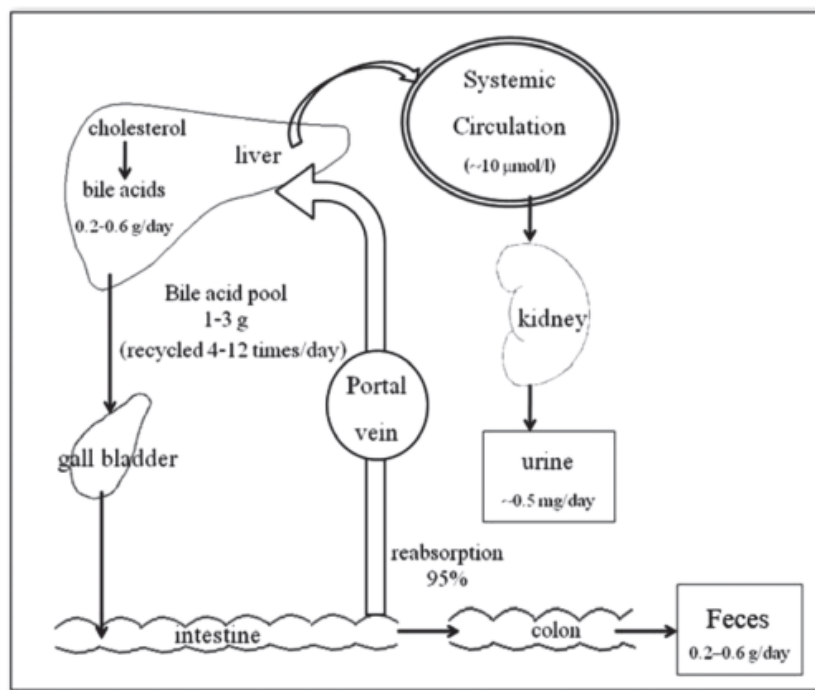
กระบวนการเปลี่ยนแปลงของกรดน้ำดี (major pathway) จะแบ่งเป็น 2 กระบวนการหลัก คือ classic pathway และ alternative pathway โดย classic pathway มีสัดส่วนมากกว่า 90% ของการผลิตกรดน้ำดีทั้งหมดและถือเป็นเส้นทางชีวสังเคราะห์กรดน้ำดีที่สำคัญ รูปแบบนี้จะเริ่มโดย cholesterol จะถูกแปลงเป็น 7α -hydroxycholesterol โดยเอนไซม์ CYP7A1 จากนั้น 3β -hydroxy- Δ^5 - C_{27} -steroid dehydroxylase (3β -HSD) จะเปลี่ยน 7α -hydroxycholesterol เป็น 7α -hydroxy-4-cholestene-3-one (C4) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นทั่วไปสำหรับ CA และ CDCA และถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ระดับซีรัมในการสังเคราะห์กรดน้ำดี จากนั้น CYP8B1 ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเกิด hydroxylation ของ C4 ในตำแหน่ง C-12 ตามมาด้วยปฏิกิริยาหลายอย่างรวมถึงการสลาย steroid side chain โดย CYP27A1 ซึ่งจะนำไปสู่การสังเคราะห์ CA ดังนั้น CYP7A1 ควบคุมอัตราการผลิตกรดน้ำดีโดยรวมในขณะที่ CYP8B1 ควบคุมอัตราส่วน CA / CDCA และในส่วนของ alternative pathway ภายใต้สภาวะปกติจะผลิตน้อยกว่า 10% ของกรดน้ำดีทั้งหมด ในรูปแบบนี้ CYP27A1 กระตุ้นปฏิกิริยา hydroxylation ของ cholesterol ให้เป็น 27-hydroxycholesterol ต่อมาเกิด hydroxylated ในตำแหน่ง C-7 โดย CYP7B1 เพื่อสร้าง $3\beta,7\alpha$ -dihydroxy-5-cholestenoic acid หลังจากนั้นจะถูกขนส่งไปยังตับ โดยส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนเป็น CDCA (ภาพ 11) (Li & Chiang, 2014)

การทำงานของ UGT3A1 ต่อกรดน้ำดีนั้นค่อนข้างอธิบายยาก เนื่องจากปฏิกิริยา glycosidation ของกรดน้ำดีนั้นเป็นปฏิกิริยารอง (minor pathway) ในสิ่งมีชีวิต แต่อย่างไรก็ตามอาจก่อให้เกิดความผิดปกติได้ในแง่ของภาวะการคั่งของน้ำดี โดยมีรายงานจากงานวิจัยของมีชและคณะ (Meech et al., 2012) พบว่าได้มีการรักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของน้ำดีโดยใช้ยา UDCA ซึ่งมีโครงสร้างเป็นกรดน้ำดีชนิดตติยภูมิ (tertiary bile acid) จัดเป็นยาที่นำมาใช้บำบัดอาการโรคนี้ในถุงน้ำดี โดยยานี้เป็นยาที่ช่วยเพิ่มปริมาณน้ำดีที่มีคุณภาพให้กับร่างกาย ยานี้มีกลไกการออกฤทธิ์โดยตัวยาจะเข้าไปทำหน้าที่ทดแทนน้ำดีที่ไม่มีคุณภาพซึ่งคอยสร้างความเสียหายกับตับ (replacing/displacing toxic concentrations of endogenous hydrophobic bile acid) ส่งผลทำให้เกิดความปลอดภัยและช่วยป้องกันการตายของเซลล์ตับ โดยในงานวิจัยของมีชและคณะ (Meech et al., 2012) พบว่าหลังจากได้รับการรักษาด้วยยา UDCA ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของตับจะมีระดับของ bile acid glycosides จะเพิ่มขึ้นอย่างมากในพลาสมาและปัสสาวะ จึงอาจทำให้เกิดการสะสมของน้ำดีและเกิดเป็นนิ่วในถุงน้ำดีได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ UDCA ยังเป็นยาที่ช่วยทำให้ไขมันคอเลสเตอรอลจากอาหารถูกแยกออกมาและโดนขับทิ้งไปกับอุจจาระ ส่งผลให้ตับผลิตและหลั่งไขมันคอเลสเตอรอลน้อยลงด้วยเช่นกัน จากขั้นตอนดังกล่าวจึงส่งผลให้อาการตับแข็งและนิ่วในถุงน้ำดีมีอาการดีขึ้นตามลำดับ ปัจจุบันทางคลินิกสามารถใช้ประโยชน์จากยา UDCA ทั้งในเชิงป้องกันและบำบัดรักษาอาการนี้ ถุงน้ำดี ซึ่งรูปแบบเภสัชภัณฑ์ของยา UDCA เป็นยาแบบรับประทาน หลังถูกดูดซึมจากระบบทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือด ตัวยานี้จะถูกลำเลียงไปยังตับเพื่อตับเปลี่ยนโครงสร้างเคมีของยานี้และจะถูกขับทิ้งไปกับอุจจาระ (วิบูลย์, นิยะดา, และดลจรัส, 2007) โดยอาการข้างเคียงที่สามารถพบได้คือ ท้องร่วง (25.2-27.1%) ท้องผูก (9.7- 26.4%) คลื่นไส้ (17.4%) อาหารไม่ย่อย (16.8%) มึนงง (16.5%) คิดเชื่อในทางเดินหายใจส่วนบน (12.4-15.5%) อาเจียน (9.7-13.7%) ปวดหลัง (11.8%) เป็นต้น (Lacy, Armstrong, Goldman, & Lance, 2009)

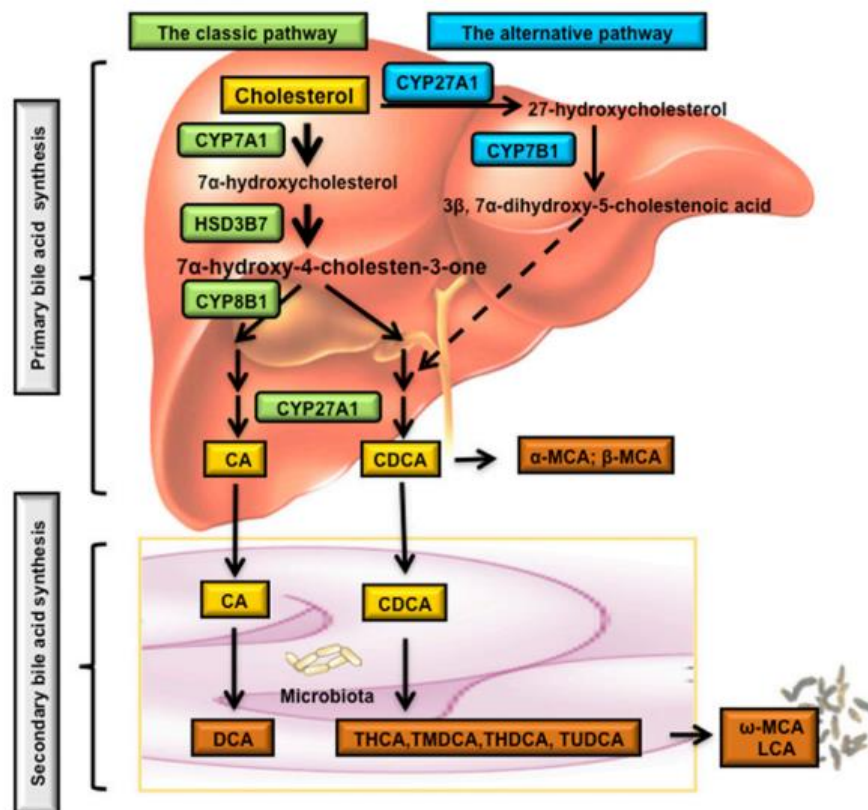
ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของยีน *UGT3A1* อาจเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคนี้ในถุงน้ำดี เนื่องจากหากเกิดความผิดปกติของยีน *UGT3A1* จะทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานของลดลง จะทำให้การขับออกของกรดน้ำดีภายในร่างกายลดลงจึงอาจเกิดการคั่งของกรดน้ำดีภายในร่างกายซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคนี้ได้ อีกทั้งยังอาจทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา UDCA ในผู้ป่วยได้



ภาพ 9. กรดน้ำดีที่พบในมนุษย์ กรดน้ำดีที่สร้างจากตับ เรียกว่า กรดน้ำดีปฐมภูมิ (primary bile acid) คือ chenodeoxycholic acid; CDCA และ cholic acid; CA กรดน้ำดีบางส่วนนั้นจะถูกจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วน ileum เปลี่ยนเป็นกรดน้ำดีทุติยภูมิ (secondary bile acid) คือ deoxycholic acid; DCA และ lithocholic acid; LCA และกรดน้ำดีทุติยภูมิ ยังสามารถเปลี่ยนเป็นตติยภูมิ (tertiary bile acid) คือ lithocholic acid 3-sulfate; LCA-S และ ursodeoxycholic acid; UDCA นอกจากนี้จะพบว่ากรดน้ำดียังสามารถ conjugate กับ taurine ได้เป็น taurocholic acid; TCA, taurochenodeoxycholic acid; TCDCA, tauroolithocholic acid; TLCA และ tauroursodeoxycholic acid; TUDCA อีกทั้งยัง conjugate กับ glycine ได้เป็น glycocholic acid; GCA, glycochenodeoxycholic acid; GCDCA, glycolithocholic acid; GLCA และ glyoursodeoxycholic acid; GUDCA (Sombattheera et al., 2014)



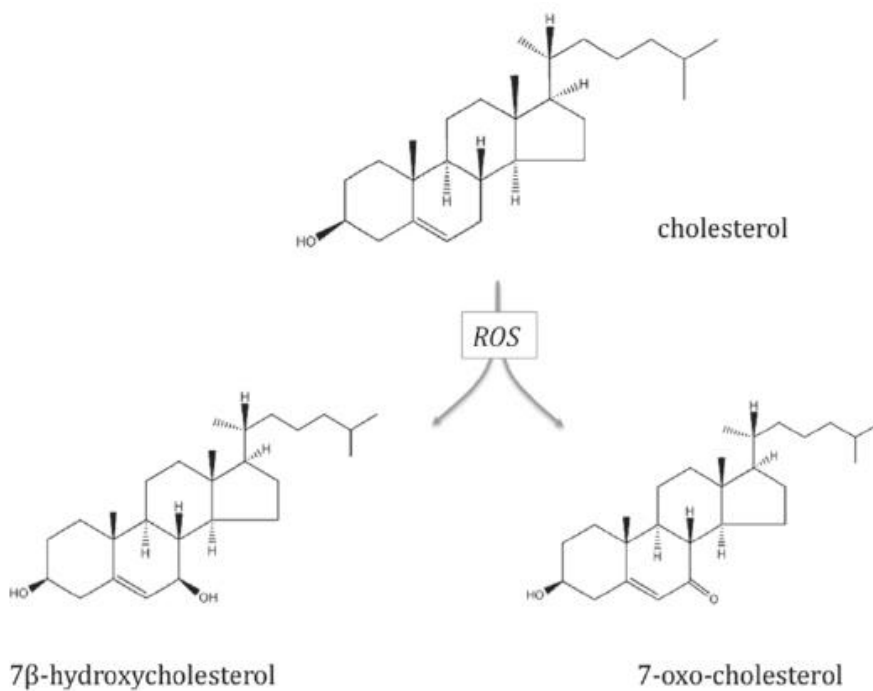
ภาพ 10. วงจรของกรดน้ำดีในตับและลำไส้เล็ก กรดน้ำดีสังเคราะห์จากโคเลสเตอรอลในตับ เมื่อกรดน้ำดีถูกหลั่งสู่ลำไส้เล็กแล้วจะถูกดูดซึมกลับมาประมาณ 95% กรดน้ำดีบางส่วนไม่ถูกดูดซึมกลับจะถูกขับออกทางอุจจาระ อีกทั้งกรดน้ำดีบางส่วนจะหลั่งออกมาสู่ systemic circulation และจะถูกขับออกทางปัสสาวะ (Sombattheera et al., 2014)



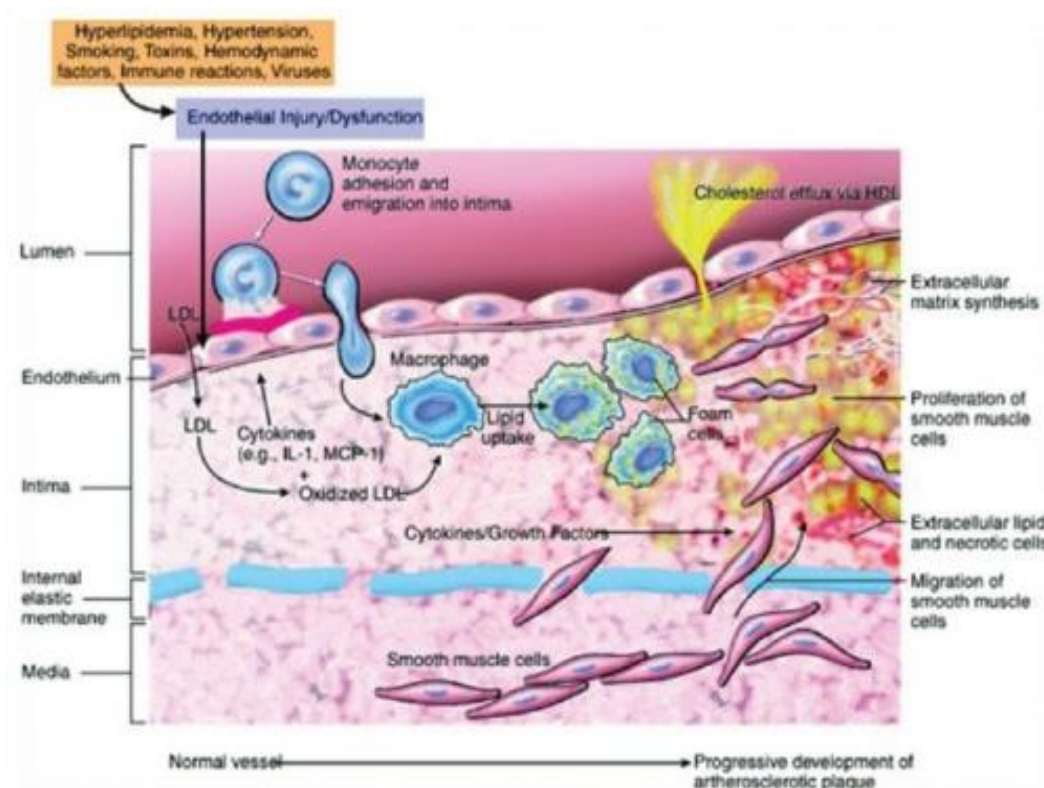
ภาพ 11. การสังเคราะห์ bile acids แบ่งได้เป็น 2 ทาง คือ 1. classic pathway; cholesterol จะถูกแปลงเป็น 7 α -hydroxycholesterol โดยเอนไซม์ CYP7A1 ซึ่งอยู่บริเวณ ER จากนั้น 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3bHSD, HSD3B7) จะเปลี่ยน 7 α -hydroxycholesterol เป็น 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) ซึ่งเปลี่ยนเป็น 7 α , 12 α -dihydroxy-4-cholesten-3-one โดย CYP8B1 นำไปสู่การสังเคราะห์ CA หากไม่มี 12 α -hydroxylation CYP8B1 จะเปลี่ยน C4 เป็น CDCA ในที่สุด CYP27A1 เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของ bile acids ทั้ง 2 แบบ การสังเคราะห์ CA และ CDCA 2. alternative pathway; cholesterol จะเปลี่ยนเป็น 27-hydroxycholesterol โดย CYP27A1 จากนั้น CYP7B1 จะเปลี่ยน 27-hydroxycholesterol เป็น 3 β , 7 α -dihydroxy-5-cholestenoic acid ซึ่งในที่สุดจะแปลงเป็น CDCA (Li & Chiang, 2014)

7.2 7 β -hydroxycholesterol

ออกซิสเตอรอล (oxysterol) คืออนุพันธ์ของคอเลสเตอรอลที่เกิดจากกระบวนการ oxidation วิธีการสร้างออกซิสเตอรอล มี 2 วิธีคือการสร้างโดยเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP450) ซึ่งเป็นวิธีหลักในการสร้างกรดน้ำดี (bile acid) และการสร้างโดยการทำปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) โดยในสถานะที่มีการสร้างออกซิสเตอรอลโดยการทำปฏิกิริยาของ ROS จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ก่อให้เกิดความผิดปกติภายในเนื้อเยื่อที่มีความน่าสนใจเนื่องจากมีความสำคัญในการเกิด oxidative stress คือ 7-oxocholesterol (7OxCH) และ 7 β -hydroxycholesterol (7 β CH) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของ oxLDL (ภาพ 12) โดยสภาวะปกติออกซิสเตอรอลมีบทบาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมการสร้างและสลายคอเลสเตอรอลในเนื้อเยื่อหลายชนิด ในทางตรงกันข้ามออกซิสเตอรอลยังมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับภาวะความผิดปกติหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน อัลไซเมอร์ และมะเร็งหลายชนิด ออกซิสเตอรอลจะพบใน atherosclerotic plaque ของมนุษย์อีกทั้งยังเป็นส่วนสำคัญในการเจริญของ plaque ใดๆก็ตามอัตราส่วนของ oxysterol:cholesterol ใน plaque นั้นจะมีค่าสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติหรือใน plasma อีกทั้งจะพบว่าภายใน low-density lipoprotein (LDL) ของมนุษย์ซึ่งจะมีบทบาทช่วยกันนำคอเลสเตอรอลจากตับออกไปแจกจ่ายให้กับทั่วร่างกาย LDL จึงถือว่าเป็น “คอเลสเตอรอลชนิดร้าย” ที่ไปเพิ่มค่าคอเลสเตอรอลในร่างกายให้สูงขึ้น โดยจะมีการเพิ่มขึ้นของ 7 β CH ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นพิษหลักของคอเลสเตอรอลและอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือด (ภาพ 13) (Brown & Jessup, 1999) โดยปกติแล้ว 7 β CH จะถูกขับออกนอกร่างกายได้หลายวิธี รวมทั้งการขับออกโดยผ่านเอนไซม์ UGT3A1 ซึ่งหากยีนเกิดความผิดปกติทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้อวัยวะไม่สามารถขับ 7 β CH ออกได้ จะก่อให้เกิดผลเสีย โดย 7 β CH ที่ไม่สามารถขับออกนอกร่างกายได้นั้นจะรวมตัวกันทำให้เกิด plaque ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหลอดเลือดได้ (Meech et al., 2012)



ภาพ 12. โครงสร้างของ 7-oxo-cholesterol และ 7β-hydroxycholesterol ; oxysterols 2 ชนิดที่ก่อให้เกิดความผิดปกติภายในเนื้อเยื่อที่มีความน่าสนใจเนื่องจากมีความสำคัญในการเกิด oxidative stress คือ 7-oxocholesterol (7OxCH) และ 7β-hydroxycholesterol (7βCH) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของ oxLDL โดยในเส้นเลือด 7OxCH และ 7βCH จะกระตุ้นการสร้าง ROS และในกระบวนการ lipid peroxidation จะส่งผลให้เกิดการรวมตัวของ plaque และพัฒนาเป็น atherosclerotic ได้ (Vitek, 2012)



ภาพ 13. การเกิดก่อตัวของ atherosclerotic plaques โดยอนุภาคของ LDL อาจมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายใน intima และกลายเป็น oxLDL และเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) เรียกว่า macrophages ซึ่งต่อมาเปลี่ยนเป็นเซลล์โฟม เซลล์โฟมมักพบใน plaque ในหลอดเลือด ผลิตภัณฑ์ของ oxLDL จะกระตุ้นเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดเพื่อผลิต cytokines ซึ่งสัมพันธ์กับการอักเสบของผนังหลอดเลือด ปฏิกริยาภูมิคุ้มกัน การก่อตัวและการลุกลามของ atherosclerosis plaques (Rafieian, Setorki, Doudi, Baradaran, & Nasri, 2014)

8. การกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation)

การกลายพันธุ์ (mutations) สามารถเกิดขึ้นได้จากการผิดพลาดของการทำงานของเซลล์หรือสามารถเกิดขึ้นได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์เรียกว่า mutagen โดย mutagen จะเป็นสารเคมีหรือกระบวนการทางกายภาพที่เพิ่มอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ สำหรับการเกิดการกลายพันธุ์ที่มีสาร mutagen เหนี่ยวนำให้เกิดเรียกว่า induced mutations ส่วนการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น

เองเรียกว่า spontaneous mutations ส่วน point mutation คือ การกลายพันธุ์ที่ลำดับเบสบนดีเอ็นเอ ถูกเปลี่ยนไป 1 เบส (base-pair substitution mutation) ดังนี้

1. Transition mutation

การการกลายพันธุ์จาก purine - pyrimidine base pair คู่หนึ่งเป็น purine - pyrimidine base pair อีกคู่หนึ่ง ซึ่งมีทั้งหมด 4 แบบคือ 1) AT \rightarrow GC, 2) GC \rightarrow AT, 3) TA \rightarrow CG และ 4) CG \rightarrow TA

2. Transversion mutation

การการกลายพันธุ์จาก purine - pyrimidine base pair ไปเป็น pyrimidine - purine base pair ซึ่งมีทั้งหมด 4 แบบ คือ 1) AT \rightarrow TA, 2) GC \rightarrow CG, 3) AT \rightarrow CG และ 4) GC \rightarrow TA

3. Missense mutation

การการกลายพันธุ์ของยีน ที่มี nucleotide เปลี่ยนไปทำให้ mRNA codon เปลี่ยนไปแล้วทำให้การแปลรหัสเป็น amino acid เปลี่ยนไปจากเดิมด้วย ตัวอย่างเช่น ทำให้เกิดการเปลี่ยน mRNA codon จาก 5'AAA-3' (Lys) \rightarrow 5'-GAA-3'(Glu) เปลี่ยนการแปลรหัสเป็น กรดอะมิโนจาก ไลซีน (Lysine) \rightarrow กลูตามีน (Glutamine)

4. Nonsense mutation

การการกลายพันธุ์ของยีนที่มี nucleotide เปลี่ยนไปทำให้ mRNA codon ที่ถูกแปลรหัสเป็น amino acid เปลี่ยนไปเป็น stop codon; UAG,UAA หรือ UGA ตัวอย่างเช่น ทำให้เกิดการเปลี่ยน mRNA codon จาก 5'AAA-3' (Lys) เป็น 5'UAA-3' (stop codon) หรือเรียกอีกอย่างว่า nonsense codon ทำให้ได้สาย polypeptides ที่ไม่สมบูรณ์

5. Neutral mutation (เป็น subset ของ missense mutation)

การการกลายพันธุ์ในยีนที่ทำให้เปลี่ยน amino acid ตัวหนึ่งไปเป็น amino acid อีกตัวหนึ่งที่มีคุณสมบัติทางเคมีเหมือน ๆ กัน ตัวอย่างเช่น 5'AAA-3' \rightarrow 5'-AGA-3' ทั้ง Lys และ Arg เป็น basic amino acid

6. Silent mutation

การเปลี่ยนแปลงของ base-pair บน gene ที่ทำให้ mRNA codon ถูกแปลรหัสเป็น amino acid ตัวเดิมอยู่ ตัวอย่างเช่น 5'AAA-3' (Lys) \rightarrow 5'-AAG-3' (Lys)

7. Frameshift mutation

การเพิ่ม (addition) หรือ ลบ (deletion) ของ base-pair บนยีน ทำให้ reading frame ของสายโปรตีนนั้น ๆ ตั้งแต่ตำแหน่งที่มีการเพิ่มหรือลบของ base-pair เปลี่ยนไปทั้งหมดและทำให้ได้สาย polypeptides ยาวขึ้นหรือสั้นลงก็ได้ (Lieber, 2010)

9. รายงานการเกิด *UGT3A1* polymorphism

สแน็ปส์ หรือ SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) เป็นความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างมนุษย์แต่ละคนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวที่ก่อให้เกิดผลที่แตกต่างกันทางกายภาพ ในประชากรหนึ่ง ๆ ถ้าพบตำแหน่งของเบส 1 เบสถูกแทนที่บนสาย DNA บริเวณเดียวกัน น้อยกว่าร้อยละ 1 ของจำนวนประชากรและมักทำให้เกิดความผิดปกติในสิ่งมีชีวิตจัดเป็น mutation แต่ถ้าในประชากรหนึ่ง ๆ พบว่าตำแหน่งของเบส 1 เบสถูกแทนที่ที่บริเวณเดียวกันบนสาย DNA มากกว่าร้อยละ 1 ของจำนวนประชากรและมักไม่ทำให้เกิดความผิดปกติในสิ่งมีชีวิตจัดเป็น single nucleotide polymorphism ใช้คำย่อว่า SNP และนิยมอ่านว่าสแน็ป โดย SNP เป็นความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) รูปแบบหนึ่ง (การุณ, 2014)

จากการศึกษาถึงความผิดปกติของยีน *UGT3A1* ซึ่งได้มีการรวบรวมไว้ในบทความวิจัยของ Meech และคณะในปี 2012 พบว่ามีตำแหน่งของการเกิด polymorphisms ที่เคยศึกษามาแล้วทั้งหมด 9 ตำแหน่ง (ตาราง 3) แต่จะพบว่ามีการเกิด polymorphisms ที่สำคัญคือ ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 121 ใน exon 4 ของ *UGT3A1* ซึ่งจัดเป็นการกลายพันธุ์แบบ missense mutation โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก TGT เป็น GGT ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก cysteine เป็น glycine โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาจะพบว่า การกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้จะเกิดขึ้นในมนุษย์และจะทำให้โปรตีนที่สร้างออกมานั้นไม่ทำงาน (inactive) ซึ่งอาจจะทำให้เกิดภาวะการคั่งของน้ำดี ทำให้น้ำดีไม่สามารถขับออกจากร่างกายได้อย่างปกติ จึงอาจก่อให้เกิดโรคนิวในถุงน้ำดี อันเนื่องมาจากการ metabolism ของน้ำดีผิดปกติ จากรายงานที่ผ่านมาการศึกษาถึงความถี่ของการเกิดความผิดปกติของ *UGT3A1* ในประชากรชาวเอเชียและคอเคเซียน ซึ่งเป็นการศึกษาโดยของ ไมเนอร์และแมคเคนซี (Miners & Mackenzie, 1991) โดยจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับกับการเกิดกระบวนการ drug glucuronidation ในประชากรที่ความแตกต่างกันในด้านอายุ (โดยเฉพาะช่วงทารกแรกเกิด) การสูบบุหรี่ เชื้อชาติ พันธุกรรมและฮอร์โมน เป็นต้น การเกิดความแปรผันทางพันธุกรรมที่ตำแหน่งนี้เกิดขึ้นกับประชากรในกลุ่ม Asian ประมาณ 20% (Mackenzie

et al., 2008) โดยในงานวิจัยของมาซซาควาและคณะ (Mazzacuva et al., 2016) ได้ศึกษาเกี่ยวกับ biomarker ของการเกิดโรค Niemann-Pick C โดยผลที่ออกมาพบว่าผู้ป่วยมีเอ็น *UGT3A1* ที่ผิดปกติ จะทำให้การตรวจสารประกอบในปัสสาวะมีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง เนื่องจากโดยปกติ หากผู้ป่วยเป็นโรค Niemann-Pick C โดยมีความผิดปกติของยีน NPC1 จะทำให้มีสารประกอบซึ่ง จำเป็นต้องมีการ conjugate กับ UDP-GlcNAc ทำให้ตรวจพบสารประกอบนั้นในปัสสาวะเป็น จำนวนมาก แต่หากผู้ป่วยมีความผิดปกติของยีน *UGT3A1* จะไม่สามารถตรวจพบสารประกอบนั้น ในปัสสาวะได้ จึงอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวินิจฉัยโรค

ตาราง 3

ความผิดปกติที่เกิดขึ้นของ *UGT3A1* (Meech et al., 2012)

Amino acid change	RefSNP	Average heterozygosity +/- std error	Potential effect on function
<i>UGT3A1</i>			
Leu113Gln	rs149072441	0.001 +/- 0.019	Unknown, mostly hydrophobic in other UGTs
Cys121Gly	rs3756669	0.249 +/- 0.250	Inactivating. Cys present in all other human UGTs
Asn250Tyr	rs149225186	0.005 +/- 0.049	Unknown. Residues in other UGTs are Arg except Asn in 3A2
Arg259Trp	rs61733483	0.014 +/- 0.083	Unknown. Residues in other UGTs are positively charged (Arg, Lys, His)
Arg364His	rs149057248	0.001 +/- 0.026	Unknown, probably inactivating as in the signature sequence
Arg400stop	rs61734803	0.026 +/- 0.111	Inactivating
Asn405His	rs148008807	0.001 +/- 0.021	Unknown, conserved region
Arg411Trp	rs141143848	0.001 +/- 0.021	Unknown
Asp418Asn	rs147780586	0.001 +/- 0.021	Unknown

10. Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) หรืออีกชื่อที่ว่า *In vitro* enzymatic gene amplification เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในทางชีววิทยาเพื่อทำสำเนาหลายส่วนของดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง การทำ PCR ของลำดับ DNA นั้นมีการขยายเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณเพื่อสร้างสำเนา มากกว่าหนึ่งล้านชุดของส่วน DNA นั้น PCR เป็นเทคนิคที่พบบ่อยและขาดไม่ได้ซึ่งใช้ใน ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์และการวิจัยทางห้องปฏิบัติการทางคลินิกสำหรับการใช้งานที่ หลากหลายรวมถึงการวิจัยทางชีวการแพทย์และการพิสูจน์หลักฐานทางอาญา ปฏิกริยาการ สังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. Denaturation เป็นการทำความร้อนที่ 94–98 °C (201–208 °F) เป็นเวลา 20-30 วินาที สิ่งนี้ทำให้เกิดการละลายของดีเอ็นเอหรือการสูญเสียสภาพของ template DNA ที่มี

เกลียวคู่โดยการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างฐานที่สมบูรณ์ทำให้เกิดโมเลกุลดีเอ็นเอสองเส้นเดี่ยว

2. Annealing อุณหภูมิปฏิกิริยาจะลดลงเหลือ 50–65 ° C (122–149 ° F) เป็นเวลา 20-40 วินาทีเพื่อให้ primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม

3. Primer extension อุณหภูมิในขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับ DNA polymerase ที่ใช้อุณหภูมิกิจกรรมที่เหมาะสมสำหรับ DNA polymerase ที่ทนความร้อนของ *Taq* (*Thermus aquaticus*) polymerase อยู่ที่ประมาณ 75–80 ° C (167–176 ° F) เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก primer ในทิศทางจาก 5' ไป 3'

การตั้งคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก (วิระพงษ์และนิภากรณ์, 2008)

10.1 องค์ประกอบและภาวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในการทำ PCR มาตรฐาน

10.1.1 ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA Template)

แม่แบบ DNA เป็นลำดับเป้าหมายดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาจะใช้อุณหภูมิสูงเพื่อแยกดีเอ็นเอทั้งสองออกจากกัน และไพรมอร์นั้นสามารถเชื่อมกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ได้ คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ มีอิทธิพลอย่างมากต่อประสิทธิภาพการทำ PCR ปริมาณดีเอ็นเอใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม โดยทั่วไปนิยมใช้ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

10.1.2 บัฟเฟอร์

สำหรับทำปฏิกิริยาซึ่งมักจะมาพร้อมกับเอนไซม์ *Taq* polymerase โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่แท้จริง (10x buffer) ซึ่งจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา

10.1.3 dNTPs

นิวคลีโอไทด์ทุกชนิดคือ "การสร้างบล็อก" สำหรับสายดีเอ็นเอใหม่และจำเป็นสำหรับการทำปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย adenine (A), guanine (G), cytosine (C), thymine (T) หรือ uracil (U) ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาจะใส่ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์

10.1.4 ไพรมเมอร์

ไพรมเมอร์เป็นดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่มีนิวคลีโอไทด์ประมาณ 18 ถึง 25 นิวคลีโอไทด์ โดยไพรมเมอร์จะจับกับตำแหน่งส่วนท้ายสุดของ 3' ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ โดยจะมีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรมเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กันควรมีสัดส่วนประกอบของ G+C เท่ากัน เพื่อให้ค่า T_m เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน และไม่ควรใช้ไพรมเมอร์ที่มีลักษณะปลายทั้ง 2 ข้างเป็นคู่สมกัน (palindrome sequence) ทั้งภายในไพรมเมอร์เดียวกันและระหว่างไพรมเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้คู่กัน ไพรมเมอร์ต้องได้รับการออกแบบสำหรับการทำ PCR ทั้ง 2 ตัว คือ forward primer และ reverse primer โดยจะมีการสร้าง DNA สายใหม่จากตำแหน่ง 5' ไป 3'

ข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบไพรมเมอร์

- 1) ความยาวของไพรมเมอร์: ควรมีความยาวประมาณ 18-25 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้
- 2) ควรเลือกไพรมเมอร์ที่มีการกระจายของเบสอย่างสม่ำเสมอ
- 3) ควรเลือกไพรมเมอร์ที่มี GC-content อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ไม่ควรเลือกไพรมเมอร์ที่มีปริมาณ GC-content สูงเกินไป
- 4) ไพรมเมอร์ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence) ในดีเอ็นเอต้นแบบ นั่นคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในดีเอ็นเอต้นแบบ
- 5) หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง
- 6) ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละไพรมเมอร์ ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง
- 7) ค่า T_m (melting temperature) ของแต่ละไพรมเมอร์ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส
- 8) ไพรมเมอร์ควรมีลำดับคู่สมกับปลายด้าน 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ

10.1.5 แมกนีเซียมคลอไรด์

อาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์แต่ส่วนใหญ่แยกต่างหากเพื่อให้ปรับใช้ได้ ปริมาณที่เหมาะสมกับดีเอ็นเอแต่ละชนิด เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์

10.1.6 เอนไซม์

DNA polymerase เพิ่มนิวคลีโอไทด์ให้กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ตามลำดับเส้นที่ 3'-OH ของไพรเมอร์และสังเคราะห์เส้นดีเอ็นเอใหม่ DNA polymerase ที่ใช้กันมากที่สุดคือ *Taq* DNA polymerase (จาก *Thermus aquaticus* เป็นแบคทีเรียทนความร้อน) เนื่องจากมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง *Pfu* DNA polymerase (จาก *Pyrococcus furiosus*) เป็นเอนไซม์อีกหนึ่งชนิดที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางเนื่องจากมีความเที่ยงตรงสูงกว่า (ความแม่นยำในการเพิ่มนิวคลีโอไทด์) Mg^{2+} ในบัฟเฟอร์ทำหน้าที่เป็นปัจจัยร่วมสำหรับการทำงานของ DNA polymerase ดังนั้นในกระบวนการทำ PCR จึงจำเป็นต้องใช้ Mg^{2+} สำหรับการทำปฏิกิริยาร่วมกับ DNA polymerase

โดยทั่วไปปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในปริมาณ 10–200 ไมโครลิตร ในหลอดปฏิกิริยาขนาดเล็ก (ปริมาตร 0.2-0.5 มิลลิลิตร) เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า DNA thermal cycler (นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) จะให้ความร้อนและทำให้หลอดปฏิกิริยาเย็นลงเพื่อให้ได้อุณหภูมิที่ต้องการในแต่ละขั้นตอนของการทำปฏิกิริยา จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบและระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก (วีระพงษ์และนิภาภรณ์, 2008)

10.2 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)

เครื่อง Thermal cycler หรือ PCR machine เป็นเครื่องมือที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบและหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิต ข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลายๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนักระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง (วีระพงษ์และนิภาภรณ์, 2008)

10.3 โปรแกรมอุณหภูมิในการทำ PCR (ภาพ 14)

10.3.1 Initial denaturation

ขั้นตอนนี้จำเป็นสำหรับ DNA polymerase ที่ต้องมีการกระตุ้นความร้อน ด้วย hot-start PCR ประกอบด้วยการให้ความร้อนในห้องทำปฏิกิริยากับอุณหภูมิ 94–96 °C

(201–205 ° F) หรือ 98 ° C (208 ° F) หากใช้ DNA polymerase ที่ทนความร้อนสูงมากซึ่งจะใช้เวลา 1-10 นาที

10.3.2 Denaturation

โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิที่ 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 วินาที เพื่อเป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว ในขั้นตอน denaturation ก็ถือว่าเพียงพอแล้วในการทำให้สายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบแยกกันอย่างสมบูรณ์ แต่ในทางปฏิบัติอาจจะมีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ได้ตามความเหมาะสมขึ้นอยู่กับลักษณะความซับซ้อนของดีเอ็นเอต้นแบบ อย่างไรก็ตามควรหลีกเลี่ยงอุณหภูมิที่สูงเกินไปและ/หรือเวลาที่นานเกินไป เพราะจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase ลดลงได้

10.3.3 Annealing

ขั้นตอนนี้อุณหภูมิปฏิกิริยาจะลดลงเหลือ 50–65 ° C (122–149 ° F) เป็นเวลา 20-40 วินาทีซึ่งจะช่วยให้การเชื่อมไพรเมอร์ไปยังดีเอ็นเอแม่พิมพ์แต่ละเส้นที่แยกเดี่ยวโดยทั่วไปแล้วไพรเมอร์สองแบบที่แตกต่างกันจะรวมอยู่ในส่วนผสมของปฏิกิริยา (forward primer และ reverse primer) มันเป็นสิ่งสำคัญในการกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน annealing เนื่องจากประสิทธิภาพและความจำเพาะได้รับผลกระทบอย่างมากจากอุณหภูมิ annealing อุณหภูมินี้จะต้องต่ำพอที่จะทำให้การเชื่อมของไพรเมอร์ไปยังดีเอ็นเอแม่พิมพ์ แต่สูงพอที่การเชื่อมจะมีความเฉพาะเจาะจง เช่นไพรเมอร์ควรเชื่อมกับส่วนที่สมบูรณ์แบบของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ หากอุณหภูมิต่ำเกินไปไพรเมอร์อาจเชื่อมไม่สมบูรณ์ ถ้าสูงเกินไปไพรเมอร์อาจไม่เชื่อมเลย อุณหภูมิ annealing ทั่วไปอยู่ที่ประมาณ ต่ำกว่า T_m 3-5 ° C ของไพรเมอร์ที่ใช้ ในระหว่างขั้นตอนนี้ DNA polymerase จะจับกับแม่แบบไพรเมอร์และเริ่มสร้างดีเอ็นเอ โดยค่า T_m ของไพรเมอร์จะคำนวณจากการใช้ software หรือคำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

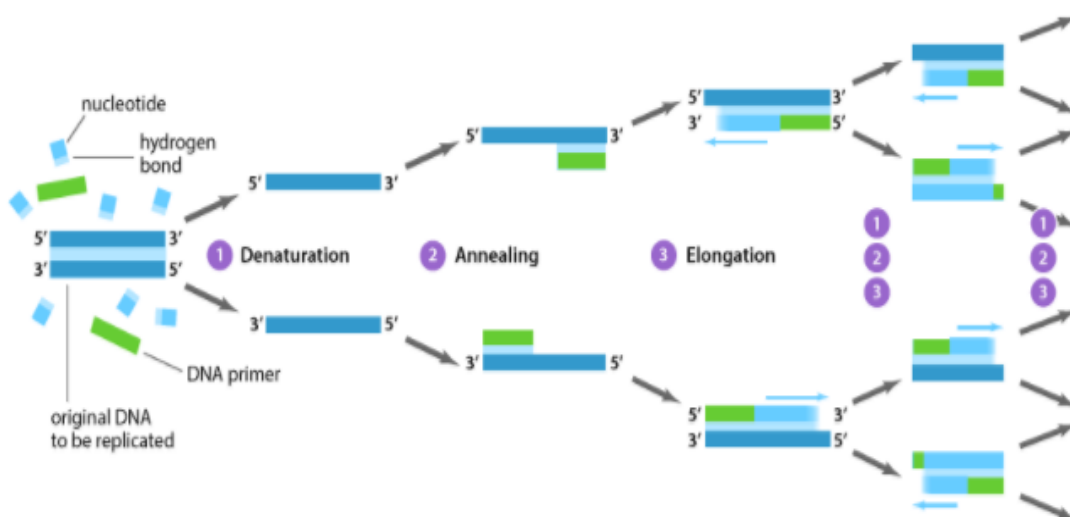
จากนั้นนำค่า T_m ที่คำนวณได้มาทดสอบด้วยการทำ PCR ใช้อุณหภูมิหลาย ๆ อุณหภูมิที่ต่างกันประมาณ ± 2 องศาเซลเซียสมาทำการทดสอบ จากนั้นทำการเปรียบเทียบผลที่ได้และเลือกอุณหภูมิที่ให้ผลดีที่สุด ซึ่งในขั้นตอนนี้หากใช้อุณหภูมิที่ต่ำเกินไปจะทำให้ความจำเพาะของการทำ PCR ลดลง ในขณะที่เดียวกันหากใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไป จะมีผลทำให้การ annealing เกิดขึ้นได้น้อยหรือไม่เกิดเลย

10.3.4 Primer extension หรือ Elongation

เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งจะสังเคราะห์ต่อจากไพรเมอร์ในทิศทาง 5' ไป 3' โดยอาศัยการทำงานของ *Taq* polymerase สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase ซึ่งจะนำเอานิวคลีโอไทด์มาต่อกับไพรเมอร์ทางด้านปลาย 3' สำหรับระยะเวลาที่ใช้สามารถปรับเปลี่ยนได้โดยจะขึ้นอยู่กับความยาวและความเข้มข้นของสายดีเอ็นเอต้นแบบ ตลอดจนอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาด้วย

10.3.5 Final extension

ขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิที่ 70–74 °C (158–165 °F) เป็นเวลา 5–15 นาที หลังจากรอบ PCR รอบสุดท้าย เพื่อให้แน่ใจว่า DNA เส้นเดี่ยวที่เหลืออยู่จะถูกยัดออกจนสุด จากขั้นตอน denaturation จนถึง primer extension จะนับเป็น 1 รอบ ซึ่งจำนวนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละรอบจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็นแบบทวีคูณ (exponential) โดยปริมาณของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะมีค่าเท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบของปฏิกิริยา) ซึ่งจำนวนรอบในการทำ PCR นั้น จะขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่มีอยู่ โดยจำนวนรอบที่ใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 25-35 รอบ หากใช้จำนวนรอบมากเกินไป (40 รอบ) ก็จะก่อให้เกิด PCR ไม่จำเพาะเกิดขึ้น (วิระพงศ์และนิภาภรณ์, 2008)



ภาพ 14. ขั้นตอนในการทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนแรก: denaturation ขั้นตอนที่สอง: annealing และขั้นตอนที่สาม: extension

(https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php)

11. Gel Electrophoresis

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่ประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ก็ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วย โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอ (หรืออาร์เอ็นเอ) จึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยดังนี้ (วสันต์, ปราณี, และ วาสนา, 1996)

11.1 หลักการที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ

11.1.1 ขนาดของ โมเลกุล ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง (linear) เกือบคู่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล ถ้านำระยะทางที่โมเลกุลเคลื่อนที่ (mobility) มาเขียนกราฟ คู่กับค่า \log ของโมเลกุล (molecular weight) จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ ซึ่งมีความสัมพันธ์ลักษณะเส้นตรงอยู่ช่วงหนึ่งดังนั้นถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยนำทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแล้ว นำมาเขียนกราฟระหว่างระยะทางที่เคลื่อนที่และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน ทั้งนี้ต้องเปรียบเทียบในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสครั้งเดียวกันเท่านั้น เนื่องจากเป็นค่าแบบสัมพัทธ์

11.1.2 รูปแบบของดีเอ็นเอ (configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้นดีเอ็นเอที่มีรูปแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดซึ่งจะพบรูปแบบทั้ง 3 ของดีเอ็นเอได้ในการศึกษาสัปดาห์

10.1.3 เพอร์เซ็นต์ของชนิดเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรณินิวคลีโอไทด์หรือโพลีอะครีลาไมด์เจลและอะกาโรสเจล

11.1.4 แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดี แต่ถ้าค่าดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้าการแยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่ชัดเพราะเกิดการแพร่ (diffusion) ของดีเอ็นเอ

11.1.5 บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TEA (Tris-acetate), TBE (Tris-borate), และ TPE (Tris-phosphate) นิยมใช้ที่มีความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้คือ TPE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็วการเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง (วสันต์และคณะ, 1996)

11.2 วิธีการปฏิบัติในการแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอ

11.2.1 อะกาโรสเจล (agarose gel)

เป็นสายพอลิเมอร์ ของ D-galactose และ 3,6-anhydro-L-galactose เมื่อเตรียมแผ่นเจล โดยต้มสารละลาย agarose ในบัฟเฟอร์แล้วเทลงในถาดเตรียมเพื่อให้แข็งตัวเมื่อเย็นจะได้เจลที่มีรูพรุนใหญ่ จึงใช้แยกสารที่มีขนาดใหญ่ เช่น กรดนิวคลีอิก ซึ่งขนาดรูพรุนขึ้นกับความเข้มข้นของ agarose (เมื่อความเข้มข้นสูงรูพรุนจะเล็กลง) เมื่อให้สนามไฟฟ้าที่ neutral pH โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกจะมีประจุลบและเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกด้วยความเร็วที่ขึ้นกับขนาดโมเลกุล (molecular size) และ โครงรูป (conformation) กรดนิวคลีอิกขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าขนาดใหญ่ และถ้าขนาดเท่ากันแต่มีรูปร่าง ต่างกันจะมีอัตราเร็วต่างกัน โดยลำดับของความเร็วในการเคลื่อนที่ของแต่ละรูปแบบของกรดนิวคลีอิก พบว่า supercoiled DNA > linear double stranded DNA > circular เมื่อฉายแสง UV จะให้ fluorescence มองเห็นเป็น band ของ DNA เรืองแสง

11.2.2 โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel)

โพลีอะคริลาไมด์เจลเกิดจากการรวมตัวของอะคริลาไมด์และบิสอะคริลาไมด์โมเลกุลเดี่ยวมารวมกันเกิดเป็นโพลิเมอร์มีลักษณะเป็นร่างแห เป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี จึงมีความสม่ำเสมอควบคุมได้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีใด มีความใส มีความคงตัวของ pH อุณหภูมิ และมี ionic strength กว้าง สามารถปรับขนาดของช่องในโพลิเมอร์ได้จึงเหมาะสำหรับเป็นตัวกลางในการแยกโมเลกุลของโปรตีนและดีเอ็นเอ

ดังนั้นขนาดของช่องจึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะครีลาไมด์และเปอร์เซ็นต์ของบิสอะครีลาไมด์ที่มีในเจลทั้งหมด การบวกความเข้มข้นของเจลจึงมี 2 ค่า คือ

1. %T (total) = ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์ของโมเลกุลเดี่ยวทั้งหมด (อะครีลาไมด์ + บิสอะครีลาไมด์)
2. % C (crosslinker) = ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซ็นต์ของบิสอะครีลาไมด์เทียบกับความเข้มข้นของโมเลกุลเดี่ยวทั้งหมด

ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของบิสอะครีลาไมด์ ขนาดของช่องจะเล็กลง และจะเล็กที่สุดเมื่อ C เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเพิ่มค่า C จะได้ร่างแหขนาดใหญ่และช่องจะกว้างขึ้น เช่น เมื่อใช้เจลที่มีความเข้มข้น T เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ของ C เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ จะได้เจลที่มีช่องขนาดประมาณ 20 นาโนเมตร แต่ถ้าใช้เจลที่มีความเข้มข้น T เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์และ C เท่ากับ 30-50 เปอร์เซ็นต์ จะได้เจลที่มีขนาดประมาณ 500-600 นาโนเมตร ถ้าเตรียมโพลีอะครีลาไมด์โดยไม่ใส่บิสอะครีลาไมด์จะได้ โพลีเมอร์ที่เป็นสายยาวเท่านั้น ไม่เกิดเป็นเจล เพียงแต่ได้สารละลายเหนียวเท่านั้นเรียกว่า linear polyacrylamide

การจับตัวเป็น โพลีเมอร์ (polymerization) ของอะครีลาไมด์และบิสอะครีลาไมด์เริ่มต้นโดยเติมสารแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) หรือไรโบฟลาวิน (riboflavin) และใส่ N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) หรือ 3-dimethylamino-propionitrile (DMAPN) เพื่อเร่งให้เกิดปฏิกิริยาการจับตัวเป็น โพลีเมอร์

ระบบแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตและ TEMED TEMED จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) จากแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาการจับตัวของอะครีลาไมด์และบิสอะครีลาไมด์เป็นพอลิเมอร์ ดังนั้นถ้าเพิ่มปริมาณ TEMED หรือแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต จะเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการจับตัวเป็นโพลีอะครีลาไมด์ได้เร็วขึ้น

ระบบไรโบฟลาวิน และ TEMED อาศัยแสงเพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาการจับตัวเป็นพอลิเมอร์ โดยไรโบฟลาวินจะสลายตัวเกิดเป็นอนุมูลอิสระเมื่อได้รับแสง จึงทำให้เกิดการจับตัวของอะครีลาไมด์เป็นโพลีเมอร์ได้โดยไม่จำเป็นต้องมี TEMED แต่ถ้ามี TEMED ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดีกว่าและได้เจลที่สม่ำเสมอกว่า

12. การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

การศึกษาลำดับเบสดีเอ็นเอเป็นวิธีที่จะทำให้ทราบลำดับเบสที่ถูกต้องของดีเอ็นเอ และทำให้ทราบรายละเอียดของยีนทั้งในส่วนที่ถอดรหัสได้ (coding region) และส่วนที่ไม่ถอดรหัส (non-coding region) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรม ประชากรศาสตร์ (population genetics) ได้ โดยได้มีการพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอขึ้นมา 2 วิธีด้วยกัน ดังนี้

- Dideoxy chain termination method ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดย F. Sanger และ A.R. Coulson จากประเทศอังกฤษ

- Chemical degradation method ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดย A. Maxam และ W. Gilbert จากประเทศสหรัฐอเมริกา (สุรางค์, จินตนา, และฉัญฉุญา, 2003)

12.1 Dideoxy chain termination method (The Sanger-Coulson method)

วิธี chain termination ต้องการ DNA สายเดี่ยวและโมเลกุลที่จะหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ มักจะถูก cloned ลงใน M13 vector ที่เป็นเช่นนี้เพราะวิธีนี้ต้องการ การสังเคราะห์ DNA สายที่ 2 โดยการใส่เอนไซม์ ซึ่ง DNA สายที่ 2 นี้จะมีลำดับของเบส complement กับลำดับของเบสบน DNA แม่พิมพ์

ขั้นแรก ต้องให้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์สั้นๆ จับคู่กับ recombinant M13 molecule โอลิโกนิวคลีโอไทด์นี้จะทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ สำหรับการสร้างสายใหม่ที่ complement กับชิ้นส่วน DNA ที่เติมเข้าไปในยีน M13 เอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างคือ รูปดัดแปรของ DNA พอลิเมอเรส I (modified form of DNA polymerase I)

นอกจากนี้ยังต้องมีไดออกซีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดคือ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP รวมทั้งนิวคลีโอไทด์ที่ถูกดัดแปลงชนิดหนึ่งคือ ไดไดออกซีนิวคลีโอไทด์ (dideoxynucleotide, dideoxy ATP) ซึ่งสามารถเข้าไปอยู่ในสายพอลินิวคลีโอไทด์ สายใหม่ เช่นเดียวกับไดออกซีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิดดังกล่าว เมื่อ dideoxy ATP เข้าไปอยู่ในสายจะทำให้หยุดการสร้างสายต่อไป ทั้งนี้เพราะ dideoxy ATP ขาดหมู่ OH ที่ตำแหน่ง 3' ของน้ำตาล ซึ่งหมู่จำเป็นสำหรับการจับของนิวคลีโอไทด์หน่วยใหม่

ถ้าเติม dideoxy ATP ในปฏิกิริยาจะทำให้หยุดการเพิ่มความยาวที่ตำแหน่งตรงข้ามกับ ไทมิดีน (thymidine) ในสายแม่พิมพ์ แต่การหยุดการเพิ่มความยาวจะไม่เกิดขึ้นที่ T ตัวแรก

เนื่องจากมี dATP อยู่ในสารละลาย dATP จะเข้าไปแทนที่ dideoxy ATP ผลของปฏิกิริยาจะได้สายใหม่ทุกสายมีความยาวแตกต่างกัน และแต่ละสายมีปลายเป็น dideoxy ATP เมื่อใช้ไดคือออกซินิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dideoxy ATP, dideoxy TTP, dideoxy GTP และ dideoxy CTP สำหรับปฏิกิริยาการสร้างสายใหม่

ผลของปฏิกิริยาจะได้พอลินิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 4 ชนิด แต่ละชนิดมีปลายเป็น dideoxy ATP, dideoxy TTP, dideoxy GTP และ dideoxy CTP

ขั้นตอนต่อไปคือ การแยกพอลินิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวต่างกันของแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis) ผลที่ปรากฏให้เห็นเป็นแถบ (band) จำนวนมาก แต่ละแถบเป็น โมเลกุล DNA ที่มีความยาวแตกต่างกัน

ในการอ่านผลจะเริ่มจาก band ที่เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไกลที่สุดบนแผ่นฟิล์มก่อนเนื่องจากดีเอ็นเอชิ้นนั้นมีขนาดเล็กที่สุด ซึ่งแสดงว่าสายดีเอ็นเอสั้นนี้หยุดการสังเคราะห์เนื่องจากมี ddNTP รวมเข้าไปในตำแหน่งแรกของการสังเคราะห์ ซึ่งหมายถึงตำแหน่งแรกบนสายดีเอ็นเอต้นแบบนั่นเอง โดย sequence ที่อ่านได้จากเจลนี้จะเป็น complementary sequence กับดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการอ่านลำดับเบสนั้นจะอ่านถัดมาเรื่อยๆ จนถึงบริเวณที่ band อยู่ติดกันมากจนแยกไม่ได้ว่า band ไหนอยู่ไกลกว่ากัน

12.2 Chemical degradation method (The Maxam-Gilbert method)

เป็นวิธีการที่ใช้ปฏิกิริยาทางเคมีที่จะตัดสาย DNA ที่ตำแหน่งจำเพาะ โดยที่สำคัญ DNA ที่จะนำมาทำการหาลำดับเบสนั้นจะต้องเป็น DNA ชนิดเดียวกัน และมีขนาดประมาณ 200-1000 bp จะทำการหาลำดับเบสของสาย DNA ขนาด 10 bp ขึ้นตอนต่างๆ ในการหาลำดับ nucleotide โดยวิธี Maxam-Gilbert มีดังนี้ คือ

ขั้นที่ 1 ดิดดลากลสาย DNA ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (P32) โดยแต่ละ strand ของ double-stranded DNA จะถูกติดฉลากที่ปลาย 5' หรือ 3' จากนั้น DNA นั้นจะถูกนำมา denature ให้เป็น single strand โดยที่ในแต่ละ strand จะถูกติดฉลากที่ปลายข้างหนึ่งข้างใดเท่านั้น

ขั้นที่ 2 การตัดสาย DNA โดยในขณะนี้ สาย DNA จะมีลักษณะเป็น 3P 5' _____ 3' DNA จะถูกแบ่งเป็น 4 ส่วน แต่ละส่วนจะถูกนำมาทำปฏิกิริยาเคมีที่ต่างกัน โดยจะทำการตัดสาย DNA นั้นที่ตำแหน่งของ base 1 ใน 4 นั้นๆ เช่น ในส่วนที่ 1 จะถูกนำไปทำปฏิกิริยาทางเคมี โดยจะตัดที่ตำแหน่งที่มี base เป็น T หรือ C เท่านั้น สำหรับส่วนที่กำหนดให้ตัดที่ตำแหน่ง

G นั้น จะตัดที่ตำแหน่ง A ด้วย แต่จะตัดที่ตำแหน่งที่เป็น G มากกว่า ในทำนองเดียวกัน ส่วนที่ถูกกำหนดให้ตัดที่ตำแหน่ง A จะตัดที่ G ด้วย แต่จะตัดที่ตำแหน่ง A มากกว่า

ขั้นที่ 3 เป็นการแยกขนาดของ DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาทางเคมีตามขั้นตอนที่ 2 DNA ที่ได้จะถูกนำมาแยกขนาดตามความยาวของเบส โดยใช้วิธี polyacrylamide gel electrophoresis (เหมือนกับ agarose gel electrophoresis เพียงแต่ว่า polyacrylamide gel สามารถที่จะใช้แยกขนาดของ DNA ที่ต่างกันเพียงแค่ 1 bp ได้)

วิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นได้รับการพัฒนามาโดยตลอด ปัจจุบันสามารถทำได้ง่ายโดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่เรียกว่า automate machine ซึ่งสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เร็วขึ้น โดยคัดแปลงมาจากวิธีการ dideoxy sequencing หรือเรียกอีกอย่างว่า dideoxy chain terminating method คือใช้เอนไซม์ DNA polymerase 1 เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ โดยเริ่มจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยใช้ความร้อน (denature) และใช้ sequencing primer ซึ่งเป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่ถูกออกแบบให้ด้าน 3' อยู่ใกล้กับดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์จากนั้น sequencing primer จะจับกับดีเอ็นเอที่ต้องการทราบลำดับนิวคลีโอไทด์กันอย่างเหมาะสมและเอนไซม์ DNA polymerase 1 จะทำการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์จาก deoxyribonucleotide 4 ชนิด (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ที่เติมลงไป ในหลอดทดลองในปริมาณที่เพียงพอ โดยจะทำการสังเคราะห์ทางปลาย 3' ต่อจาก sequencing primer นอกจากนี้จะมีการเติมสาร deoxyribonucleotide 4 ชนิด (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) เพื่อทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไทด์ จบการสังเคราะห์ (chain terminator) ซึ่ง didexyribonucleotide ทั้ง 4 ชนิดจะถูกคิดผลด้วยสีฟลูออเรสเซนส์ต่างๆกัน เนื่องจากปกติเอนไซม์ DNA polymerase ต้องการปลาย 3'-OH ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ แต่ didexyribonucleotide มีปลาย 3'-H แทน 3'-OH ดังนั้นในกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหาก DNA polymerase 1 ดึง didexyribonucleotide เข้ามาแทน deoxyribonucleotide การสังเคราะห์ก็จะหยุด เพราะขาดปลาย 3'-OH ซึ่ง จะป้องกันการเกิด phosphodiester bond กับ 5'-P ของ deoxyribonucleotide ตัวที่จะเข้ามาใหม่ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ทั้งหมดเกิดในหลอดเดียวกัน และเมื่อจบปฏิกิริยาทำการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส เจลช่องเดียว ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ตัวใดในสายนั้นและดีเอ็นเอสายที่มีการหยุดการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์แต่ละตัวนี้จะมีฟลูออเรสเซนส์จากแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลจะบันทึกผลที่ออกมาว่า แถบดีเอ็นเอแถบแรกนั้นเป็นแถบที่มีนิวคลีโอไทด์ตัวใด และตรวจแถบถัดมาเรื่อยๆ ตามลำดับ และแปลผลออกมาเป็น A หรือ T หรือ C หรือ G ตามสีที่คิดผลจากไว้ โดย

ข้อมูลที่ได้จะวิเคราะห์ออกมาเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (สุรินทร์, 2002)

13. การวิเคราะห์ข้อมูล

การคำนวณขนาดตัวอย่างประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ในประเทศไทยยังไม่มีการรายงานความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลจากการศึกษาความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ของประชากรคอเคเซียน (Meech et al., 2012) เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคำนวณตัวอย่างประชากร โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$n = \frac{(p_0q_0 + p_1q_1)(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta})^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

เมื่อ $q_0 = 1-p_0$
 $q_1 = 1-p_1$
 p_0 คือ สัดส่วนจีโนไทป์ที่ไม่ตอบสนอง (non-responders)
 p_1 คือ สัดส่วนจีโนไทป์ที่ตอบสนอง (responders) = (p_0) (RR)
 $Z_{1-\alpha/2}$ คือ ค่าการกระจายปกติมาตรฐานที่สอดคล้องกับ

ค่าแอลฟา (α) สำหรับทดสอบสองด้านของเส้นโค้งมาตรฐานที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($\alpha = 0.05$) (เปิดจากตาราง t-test ที่ $\alpha/2 = 0.05/2 = 0.025$ มีค่าเท่ากับ 1.96)

$Z_{1-\beta}$ คือ ค่าการกระจายปกติมาตรฐานที่สอดคล้องกับระดับ power of 80% มีค่าเท่ากับ 0.84

Relative Risk (RR) คือ ค่าความเสี่ยงสัมพัทธ์ มีค่าเท่ากับ 1.5

ตาราง 4

ข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1*

ตำแหน่ง	SNPs	ความถี่ที่พบ	อ้างอิง
เอกซอน 4	121T>G	0.200	Miner et al., 1991

การคำนวณขนาดตัวอย่างของ SNP ตำแหน่ง 121T>G

หาค่าของ p_1 , q_0 และ q_1 จากเปอร์เซ็นต์ของการเกิด polymorphism

$$\begin{array}{lll} \text{จะได้ } p_0 = 0.200 & RR = 1.5, p_1 = (p_0)(RR) = (0.200)(1.5) = 0.300 & \text{-- } p_1 = 0.300 \\ p_0 = 0.200 & q_0 = 1 - p_0 = 1 - (0.200) = 0.800 & \text{-- } q_0 = 0.800 \\ p_1 = 0.300 & q_1 = 1 - p_1 = 1 - (0.300) = 0.700 & \text{-- } q_1 = 0.700 \end{array}$$

แทนค่าในสมการหาขนาดตัวอย่าง

$$n = \frac{(p_0q_0 + p_1q_1)(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta})^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

$$n = \frac{(0.200)(0.800) + (0.300)(0.700)(1.96 + 0.84)^2}{(0.300 - 0.200)^2}$$

$$n = \frac{(0.37)(7.84)}{0.01}$$

$$n = 289.34 \approx 289$$

จากการคำนวณขนาดตัวอย่างการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ที่ตำแหน่งบน เอกซอน 4 ที่เกิดขึ้นจะมีการใช้จำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้จากการศึกษาของชาวเอเชียเป็นหลัก อย่างน้อย 289 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาการที่เกี่ยวข้องกับการหาความความถี่ของการ กลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในประเทศไทย ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงจะทำการศึกษากลายพันธุ์ของ ยีน *UGT3A1* จำนวน 100 ตัวอย่าง ซึ่งสุ่มมาจากจำนวนตัวอย่างประชากรที่เป็นมุสลิมทั้งหมด 151 ตัวอย่าง โดยจะทำการทดสอบ 3 ส่วนคือ promoter exon 1 และ exon 4

13.1 ความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency)

จีโนไทป์ หมายถึง ลักษณะหรือแบบของยีนที่อยู่เป็นคู่ ๆ ซึ่งควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิตในร่างกาย ซึ่งโดยปกติลักษณะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งลักษณะจะถูกควบคุมโดยยีนอย่างน้อย 1 คู่

ความถี่จีโนไทป์ คือ ปริมาณจีโนไทป์ชนิดต่าง ๆ เมื่อคิดเป็นสัดส่วนหรือร้อยละต่อปริมาณจีโนไทป์ ทั้งหมดของยีนในตำแหน่งเดียวกัน

$$\text{ความถี่ของจีโนไทป์} = \frac{\text{จำนวนประชากรที่มีจีโนไทป์นั้น}}{\text{จำนวนประชากรทั้งหมด}}$$

13.2 ความถี่แอลลีล (allele frequency)

สิ่งมีชีวิตที่เป็นดิพลอยในแต่ละเซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพียง 2 ชุด และแต่ละยีนจะมี 2 แอลลีล ดังนั้นถ้าเรารู้จำนวนจีโนไทป์แต่ละชนิดของประชากร เราจะสามารถหาความถี่ของจีโนไทป์ (genotype frequency) และความถี่ของแอลลีลในประชากรได้

ความถี่แอลลีล คือ ปริมาณของแอลลีลชนิดต่าง ๆ เมื่อคิดเป็นสัดส่วนหรือร้อยละต่อจำนวนแอลลีลทั้งหมดของยีนในตำแหน่งเดียวกัน

$$\text{ความถี่ของแอลลีล} = \frac{\text{จำนวนของแอลลีลนั้น}}{\text{จำนวนแอลลีลทั้งหมด}}$$

13.3 สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium)

"Hardy-Weinberg law" ถูกตั้งขึ้นในปีค.ศ. 1908 โดย G.H. Hardy นักคณิตศาสตร์ชาวอังกฤษ และ Wilhelm Weinberg แพทย์ชาวเยอรมัน กล่าวว่า ในประชากรที่มีสภาพสมดุล ความถี่ของยีนและจีโนไทป์จะมีค่าคงที่จากชั่วอายุหนึ่งไปอีกชั่วอายุหนึ่ง โดยที่สภาพความสมดุลดังกล่าวจะต้องอยู่ภายใต้สภาพต่อไปนี้

1. เป็นประชากรขนาดใหญ่ มีการจับคู่ผสมพันธุ์แบบสุ่ม (random mating)
2. ยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษา มีตำแหน่งอยู่บนออโตโซม (autosome)

3. ไม่มีมิวเทชัน (no mutation) คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีน จาก แอลลีลหนึ่งไปเป็นอีกแอลลีลหนึ่ง

4. ไม่มีการอพยพ (no migration) คือ ไม่มีการย้ายถิ่นฐานของสมาชิก จาก ประชากรหนึ่งไปยังอีกประชากรหนึ่ง

5. ไม่มีการคัดเลือก (no selection) คือ ทุกจีโนไทป์ในประชากรมีความสามารถในการอยู่รอด ผสมพันธุ์และผลิตลูกหลานได้เท่า ๆ กัน

6. การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสดำเนินไปอย่างปกติ คือ เซลล์สืบพันธุ์ทุกเซลล์ที่ ผลิตได้ สามารถทำหน้าที่ได้

ถ้าประชากรใดอยู่ภายใต้ข้อกำหนดเหล่านี้ ประชากรดังกล่าวจะมีความถี่แอลลีล และความถี่จีโนไทป์คงที่ในทุกรุ่น ลักษณะนี้เรียกว่าสมดุลของประชากร

ตัวอย่าง กำหนด A และ a เป็นแอลลีลทั้งหมดของยีน เอ โดยที่แอลลีล A มีความถี่ p และแอลลีล a มีความถี่ q โดยที่ $p + q = 1$ และ $(p + q)^2 = 1$ และ $(p + q)^n = 1$ โดยที่ n เป็น จำนวนรุ่น

$$\text{เมื่อแตกสมการออกมา } (p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

$$\text{โดยที่ในความเป็นจริงแล้ว } p^2 = \text{ความถี่ของจีโนไทป์ AA}$$

$$2pq = \text{ความถี่ของจีโนไทป์ Aa}$$

$$q^2 = \text{ความถี่ของจีโนไทป์ aa}$$

14. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT3A1* บริเวณ promoter exon 1 และ exon 4 ในประชากรมุสลิมภาคใต้ในจังหวัดสงขลา

15. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาทางผู้วิจัยจึงตระหนักถึงความสำคัญของการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT3A1* ซึ่งอาจก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาซึ่งถูกเมตาบอลิซึมด้วยเอนไซม์ที่ผิดปกติ หรืออาจเกิดความผิดปกติในกระบวนการขับออกน้ำดี ซึ่งอาจจะทำให้เกิดโรคนิ่วในถุงน้ำดี อีกทั้งยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมในประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการ

กลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในประชากรมุสลิมในจังหวัดสงขลา เพื่อดูความถี่ในการเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม นำข้อมูลไปใช้ในการอธิบายการเกิดพยาธิสภาพเกี่ยวกับกระบวนการสร้างน้ำดี อีกทั้งอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ในการเกิด atherosclerosis ได้ และในอนาคตคาดว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาที่ถูกเมตาบอไลซ์ด้วยเอนไซม์ *UGT3A1* ที่ผิดปกติได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการศึกษา

1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่าง ๆ ทั้งหมดที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด genomic DNA, การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนด้วยวิธี PCR การตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของยีนด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และการทำ PCR product purification แสดงดังนี้

ขั้นตอนการสกัดชิ้นส่วน DNA

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- Pipettes tips ขนาด 0.1-1 μ l, 1-200 μ l และ 1000 μ l จาก Labcon North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 μ l จาก Labcon North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ถังมือรูน Sempermed[®] จากสยาม เซมเพอร์เมด จำกัด ประเทศไทย
- Micropipette รูน Pipetman ขนาด P2, P20, P200 และ P1000 จาก Gilson S.A.S. ประเทศฝรั่งเศส
- เครื่องเขย่า (vortex mixer) รูน Vortex-Genie[®] 2 จาก Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รูน Wise Spin[®] CF-10 จาก Daihan Scientific ประเทศเกาหลีใต้
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รูน WiseBath[®] WB-11 จาก Daihan Scientific ประเทศเกาหลีใต้
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รูน Biomate3 จาก Thermo Electron ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ตู้แช่ -80°C รูน MDF-U74V จาก ชัน โย คอมเมอร์เชียล โซลูชันส์ จำกัด ประเทศไทย

สารเคมี

- ชุด Illutra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit ประกอบด้วย proteinase K, lysis solution, washing buffer (เติม ethyl alcohol absolute) และ elution buffer จาก GE healthcare ประเทศสหราชอาณาจักร
- Ethyl alcohol absolute (C₂H₆O, MW=46.07) จาก VWR International S.A.S. ประเทศฝรั่งเศส

ขั้นตอนการทำ PCR และ agarose gel electrophoresis

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- Pipettes tips ขนาด 0.1-1 µl, 1-200 µl และ 1000 µl จาก Labcon North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 µl จาก Labcon North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
- PCR tubes ขนาด 0.2 ml จาก Biologix Research company ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ขวด Duran ขนาด 500 และ 1000 ml จาก SCHOTT ประเทศเยอรมัน
- ถังมือรูน Sempermed® จากสยาม เซมเพอร์เมด จำกัด ประเทศไทย
- Micropipette รูน Pipetman ขนาด P2, P20, P200 และ P1000 จาก Gilson S.A.S. ประเทศฝรั่งเศส
- เครื่องเขย่า (vortex mixer) รูน Vortex-Genie® 2 จาก Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง Mycycler™ Thermal Cycler จาก Bio-rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง PowerPac™ Basic และ ชุด Mini-Sub® Cell GE จาก Bio-rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation) รูน Biospectrum® Multispectral Imaging System จาก UVP ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องชั่งไฟฟ้า รูน PL3002 Precision Balance จาก Mettler Toledo LTD. ประเทศไทย

- ไมโครเวฟ จาก แอลจี อีเลคทรอนิกส์ จำกัด ประเทศไทย
- ตู้แช่ -20°C รุ่น SF-C1497 (GYN) จาก ชันโย คอมเมอร์เชียล โซลูชั่นส์

จำกัด ประเทศไทย

สารเคมี

- Primer (forward และ reverse primers) จาก Integrated Device Technology, Inc. (IDT) ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase ขนาด 500 U ประกอบด้วย *Taq* DNA Polymerase, 10X PCR Buffer minus Mg^{2+} และ 50 mM $MgCl_2$ จาก Invitrogen™ ประเทศบราซิล
- dNTPs จาก Invitrogen™ ประเทศบราซิล
- OneMARK 100 DNA ladder จาก GeneDireX, Inc. ประเทศไต้หวัน
- Novel Juice จาก GeneDireX, Inc. ประเทศไต้หวัน
- Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) disodium salt dehydrate ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$, MW=372.24) จาก AMERSCO Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- TRIS ($C_4H_{11}NO_3$, MW= 121.14) จาก AMERSCO Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ผงเจล Agarose I™ AMERSCO Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Glacial acetic acid (CH_3COOH , MW= 60.05) จาก Guangdong Guanghua Chemical Factory ประเทศจีน

ขั้นตอนการ PCR purification

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- Pipettes tips ขนาด 0.1-1 μ l, 1-200 μ l และ 1000 μ l จาก Labcon North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 μ l จาก Labcon North America ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ถุงมือรุ่น Sempermed® จากสยาม เซมเพอร์เมด จำกัด ประเทศไทย
- Micropipette รุ่น Pipetman ขนาด P2, P20, P200 และ P1000 จาก Gilson S.A.S. ประเทศฝรั่งเศส

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Wise Spin[®] CF-10 จาก Daihan Scientific ประเทศเกาหลีใต้
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Biomate3 จาก Thermo Electron ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ตู้แช่ -20°C รุ่น SF-C1497 (GYN) จาก ชันโย คอมเมอร์เชียล โซลูชั่นส์ จำกัด ประเทศไทย

สารเคมี

- ชุด QIAquick PCR purification Kit ประกอบด้วย buffer PB (binding buffer), buffer PE (washing buffer) (เติม ethyl alcohol absolute), buffer EB (elution buffer) จาก QIAGEN ประเทศเยอรมัน
- Ethyl alcohol absolute (C₂H₆O, MW=46.07) จาก VWR International S.A.S. ประเทศฝรั่งเศส

2. วิธีการศึกษา

2.1 ประชากรที่ศึกษา

2.1.1 การศึกษาในครั้งนี้ได้รับการพิจารณาอนุญาตและรับรองจาก คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ภาคผนวก ก)

2.1.2 กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นทารกแรกเกิดจากหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ และคลอดที่โรงพยาบาลสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ก่อนการเก็บตัวอย่างเลือดจากสายสะดือทารกแรกเกิด หญิงตั้งครรภ์จะได้รับข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา วิธีการศึกษาและประโยชน์ที่จะได้รับในการศึกษา และเซ็นต์ใบยินยอมในการเข้าร่วมโครงการ จากนั้นจะทำการเก็บข้อมูลโดยใช้แบบสอบถามเกี่ยวกับประวัติของทารก มารดา บิดา และบรรพบุรุษ

2.1.3 เนื่องจากงานวิจัยนี้ยังไม่มีการศึกษาในคนไทย การเลือกจำนวนตัวอย่างประชากรจึงใช้การสุ่มหมายเลขตัวอย่างจาก โปรแกรม Microsoft excel จำนวน 100 ตัวอย่าง (ภาคผนวก ข) โดยประชากรตัวอย่างที่นำมาใช้เป็นประชากรมุสลิมโดยมีการสอบถาม

จากบิดาและมารดาของทารก โดยจะกำหนดให้มีบรรพบุรุษ เป็นคนไทย นับถือศาสนาอิสลาม จำนวนอย่างน้อย 3 generations จึงนำมาใช้ในการวิจัย แต่เนื่องจากประชากรทั้ง 100 ตัวอย่างที่ได้ ทำการสุ่มมานั้นมีประชากรซึ่งมีบิดาและมารดาไม่ได้มีภูมิถิ่นอาศัยอยู่ในภาคใต้ 3 ตัวอย่าง จึงไม่ได้นำ ตัวอย่างทั้ง 3 รายมาใช้ในการศึกษา ดังนั้นจึงทำการศึกษาจำนวนประชากรตัวอย่างทั้งหมด 97 ตัวอย่าง

2.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *UGT3A1*

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *UGT3A1* โดยสร้างสายไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่ง promoter exon 1 และ exon 4 แล้วทำการคำนวณค่า melting temperature (T_m), %GC content และตรวจ self-complementary โดยใช้โปรแกรมที่ให้บริการฟรีบนอินเทอร์เน็ต (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) และใช้โปรแกรม nucleotide blast จากเว็บไซต์ NCBI เพื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบต่อยีน *UGT3A1* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>)

ตาราง 5

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *UGT3A1* ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ exon 1 และ exon 4 ในประชากรไทยภาคใต้ (NCBI Reference Sequence: NC_000005.10)

ตำแหน่ง	ขนาด (bps.)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
Promoter (-402 ถึง +117)	519	Forward 5' - CAGCTCCACGAAAGACAGGT - 3' Reverse 5' - GAATTCTCCGGCCAAGCACT - 3'
Exon 1 (-252 ถึง +178)	430	Forward 5' - CCAACCCCCTCCTACTGACT - 3' Reverse 5' - CTGATCAATCGCCGTTCGC - 3'
Exon 4 (+25,047 ถึง +25,590)	904	Forward 5' - GGCTCCCAGAGTAGGACGTT - 3' Reverse 5' - TTCAACCTCAGGATCCCCTG - 3'

2.3 การสกัด genomic DNA

การสกัด genomic DNA ของตัวอย่าง โดยใช้ชุด Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit

2.3.1 เติมเอนไซม์ proteinase K ปริมาตร 20 μ l ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

2.3.2 เติมตัวอย่าง buffy coat ที่แยกจากเลือดที่เก็บจากสายสะดือทารกแรกเกิด ปริมาตร 300 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน

2.3.3 เติม lysis buffer ปริมาตร 400 μ l แล้วเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที (เขย่าตัวอย่างทุก ๆ 5 นาที โดยสีของตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน

2.3.4 คูดตัวอย่างจากข้อ 2.3.3 ลง column ของชุดสกัด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารใน collection tube ทิ้ง แล้วนำกลับมาสวมกับ column เหมือนเดิม

2.3.5 เติม lysis buffer ปริมาตร 500 μ l ลงไปใน column แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารใน collection tube ทิ้ง แล้วนำกลับมาสวมกับ column เหมือนเดิม

2.3.6 เติม washing buffer ปริมาตร 500 μ l แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเทสารใน collection tube ทิ้ง แล้วหมุนเหวี่ยงซ้ำที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2.3.7 นำ column สวมกับ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่

2.3.8 เติม elution buffer ปริมาตร 200 μ l โดยหยดตรงกลางของ column แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2.3.9 นำตัวอย่าง genomic DNA ปริมาตร 5 μ l ผสมกับน้ำ 495 μ l แล้ววัดความเข้มข้นของ genomic DNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

2.3.10 เก็บตัวอย่าง genomic DNA ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

2.4 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *UGT3A1* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain

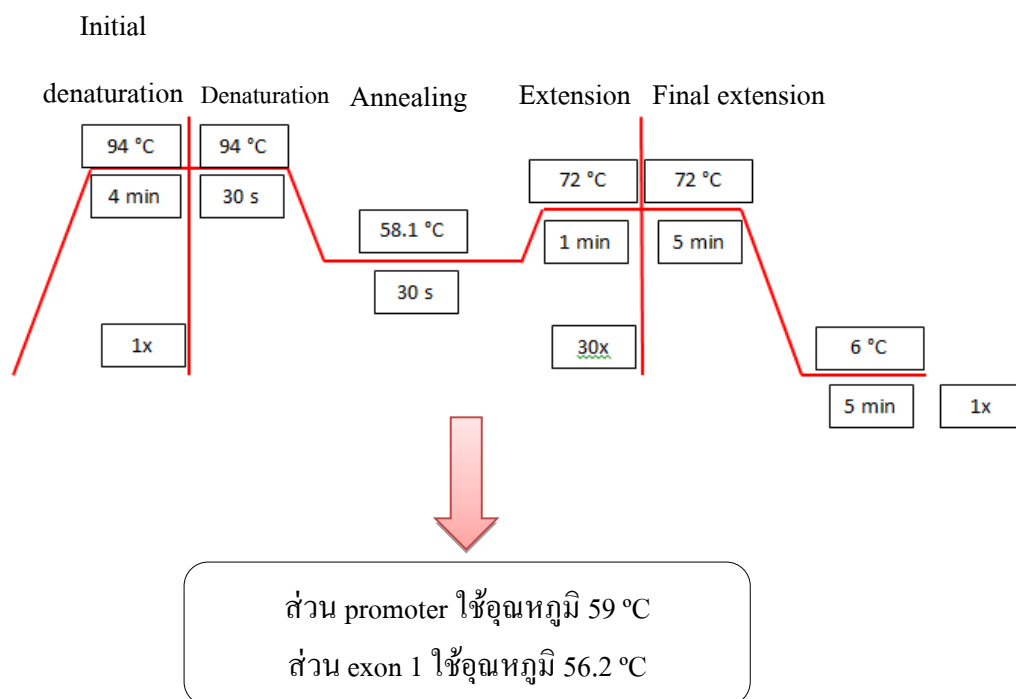
Reaction (PCR)

เตรียม PCR master mix (1x) ซึ่งประกอบด้วย Taq buffer, MgCl₂, Primer mixture (forward และ reverse primer), dNTPs mixture ความเข้มข้น 0.2 mM, *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1.25 U/μl และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (sterile distilled water) (ตาราง 6) จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง Mycycler™ Thermal Cycler โดยมี PCR cycle ดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94.0 °C 4 นาที 1 รอบ 94.0 °C 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 58.1 °C 30 วินาที (exon 4) (สำหรับส่วน promoter ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing 59 °C และส่วน exon 1 ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing 56.2 °C) และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72.0 °C 1 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ ต่อด้วยที่อุณหภูมิ 72.0 °C 5 นาที และ 6.0 °C 5 นาที 1 รอบ (ภาพ 1) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนยีนที่ต้องการบน 1.5% agarose gel โดยขนาดของชิ้นส่วนของยีนเท่ากับ 532 bps. ในส่วนของ promoter, 439 bps. ในส่วนของ exon 1 และ 904 bps. ในส่วนของ exon 4 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำ PCR product มาทำ purification และส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน (DNA sequencing) ต่อไป

ตาราง 6

Reaction mixture สำหรับการทำให้ PCR

Reaction mixture	ปริมาตร 20 μl
Genomic DNA template	1 μl
Primer mixture (forward และ reverse primer)	2 μl
Taq buffer (MgCl ₂ free)	2 μl
MgCl ₂ 25 mM	1.4 μl
dNTPs mixture (2.5 mM each)	0.5 μl
<i>Taq</i> DNA polymerase 1.25 U/μl	0.5 μl
Sterile distilled water	12.6 μl



ภาพ 15. PCR cycle ของการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของยีน *UGT3A1*

2.5 การตรวจสอบชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

2.5.1 นำ PCR product 5 μ l มาเติม novel juice 1 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน

2.5.2 เตรียม 1.5% agarose gel โดยการใส่ agarose powder 1.5 g ผสมกับ 1X TAE buffer 100 ml ใช้ปริมาตร 45 ml รอบประมาณ 1 ซม. ให้ gel เช็ดตัว โดยใช้หัวสำหรับการใส่ตัวอย่างขนาด 15 ช่อง ในการตรวจสอบขนาดของยีน 10 ตัวอย่าง

2.5.3 ใส่ Onemark-DNA ladder 100 6 μ l ลงไปในช่องแรกของ 1.5% agarose gel จากนั้นเติม 1X TAE buffer จนถึงระดับที่กำหนด แล้วตั้งค่าเครื่องจ่ายไฟเป็นกระแสไฟฟ้า 100 volt, กำลังไฟฟ้า 100 mA และใช้เวลา 30 นาที

2.5.4 นำเจลไปถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง Gel documentation รุ่น Biospectrum[®] Multispectral Imaging System

2.6 การทำ PCR purification

2.6.1 นำ buffer PB (binding buffer) 50 μ l ผสมกับ PCR reaction product 10 μ l แล้วใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หากสารละลายเป็นสีส้มหรือสีม่วง ให้เติม 3M sodium acetate 3 μ l

2.6.2 ดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงใน QIAquick column และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2.6.3 เทสารจาก collection tube ทิ้งไปแล้วนำมาสวมใหม่ แล้วเติม buffer PE (washing buffer) 750 μ l และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารจาก collection tube ทิ้งไปแล้วนำมาสวมใหม่ และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง

2.6.4 นำ column สวมกับ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

2.6.5 เติม buffer EB (eluting buffer) 30 μ l ลงใน column และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

2.7 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี DNA sequencing

นำ purified PCR product ที่ได้ มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามที่บริษัทตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์กำหนด โดยการเตรียม purified PCR product ที่ความเข้มข้น 40 ng/ μ l และความเข้มข้นของไพรมเมอร์ 10 pmol/ μ l จากนั้นส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT3A1* ด้วยวิธีการ direct sequencing ที่บริษัท FirstBASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย จากนั้นนำผลที่ได้มาตรวจสอบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน โดยจะเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์พื้นฐานจาก NCBI Reference Sequence: NC_000005.10

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.8.1 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ได้จากการวิเคราะห์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT3A1* ที่ปกติ จากฐานข้อมูล Genbank (NCBI Reference Sequence: NC_000005.10) โดยใช้โปรแกรม EMBOSS Stretcher (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/nucleotide.html) เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายพันธุ์

2.8.2 การวิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน โดยใช้โปรแกรม SNPalyze version 9.0 (trial version) บริษัท Dynacom Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น (https://www.dynacom.co.jp/english/snpyalyze_e/e_sa_demo.html) เพื่อวิเคราะห์หา

- ความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency)
- ความถี่แอลลีล (allele frequency)
- สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium)

บทที่ 3

ผลการศึกษา

จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 97 ตัวอย่าง ได้จากการสุ่มหมายเลขของตัวอย่าง genomic DNA จาก cord blood ของทารกแรกเกิดจากหญิงตั้งครรภ์ที่แสดงความยินยอม เข้าร่วมโครงการ ที่มาคลอดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา เป็นคนไทย เชื้อชาติไทย โดยคลอดในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel จำนวน 97 ตัวอย่าง (ภาคผนวก ข) และเก็บข้อมูลทั่วไปด้วยแบบสอบถาม ซึ่งมีข้อมูลดังนี้

1. ข้อมูลทั่วไปของทารกแรกเกิด

ข้อมูลทารกแรกเกิด ทารกแรกเกิดที่เข้าร่วมการศึกษามีทั้งหมด 97 คน มีอายุครรภ์เฉลี่ย 37.9 ± 0.8 สัปดาห์ (33-41 สัปดาห์) ซึ่งเป็นทารกที่คลอดโดยวิธีธรรมชาติ เป็นทารกเพศชาย 50 คน (51%) เพศหญิง 47 คน (49%) น้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย $3,116.06 \pm 415.78$ กรัม (2,130-4,150 กรัม)

ข้อมูลของบิดา อายุเฉลี่ย 30.07 ± 6.44 ปี (16-53 ปี) ภูมิลำเนาเกิด ภาคใต้ 100% (สงขลา 89 คน นครศรีธรรมราช 3 คน นราธิวาส 1 คน ปัตตานี 1 คน พัทลุง 1 คน สตูล 2 คน)

ข้อมูลมารดา อายุเฉลี่ย 27.41 ± 6.44 ปี (16-42 ปี) ภูมิลำเนาเกิด ภาคใต้ 100% (สงขลา 89 คน นราธิวาส 1 คน นครศรีธรรมราช 5 คน ปัตตานี 1 คน พัทลุง 1 คน)

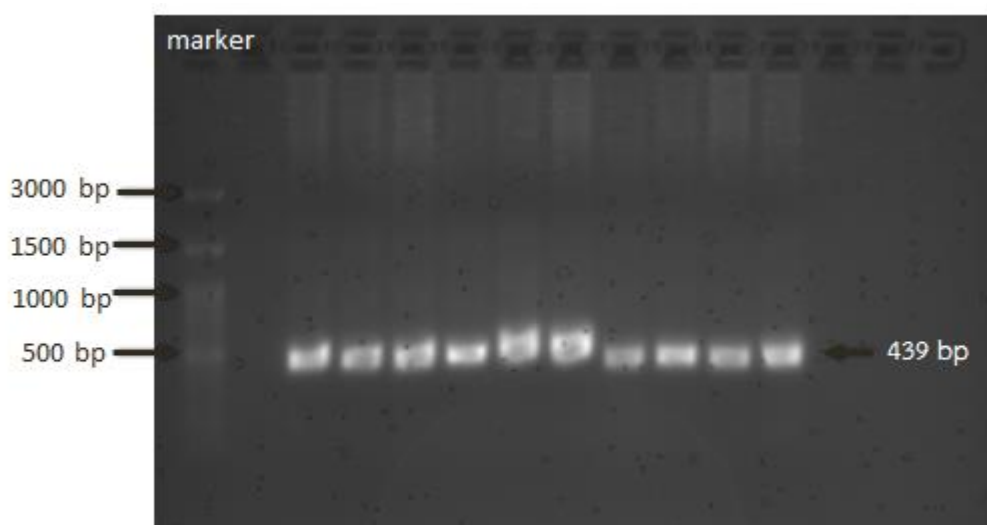
2. การกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1*

ตัวอย่างของ DNA ของทารกแรกเกิดที่เกิดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา ทั้งหมด 97 ตัวอย่าง เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนด้วยวิธี PCR และนำมาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของยีนดังนี้ ในส่วนของ promoter มีขนาด 532 bps. ในส่วนของ exon 1 มีขนาด 439 bps. และในส่วนของ exon 4 มีขนาด 904 bps. ตามลำดับ ซึ่งจะทำการตรวจสอบด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis (ภาพ 16) และส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์

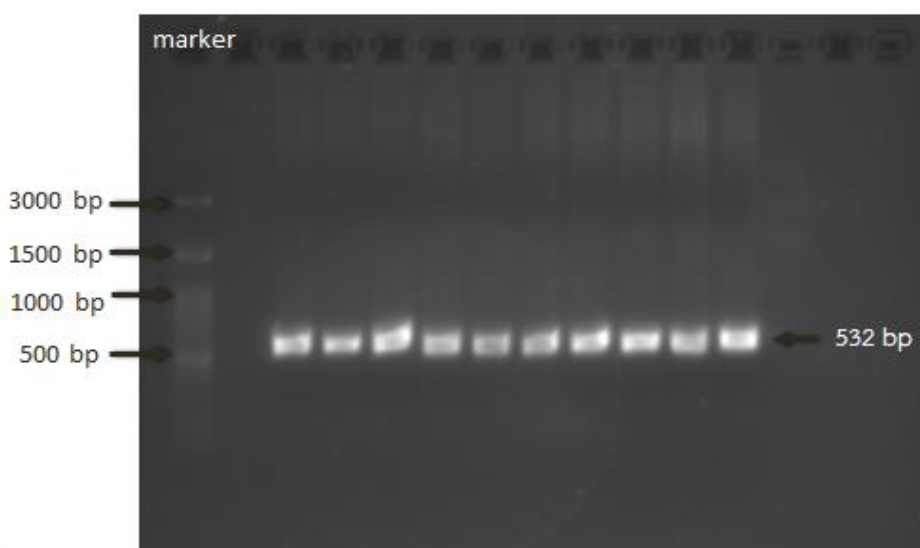
จากผลการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* จำนวน 1 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่มีการรายงานมาก่อนแล้ว (known mutation) ใน exon 4 (coding region) คือ 361T>G โดยเปลี่ยนจากกรดอะมิโนจาก TGT (cysteine) เป็น GGT (glycine) และอีก

ตำแหน่งหนึ่งซึ่งอยู่ในบริเวณของโปรโมเตอร์ (promoter region) ซึ่งยังไม่มีผลการรายงาน คือ -219A>G โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT3A1* แบบปกติ (wild-type) จากฐานข้อมูล NCBI Reference Sequence: NC_000005.10 แสดงดังภาพ 17

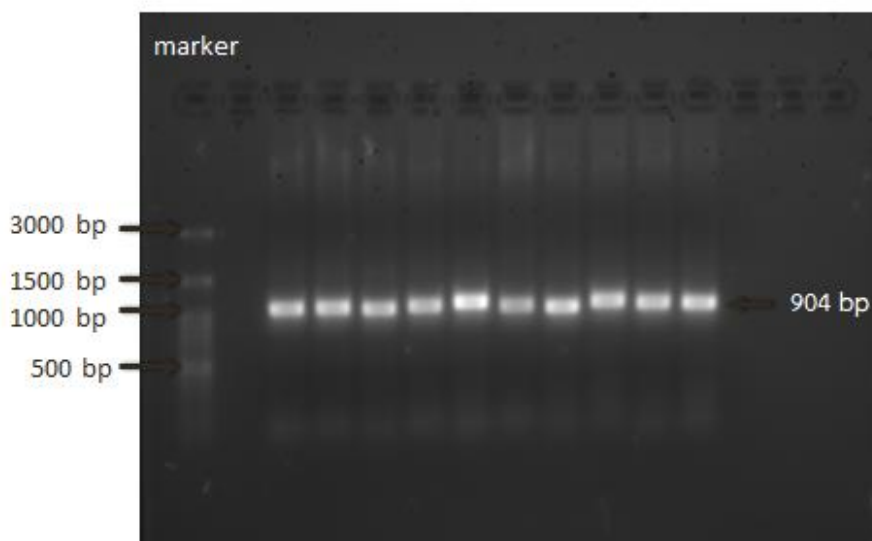
ก) ขนาดของชิ้นส่วนของยีนในตำแหน่ง promoter (439 bps.)



ข) ขนาดของชิ้นส่วนของยีนในตำแหน่ง exon 1 (532 bps.)



ค) ขนาดของชิ้นส่วนของยีนในตำแหน่ง exon 4 (904 bps.)



ภาพ 16. 1.5% agarose gel electrophoresis ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *UGT3A1* โดยแต่ละช่องจะแสดงตัวอย่างของชิ้นส่วน DNA ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

- ก) ขนาดของชิ้นส่วนของยีนในตำแหน่ง promoter (439 bps)
- ข) ขนาดของชิ้นส่วนของยีนในตำแหน่ง exon 1 (532 bps)
- ค) ขนาดของชิ้นส่วนของยีนในตำแหน่ง exon 4 (904 bps)

- **Enhancer module**

```

attaacgtgatttactgagggccctgtcattctggctcttagtaaggattttccagataggacagctgtgatcgcaggcag
                                RXRA                                REST      ATF3
                                -219A>G
agaaagggttagatcaggtaccaccccctctactgacttcaggtagttfAtagggtaggggcagattatcccatgga
                                SP1                                ZBTB33
gcatgcaccaggggagggggcagcgggaaagagaacgaacagaagggcgagagaattggcaggatccgtctctac
ctttcttaggcccacagcc
  
```

- **Promoter**

```

                                GC-box
agtgcccttggagtactgagggcgccacagagtccttagcccggcgaggggcgcgagcccaggctgagatccgtgcttct
                                ← -1
gtggaagtgagc
  
```

- **Exon 1 (1-94)**

Start codon

```

ATGgttgggcagcgggtgctgcttctagtgccctctctttctggggctctgctctcagaggctgccc aaatcctgacaat
atctacactgg
  
```

- Exon 2 (95-196)

gtggaagccattacctactgttggaccgggtgtctcagattctcaagagcatggtcataatgtgactatgcttcatcagagtg
gaaagttttgatcccag
- Exon 3 (197-311)

atattaaagaggaggaaaaatcataccaagttatcaggtggtttcacctgaagatcatcaaaaaagaattaagaagcatttt
gatagctacatagaacagcattggatggcag
- Exon 4 (312-843)

361T>G (C121G)

aaaagaatctgaagccctttaaagctaataaggaaatatttgggactcaa **TGT** agttatttgcctaagcagaaaggatataat
ggattccttaaagaatgagaactatgatctggtatttgttgaagcatttgatttctgttcttctctgattgctgagaagcttgtaa
accatttgggccattcttcccaccacattcggtcttggatttgggctaccaagcccttcttatgttccagatttcccttc
ttgtgactgatcacatggacttctggggccgagtgagaatatttctgatgttctttagtttctccaggagccaatgggacatgc
agtctacattgacaacaccatcaaggagcatttcccagaaggctctagggcagtttctctcatcttctactgaaagcagagt
tgtggtttgtaactctgattttgcctttgattttgcccgccctgcttccaacactgfttatattggaggcttgatggaaaaac
ctattaaaccagtaccacaa
- Exon 5 (844-1,075)

Gacttgacaacttcattgccaacttggggatgcagggtttgccttggccttggctccatgttgaacacccatcagtcce
aggaagtctcaagaagatgcacaatgcctttgccacctccctcaaggagtgatatggacatgtcagagttctcattggccc
agagatgttcatttggccacaaatgtgaaaattgtggactggttctcagagtgacctctgg
- Exon 6 (1,076-1,295)

Ctccccagcatccgtcttttgcactcatggtgggcagaaacagcgtaatggaggccatccgcatggtgtgcccatggtg
ggattaccagtcaatggagaccagcatggaaacatggtccgagtagtagccaaaaattatggtgtctctatccggttgaatca
ggtcacagccgacacactgacactfacaatgaaacaagtcataagaagacaagag
- Exon 7 (1,286-1,572)

gtacaagtggcagtggtggcagccagtgatcctgcactctcagccctgagccccgcacagcggctggtgggctggatc
gaccacatctccagactgggggagcgcacacctcaagccctatgcttccagcagccttggcatgagcagttacctcattg
atgtctttgtttctgctgggctcactctgggactatgtggctttgtgggaagctgctgggtggtggccaggtggctgctg
ggggccaggaaggtgaagaagaca TGA

Stop codon

ภาพ 17. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT3A1* บนตำแหน่ง promoter และบริเวณที่มีการแปลรหัสของ exon 1 ถึง 7 (NCBI Reference Sequence: NC_000005.10)

2.1 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1*

พบตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ทั้งหมด 2 ตำแหน่ง โดยจะเป็นตำแหน่งซึ่งอยู่ในบริเวณ coding region (exon 4) 361T>G ซึ่งในตำแหน่งนี้จะทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโน codon ที่ 121 ของยีน *UGT3A1* ซึ่งจัดเป็นการกลายพันธุ์แบบ missense mutation โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก TGT (cysteine) เป็น GGT (glycine) โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาจะพบว่า การกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้จะเกิดขึ้นในมนุษย์และจะทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์ที่สร้างออกมาไม่ทำงาน (inactive protein or enzyme) (Meech et al., 2012) และบริเวณ promoter region (โปรโมเตอร์) -219A>G 1 ตำแหน่ง ซึ่งยังไม่มีการรายงานถึงผลที่เกิดขึ้นเมื่อมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ เป็นตำแหน่งที่อยู่ระหว่าง RXRA กับ SP1 (ภาพ 17) สำหรับบริเวณ exon 1 ไม่พบการกลายพันธุ์ใด ๆ การเปรียบเทียบตำแหน่งของยีนที่เกิดกลายพันธุ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์แบบปกติ (wild-type) ของยีน *UGT3A1* NCBI Reference Sequence: NC_000005.10 ใต้แสดงเป็น electropherograms ดังแสดงในภาพ 18 และ 4-4

2.2 สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

จากการวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของยีน *UGT3A1* ทั้ง 2 แบบ พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในตำแหน่งซึ่งอยู่ในบริเวณ exon4 (361T>G) เป็นไปตามกฎของฮาร์ดีไวน์เบิร์กและในตำแหน่งบริเวณ โปรโมเตอร์ (-219A>G) ไม่เป็นไปตามกฎของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (ตาราง 7)

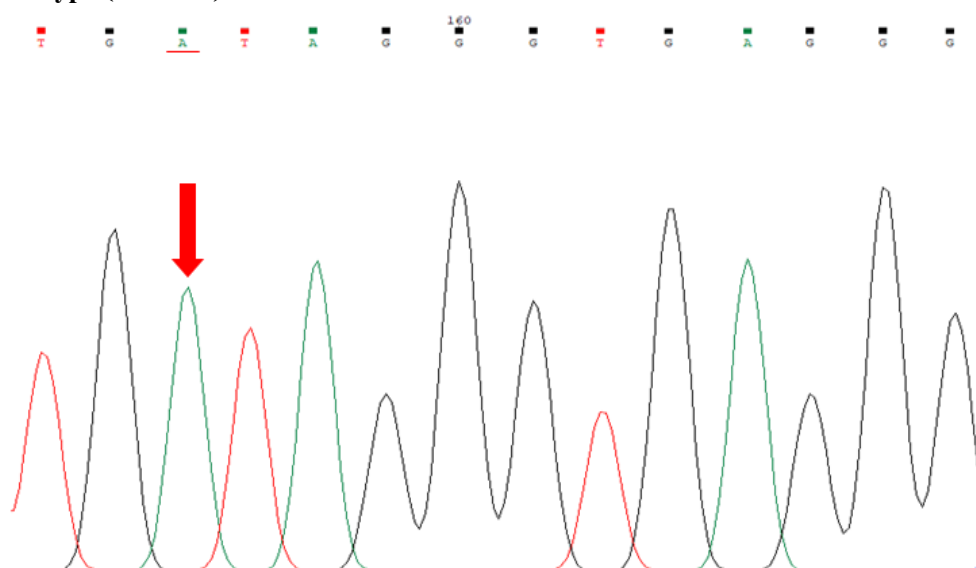
2.3 ความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency)

สำหรับความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) ของแต่ละ variant แสดงในตารางที่ 4-1 ซึ่งในตำแหน่งของการกลายพันธุ์ 361T>G มีความถี่ของ homozygous mutation อยู่ที่ 0.044 และมีความถี่ของ heterozygous mutation อยู่ที่ 0.332 สำหรับในตำแหน่งการกลายพันธุ์ -219A>G มีความถี่ของ homozygous mutation อยู่ที่ 0.011

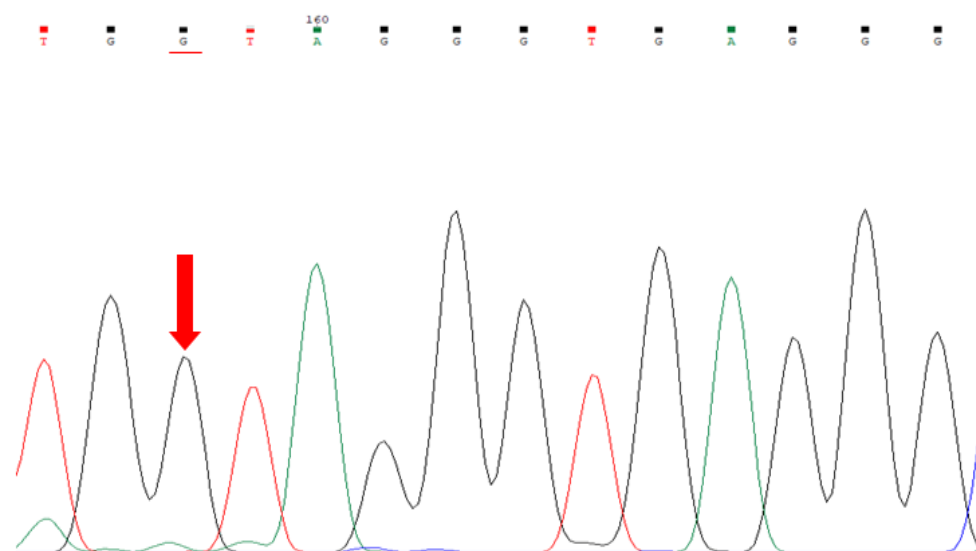
2.4 ความถี่แอลลีล (allele frequency)

สำหรับความถี่แอลลีล (allele frequency) ของยีน *UGT3A1* ทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยเรียงลำดับจากความถี่สูงไปต่ำดังนี้ 361T>G (0.21) และ -219A>G (0.01) (ตาราง 7)

ก) Wild type (-219A/A)

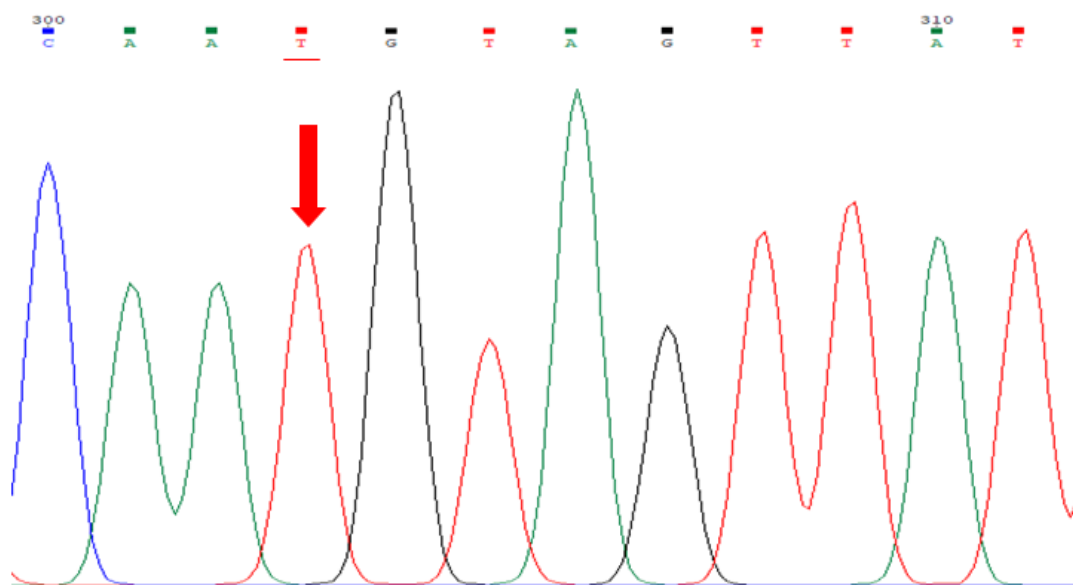


ข) Homozygous mutation (-219G/G)

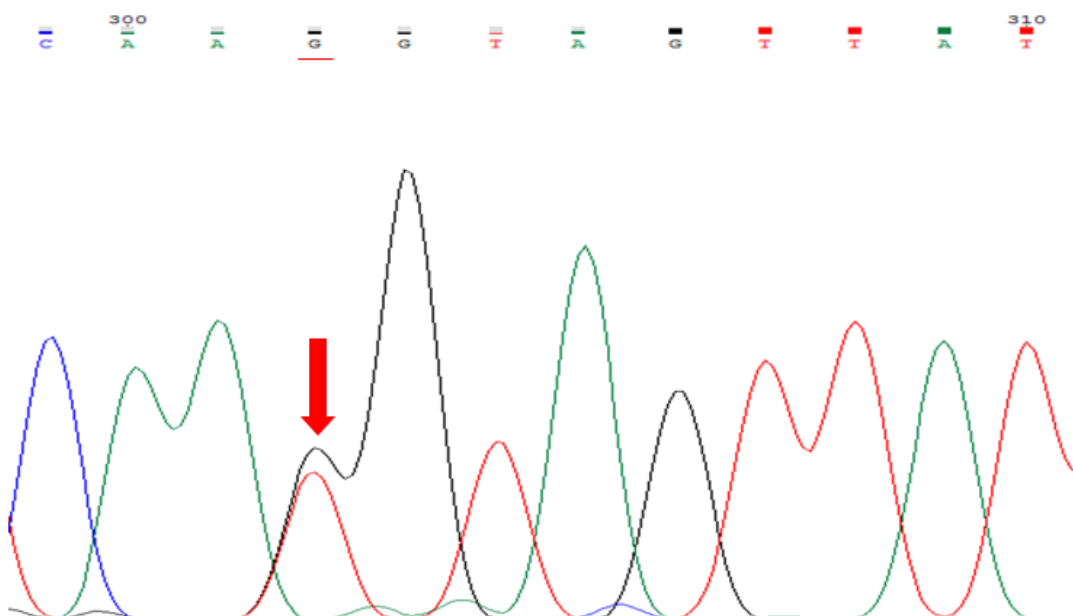


ภาพ 18. Electropherograms ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในบริเวณ promoter ที่ตำแหน่ง -219A>G: ก) Wild type (-219A/A) และ ข) Homozygous mutation (-219G/G)

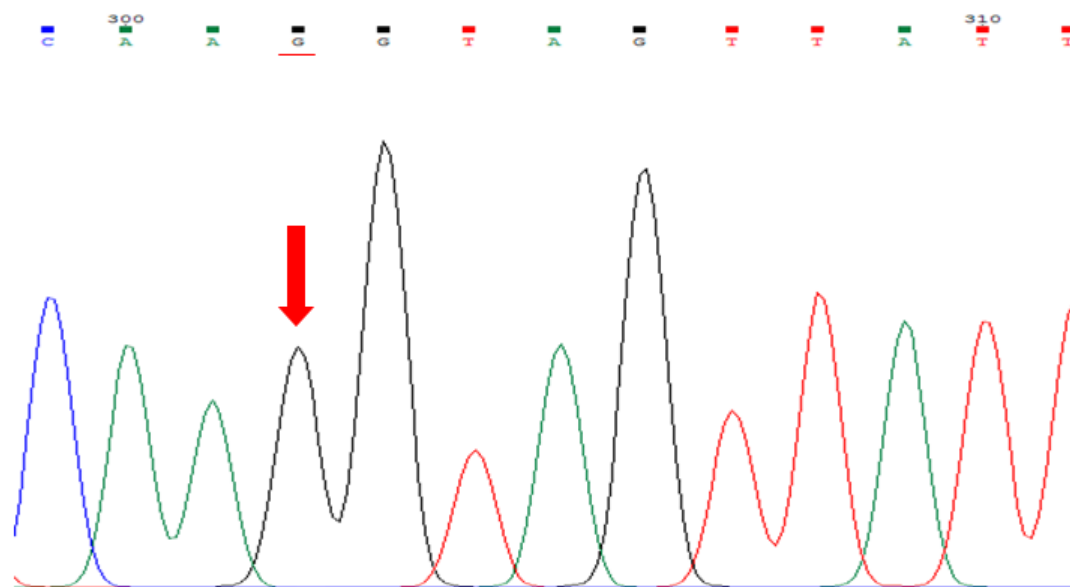
ñ) Wild type (361T/T)



ñ) Heterozygous mutation (361T/G)



ก) Homozygous mutation (361G/G)



ภาพ 19. Electropherograms ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในบริเวณ exon 4 ที่ตำแหน่ง 361T>G: ก) Wild type (361T/T) ข) Heterozygous mutation (361T/G) และ ค) Homozygous mutation (361G/G)

ตาราง 7

ผลการวิเคราะห์สมมูลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา (n=97)

Mutation of <i>UGT3A1</i> gene	Genotype frequency	Allele frequency	Observed values	Expected values	Chi-square	p value
-219A>G						
A/A	0.989	T = 0.99	90	89.01	$\chi^2 = 91$	0.00001*
A/G	-	G = 0.01	0	1.98		
G/G	0.011		1	0.01		
361T>G						
T/T	0.624	T = 0.79	62	59.21	$\chi^2 = 2.97$	0.0848
T/G	0.332	G = 0.21	26	31.58		
G/G	0.044		7	4.21		

- Observed values คือ ค่าสังเกตที่แท้จริงที่ได้จากประชากรกลุ่มตัวอย่าง

- Expected values คือ ค่าที่ได้จากการคำนวณสมการฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

* หมายถึง $p < 0.05$ คือ ไม่เป็นไปตามสมมูลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

ตาราง 8

ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* กับเพศของทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา

เพศ	-219A>G			361T>G		
	A/A	A/G	G/G	T/T	T/G	G/G
ชาย (%)	46 (50.55)	0	1 (1.10)	31 (31.63)	13 (13.68)	4 (4.08)
หญิง (%)	44 (48.35)	0	0	31 (31.63)	13 (13.68)	3 (3.16)
รวม (%)	90 (98.90)	0	1 (1.10)	62 (63.26)	26 (27.36)	7 (7.24)

3. ความสัมพันธ์ของเพศต่อการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ของทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา

จากการวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* กับเพศของทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา พบว่าในทารกเพศชาย พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง -219A>G และ 361T>G คิดเป็น 1.10% และ 17.76% ตามลำดับ และในทารกเพศหญิง พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง -219A>G และ 361T>G คิดเป็น 0% และ 16.84% ตามลำดับ (ตาราง 8)

บทที่ 4

อภิปรายผลการศึกษา

1. อภิปรายผลการศึกษา

การกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1*

จากผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในบริเวณ promoter exon 1 และ exon 4 ในทารกแรกเกิดที่เกิดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา เป็นจำนวน 97 ตัวอย่าง ในการเลือกส่วนที่ทำการทดลองจะเลือกส่วนของ promoter เนื่องจากเป็นส่วนที่มีองค์ประกอบที่สำคัญ (regulation module) ซึ่งหากเกิดความการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้อาจส่งผลให้เกิดการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติ ในส่วนของ exon 1 เป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญในการเป็น substrate binding site (Mackenzie et al., 2005) และในส่วนของ exon 4 จะพบว่ามีการศึกษาจากงานวิจัยก่อนหน้าว่า หากเกิดความผิดปกติตรงตำแหน่งดังกล่าว จะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถที่จะทำงานได้ (Meech et al., 2012) พบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ทั้งหมด 2 ตำแหน่งคือบริเวณ promoter 1 ตำแหน่ง (-219A>G) และบริเวณที่มีการถอดรหัส 1 ตำแหน่ง (361T>G) ใน exon 4 ซึ่งในตำแหน่งในบริเวณที่มีการถอดรหัสเป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่มีการรายงานของมิชและคณะ (Meech et al., 2012) ในปี 2012 โดยในตำแหน่งของโปรโมเตอร์ที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ แบบ homozygous ที่ตำแหน่ง -219A>G พบเพียง 1.10% จากประชากรตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งถือเป็นการกลายพันธุ์ตำแหน่งใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานถึงการตรวจพบในประชากรประเทศอื่น โดยเป็นตำแหน่งที่อยู่ระหว่าง RXRA กับ SP1 ซึ่งยังไม่มีการระบุตำแหน่งในบริเวณนั้น แต่อย่างไรก็ตามจากข้อมูลของ GeneCard® HUMAN GENE DATABASE พบว่ายังมีอีกหลายตำแหน่งในส่วนของ regulations ที่ยังไม่ได้ระบุในข้อมูลพื้นฐานซึ่งในตำแหน่งที่ -219 อาจเป็นตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งซึ่งเป็นส่วนของ regulations ได้ และในตำแหน่งของบริเวณที่มีการถอดรหัส (exon 4) ที่ตำแหน่ง 361T>G ซึ่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก cysteine เป็น glycine ที่โคดอนที่ 121 (C121G) พบจำนวนประชากรที่มีการกลายพันธุ์ทั้งแบบ heterozygous (27.36 %) และแบบ homozygous (7.24 %) รวมกันเป็น 34.60% ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของไมเนอร์และแมคเคนซี (Miners & Mackenzie, 1991) ว่าพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเดียวกันนี้ในประชากรเอเชียซึ่งเป็นกลุ่มคนจีนและญี่ปุ่นเพียง 20% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลุ่มประชากรตัวอย่างที่นำมาศึกษามีบรรพบุรุษที่ย้ายถิ่นฐานมาจากประเทศที่แตกต่างกัน โดยในประชากรกลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้เป็นกลุ่มคนไทยมุสลิมซึ่ง

มีถิ่นฐานและแหล่งอาศัยอยู่ในภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งคาดว่าถิ่นฐานเดิมของบรรพบุรุษจะอพยพมาจากคาบสมุทรมาลายูและอินโดนีเซีย แต่ประชากรเอเชียซึ่งเป็นกลุ่มคนจีนและญี่ปุ่นจะพบว่าในประเทศจีนมีประชากรมากจึงทำให้มีกลุ่มคนเชื้อสายที่ต่างกันมาก โดยประชาชนจีนมีทั้งสิ้น 56 ชนเผ่า ส่วนใหญ่นับถือศาสนาพุทธ มีนับถือศาสนาอิสลาม 11 ล้านคน และนับถือศาสนาคริสต์อีก 5.2 ล้านคน จึงอาจส่งผลให้มียีนของแต่ละบุคคลที่แตกต่างกันมาก (Lynch & Walsh, 1998) และในประเทศญี่ปุ่นจะพบว่าบรรพบุรุษของญี่ปุ่นบางส่วนอพยพมาจากมองโกเลียและเกาหลี (Shinoda, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B7* ของเบญญจลักษณ์ (2014) โดยมีการศึกษาในตัวแทนประชากรมุสลิมในภาคใต้โดยเมื่อเปรียบเทียบความถี่ของแอลลีลในประชากรมุสลิมในภาคใต้กับประชากรเอเชียในประเทศอื่นพบว่ามีความถี่แอลลีลที่ต่างกันอย่างชัดเจน เช่น ที่ตำแหน่ง 211G>T ของยีน *UGT2B7* พบความถี่แอลลีลในประชากรมุสลิมในประเทศไทยที่ 0.065 แต่พบความถี่แอลลีลในประชากรญี่ปุ่นเกาหลี และ Norwegian อยู่ที่ 0.185, 0.120 และ 0 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าถึงแม้จะเป็นประชากรในประเทศแถบเอเชียเหมือนกันแต่ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนบางชนิดไม่เหมือนกัน รวมทั้งถิ่นกำเนิดของบรรพบุรุษในแต่ละภูมิภาคไม่เหมือนกัน จึงทำให้ความถี่ที่พบการกลายพันธุ์นั้นต่างกัน ผลของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ที่เกิดขึ้นเมื่อนำมาพิจารณาถึงความสัมพันธ์กับเพศและศาสนา พบว่าเพศของประชากรกลุ่มตัวอย่างไม่มีผลต่อความถี่ของการเกิดผลของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* (361T>G) ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ซึ่งได้มีการบันทึกประวัติของผู้ป่วยโรคนี้ไว้ในอุ้งน้ำดีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-2548 โดยมีจำนวนทั้งสิ้น 539 ราย ส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง (69.02%) (ศักดิ์ชาย, รัตนชนก, และสุรศักดิ์, 2007) โดยในส่วนของ การนับถือศาสนา นั้น ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาในตัวอย่างที่ได้จากตัวแทนประชากรที่นับถือศาสนาอิสลามในภาคใต้เนื่องจากการนับถือศาสนาสามารถบ่งบอกถึงถิ่นฐานหรือที่มาของบรรพบุรุษได้ เช่น การนับถือศาสนาอิสลามสามารถบอกได้ว่าบรรพบุรุษอาศัยอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง ซึ่งคาดว่าถิ่นฐานเดิมของบรรพบุรุษจะอพยพมาจากคาบสมุทรมาลายูและอินโดนีเซีย

ผลของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในบริเวณที่ต่างกัน จะส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ต่างกัน ตัวอย่างเช่น การเกิดการกลายพันธุ์ที่บริเวณที่มีการถอดรหัส (361T>G) จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ ตำแหน่ง 121 เกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก TGT เป็น GGT ซึ่งจะเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก cysteine เป็น glycine จัดเป็นการกลายพันธุ์แบบ missense mutation จากการศึกษาที่ผ่านมาจะพบว่า การกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้เกิดขึ้นในมนุษย์และจะทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์ที่สร้างออกมานั้นไม่ทำงาน (inactive) (Meech et al., 2012) ซึ่งอาจจะทำให้เกิดความผิดปกติในการเมแทบอลิซึมของกรดน้ำดี

และทำให้เกิดการคั่งของน้ำดีตามมา สุดท้ายอาจทำให้เป็นนิ่วในถุงน้ำดีหรือทางเดินน้ำดีได้ง่ายกว่า คนที่มีมียีน *UGT3A1* ที่ปกติ เนื่องจาก substrate ที่สำคัญของ *UGT3A1* คือ UDCA จัดเป็นกรดน้ำดีชนิดตติยภูมิ (tertiary bile acid) ซึ่งต้องผ่านกระบวนการ conjugation โดยเอนไซม์ *UGT3A1* เพื่อให้ได้ metabolite ที่ละลายน้ำ และสามารถกำจัดออกทางน้ำดีได้ เมื่อเอนไซม์ *UGT3A1* ไม่สามารถทำงานได้ จะทำให้กรดน้ำดีคั่ง จึงอาจก่อให้เกิดโรคนิ่วในถุงน้ำดี อีกทั้งในปัจจุบัน UDCA จัดเป็นยาที่นำมาใช้บำบัดอาการโรคนิ่วในถุงน้ำดี ในรายงานของแมคเคนซีและคณะ (Mackenzie et al., 2008) พบว่า เมื่อให้ผู้ป่วยได้รับยา UDCA ในขนาด 10–15 mg/kg เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ จะพบความเข้มข้นของ UDCA ในเซรัม ปัสสาวะ และน้ำดี มากขึ้นในผู้ป่วย 3-4% จากผู้ป่วยที่ได้รับยาทั้งหมด ดังนั้นหากผู้ป่วยที่ได้รับยาดังกล่าว มีมียีน *UGT3A1* ที่กลายพันธุ์แบบ 361T<G อาจทำให้ผู้ป่วยได้รับผลอันไม่พึงประสงค์จากยาได้ โดยอาจทำให้ภาวะการคั่งของน้ำดีรุนแรงขึ้นได้ นอกจากนี้ อาจส่งผลให้เกิดความเสี่ยงของการเกิด atherosclerosis ของหลอดเลือดได้ เนื่องจาก 7βCH ซึ่งเป็น substrate ของ *UGT3A1* และเป็นส่วนประกอบหลักของ oxLDL โดยในเส้นเลือด 7βCH จะกระตุ้นการสร้าง ROS รวมทั้งในกระบวนการ lipid peroxidation จะส่งผลให้เกิดการรวมตัวของ plaque และพัฒนาเป็น atherosclerosis ของหลอดเลือดได้ (Brown & Jessup, 1999) ส่วนในบริเวณ โพรโมเตอร์ที่พบการกลายพันธุ์ -219A>G พบว่ายังไม่มีการศึกษาว่ามีผลต่อการถอดรหัสของยีนหรือไม่และความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อเอนไซม์ก็ยังไม่ได้ศึกษาเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม หากมีการตรวจยีน *UGT3A1* ก่อนการรักษาด้วยยาที่เป็น substrate ของเอนไซม์ *UGT3A1* จะทำให้สามารถป้องกันผลอันไม่พึงประสงค์จากยาที่เป็น substrate ได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำนายโอกาสเสี่ยงที่จะเกิด artherosclerosis

การวิเคราะห์สมดุสาร์ดีไวน์เบิร์ก

เมื่อนำผลการวิเคราะห์สมดุสาร์ดีไวน์เบิร์กของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในทารกแรกเกิดที่เกิดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา เป็นจำนวน 97 ตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ทั้งหมด 2 ตำแหน่งคือ -219A>G และ 361T>G พบว่าการกลายพันธุ์ในตำแหน่งซึ่งอยู่ในบริเวณ exon 4 (361T>G) เป็นไปตามกฎของสาร์ดีไวน์เบิร์กโดยสอดคล้องกับแบบสอบถาม ซึ่งพบว่าบิดาและมารดาของทารกมีถิ่นฐานและอาศัยอยู่ในภาคใต้ของประเทศไทย และเนื่องจากกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นกลุ่มตัวอย่างที่เป็นไทยมุสลิม ซึ่งมีการแต่งงานในกลุ่มคนไทยมุสลิมด้วยกัน จึงส่งผลให้รูปแบบของยีนไม่ต่างกัน และในตำแหน่งบริเวณ promoter (-219A>G) ไม่เป็นไปตามกฎของสาร์ดีไวน์เบิร์ก เนื่องมาจากอาจเกิดจากความผิดปกติของยีนของ

ทารกหรือจากบิดาและมารดา เนื่องจากในตำแหน่งบริเวณ promoter พบการกลายพันธุ์เพียง 1 ตัวอย่าง

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษากการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในบริเวณ promoter exon 1 และ exon 4 ในทารกแรกเกิดที่คลอดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา เป็นจำนวน 97 ตัวอย่าง สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

1 ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ทั้งหมด 2 ตำแหน่งคือ

1.1 Novel SNPs บริเวณ promoter (promoter region) 1 ตำแหน่ง (-219A>G)

1.2 Known SNPs บริเวณที่มีการถอดรหัส (coding region) 1 ตำแหน่ง (361T>G)

2 สำหรับความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) ในตำแหน่งของการกลายพันธุ์ 361T>G มีความถี่ของ homozygous mutation อยู่ที่ 0.044 และมีความถี่ของ heterozygous mutation อยู่ที่ 0.332 สำหรับในตำแหน่งการกลายพันธุ์ -219A>G มีความถี่ของ homozygous mutation อยู่ที่ 0.011 และสำหรับความถี่แอลลีล (allele frequency) ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยเรียงลำดับจากความถี่สูงไปต่ำดังนี้ 361T>G (0.21) และ -219A>G (0.01)

3 การวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ในประชากรกลุ่มตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* ทั้งหมด 2 ตำแหน่งคือ -219A>G และ 361T>G โดยในตำแหน่ง -219A>G พบว่าไม่เป็นไปตามกฎของสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก แต่ในตำแหน่ง 361T>G เป็นไปตามกฎของสมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

4 เพศของประชากรกลุ่มตัวอย่างไม่มีผลต่อความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1*

5 การกลายพันธุ์ของยีน *UGT3A1* อาจจะทำให้เกิดการคั่งของน้ำดี เนื่องจาก substrate ที่สำคัญของเอนไซม์ *UGT3A1* คือ UDCA จัดเป็นกรดน้ำดีชนิดตติยภูมิ (tertiary bile acid) ทำให้น้ำดีไม่สามารถขับออกจากร่างกายได้อย่างปกติ จึงอาจก่อให้เกิดโรคน้ำดีในถุงน้ำดี อีกทั้งอาจส่งผลให้เกิดความเสี่ยงของการเกิด atherosclerosis เนื่องจาก 7β CH ซึ่งเป็นอีก substrate หนึ่งของเอนไซม์ *UGT3A1* เป็นส่วนประกอบหลักของ oxLDL ซึ่งออกซิเลตอโรลจะพบใน atherosclerotic plaque ของมนุษย์ อีกทั้งยังเป็นส่วนสำคัญในการเจริญของ plaque ซึ่งหากยีนเกิดความผิดปกติทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้ร่างกายไม่สามารถขับ 7β CH ออกได้ จะ

ก่อให้เกิดผลเสีย โดย 7βCH ที่ไม่สามารถจับออกนอกร่างกายได้นั้นจะรวมตัวกันทำให้เกิด plaque ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคหลอดเลือดตีบได้

Further study

ในงานวิจัยต่อไปควรมีการศึกษาในประชากรตัวอย่างเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากในงานวิจัยมีการเก็บตัวอย่างของจำนวนประชากรมุสลิมมาเพียง 151 ตัวอย่างและได้การศึกษาเพียง 97 ตัวอย่างจึงอาจยังไม่เพียงพอในการยืนยันถึงความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ อีกทั้งยังจะต้องศึกษาในประชากรศาสนาและภูมิภาคอื่นเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่ของการกลายพันธุ์ และจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง exon อื่น (เนื่องจากในงานวิจัยนี้มีการทดสอบเพียง 3 ตำแหน่งเท่านั้น คือในบริเวณ promoter exon 1 และ exon 4) เพื่อตรวจสอบว่าการกลายพันธุ์อีกหรือไม่

เอกสารอ้างอิง

- การุณ เอียดยาว. (2557). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *SOX10* ในผู้ป่วยโรคลำไส้ใหญ่โป่งพอง โดยกำเนิดไทยและปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อสปีปตำแหน่ง rs2435357 บนยีน *RET-protooncogene*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- เบญจลักษณ์ อรรถนโรจน์. (2014). ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B7* ในประชากรไทยมุสลิมภาคใต้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- ปนัดดา ไยภักดี, และคนาวรรณ พจนาคม. (2004). ความสำคัญของการศึกษาการเมแทบอลิซึมยา โดยใช้จุลินทรีย์. *Thai Journal of Pharmacy*, 1(5), 15-26.
- ยศวริศ เสมามิ่ง. (2017). *เภสัชวิทยาเบื้องต้น*. อุดรธานี: คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- วสันต์ จันทราพิศย์, ปราณีย์ ลิ้นนะชัย, และวาสนา ศิริรังษี. (1996). วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. เชียงใหม่: พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์.
- วิบูลย์ กาญจนพัฒนกุล, นิยะดา วิทยาศัย, และดลจรัส ทิพย์มโนสิงห์. (2007). การศึกษาประสิทธิภาพของ ursodeoxycholic acid ในทารกแรกเกิดน้ำหนักน้อยที่ได้รับสารอาหารทางหลอดเลือดดำและมีภาวะน้ำดีคั่ง. *Thai Pediatric Journal*, 14(1), 7-12.
- วีระพงศ์ ลูรัตนนท์, และนิภาภรณ์ แส่นคุณท้าว. (2008). *พื้นฐานเทคนิค polymerase chain reaction*. ค้นเมื่อ 5 ธันวาคม 2559, จาก http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/Basic_PCR_June_08.pdf
- ศักดิ์ชาย เรืองสิน, ชันต์ชนก วนสุวรรณกุล, และสุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา. (2007). ผลการผ่าตัดของผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดถุงน้ำดีโดยวิธีการส่องกล้อง ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์. *Songklanagarind Medical Journal*, 25(4), 315-321.
- สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรถาวร, และณัฐฐิยา หิรัญกาญจน์. (บรรณาธิการ). (2003). *เวชศาสตร์โมเลกุล*. กรุงเทพฯ: Text and Journal Publication.
- Abm. (2016). *Polymerase chain reaction (PCR) - an introduction*. Retrieved December 5, 2016, from https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php
- Brown, A. J., & Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 142(1), 1-28.

- Coleman, M. D. (2010). *Human drug metabolism: An introduction* (2nd ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Evans, W. E., & Relling, M. V. (1999). Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, *286*(5439), 487-491.
- Gonzalez, F. J., Coughtrie, M., & Tukey, R. H. (2014). *Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics* (12th ed.). New York: The McGraw-Hill.
- Lacy, C. F., Armstrong, L. L., Goldman, M. P., & Lance, L. L. (2008). *Drug information handbook* (17th ed.). Hudson, OH: Lexi-Comp.
- Larson, J. C., Allstadt, S. D., Fan, T. M., Khanna, C., Lunghofer, P. J., Hansen, R. J., Jimenez, T. M. (2016). Pharmacokinetics of orally administered low-dose rapamycin in healthy dogs: A pilot study. *American Journal of Veterinary Research*, *77*(1), 65–71.
- Li, T., & Chiang, Y. L. (2014). Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacological Reviews*, *66*(4), 948–983.
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, *79*, 181–211.
- Lynch, M., & Walsh, B. (1998). *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Mackenzie, P. I., Rogers, A., Elliot, D. J., Chau, N., Hulin, J. A., Miners, J. O., & Meech, R. (2011). The novel UDP glycosyltransferase 3A2: Cloning, catalytic properties, and tissue distribution. *Molecular Pharmacology*, *79*(3), 472–478.
- Mackenzie, P. I., Rogers, A., Treloar, J., Jorgensen, B. R., Miners, J. O., & Meech, R. (2008). Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(52), 36205–36210.
- Manevski, N. (2013). *Activity and enzyme kinetics of human UDP-glucuronosyltransferases: Studies of psilocin glucuronidation and the effects of albumin on the enzyme kinetic mechanism*. (Unpublished master's thesis). University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Mazarska, Z., Mróz, A., Pawlowska, M., & Augustin, E. (2016). The role of glucuronidation in drug resistance. *Pharmacology & Therapeutics*, *159*, 35-55.

- Mazzacuva, F., Mills, P., Mills, K., Camuzeaux, S., Gissen, P., Nicoli, E. R.,...Clayton, P. T. (2016). Identification of novel bile acids as biomarkers for the early diagnosis of Niemann-Pick C disease. *FEBS Lett*, 590(11), 1651-1662.
- Meech, R., Lewis, B. C., Miners, J. O., & Mackenzie, P. I. (2012). The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: Versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(2), 200-218.
- Miners, J. O., & Mackenzie, P. I. (1991). Drug glucuronidation in humans. *Pharmacology & Therapeutics*, 51(3), 347-369.
- Ouzzine, M., Gulberti, S., & Ramalanjaona, N., Magdalou, J., & Gigueux, S. F. (2014). The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: Their role in drug metabolism and detoxication. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 28(8), 349.
- Rafieian, K. M., Setorki, M., Douidi, M., Baradaran, A., & Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(8), 927-946.
- Rowland, A., Miners, J. O., & Mackenzie, P. I. (2013). The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(6), 1121-1132.
- Shinoda, T. (2007). Koizumi diplomacy: Japan's Kantei approach to foreign and defense affairs. Seattle, WA: University of Washington Press.
- Sombattheera, S., Prongvitaya, T., & Prongvitaya, S. (2014). Bile acids assay in medical study. *Journal of the Medical Technologist Association of Thailand*, 42(3), 5037-5047.
- Taxak, N., & Bharatam, V. P. (2014). Drug metabolism. *A fascinating link between chemistry and biology*, 19(3), 259-282.
- Vitek, L. (2012). The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 1-7.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตำเนหนังสือรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน
จากเวชระเบียนและสิ่งส่งตรวจจากร่างกายมนุษย์



SUB.EC 52-231-19-2-3

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ต่าบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่
จังหวัดสงขลา 90110

หนังสือรับรองนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

โครงการวิจัยเรื่อง : การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน UGT1A locus ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

หัวหน้าโครงการ : ดร.วันดี อุดมอักษร

ภาควิชา/คณะ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้ผ่านกระบวนการพิจารณารับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคนจากเวชระเบียน
และสิ่งส่งตรวจจากร่างกายมนุษย์ ของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แล้ว

ให้ไว้ ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2552

.....ประธานอนุกรรมการ
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์วิระพล จันทร์ดียิง)
รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ภาคผนวก ข

วิธีสุ่มตัวอย่างโดยไม่ซ้ำกันจากโปรแกรม Microsoft Excel

หมายเลขของตัวอย่างที่เป็นอิสลามทั้งบิดาและมารดา มีทั้งหมด 151 คน ต้องการเลือกมา 100 ตัวอย่าง

วิธีการทำ โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel

1. ในเซลล์ A1 ใส่ชื่อคอลัมน์เป็น number จากนั้นใส่ number ของตัวอย่างตั้งแต่ A2:A152 และต้องการเลือกสุ่มตัวอย่างมา 100 ตัวอย่างโดยไม่ให้ซ้ำ ให้ผลลัพธ์อยู่ในเซลล์ D2:D101

2. จากนั้นที่เซลล์ B2 พิมพ์ =Rand () แล้ว copy ลงไปถึง B152

3. จากนั้นที่เซลล์ C2 พิมพ์ =Rank (B2:\$B\$2:\$B\$152) แล้ว copy ลงไปถึง C152

4. จากนั้นที่เซลล์ D2 พิมพ์ =Index (\$A\$2: \$A\$152,Match(Rows(\$D\$2:D2),\$C\$2:\$C\$152,0)) กด enter แล้ว copy ลงไปด้านล่างถึง D101

5. กดปุ่ม F9 แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลง (ในการกด F9 แต่ละครั้งตัวอย่างจะมีการสุ่มไม่ซ้ำกัน)

ภาคผนวก ค
การคำนวณและวิธีการเตรียมสาร

1. การเตรียม 1.5% Agarose gel

- ใช้ผง agarose gel 1.5 กรัม
- เติม 1X ของ TAE buffer 100 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อนโดยนำเข้าในไมโครเวฟประมาณ 4-5 นาที ให้ผงเจลละลายจนหมด

2. เตรียมสารละลาย 50X Tris acetate (TAE) buffer

- ใช้ tris base 242 กรัม
- เติม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร
- เติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร

สำหรับ working solution การทำเจือจางสารละลาย 1X (เตรียม stock solution 50X 20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 980 มิลลิลิตร) (เบญญจลักษณ์, 2014)

3. เตรียมสารละลาย 1X Tris acetate (TAE) buffer

- เติม 50X Tris acetate (TAE) buffer 20 มิลลิลิตร
- เติมน้ำกลั่น (ddH₂O) 980 มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวพิชญา หอยสังข์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5810220052	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2556

ทุนการศึกษาที่ได้รับในระหว่างการศึกษา

โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย)

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Hoisang, P. & Udomuksorn, W. (2018). Study of *UGT3A1* T361G Nucleotide Polymorphism in Thai Muslims living in Songkhla Province, Thailand. The 40th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand. April 26-28, 2018.