



การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ในตัวแทนประชากรไทยมุสลิมที่
จังหวัดสงขลา

**The Study of *UGT2B17* Polymorphism in Representative Thai Muslim
Population at Songkhla Province**

สิริกัญญา อนันตเสนา

Sirikanya Anantasena

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ในตัวแทนประชากรไทยมุสลิมที่
จังหวัดสงขลา

**The Study of *UGT2B17* Polymorphism in Representative Thai Muslim
Population at Songkhla Province**

สิริกัญญา อนันตเสนา

Sirikanya Anantasena

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

Prince of Songkla University

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ในตัวแทน
 ประชากรไทยมุสลิมที่จังหวัดสงขลา
 ผู้เขียน นางสาวสิริกัญญา อนันตเสนา
 สาขาวิชา เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันดี อุดมอักษร)

.....ประธานกรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร. วีรวรรณ อุซายภิชาติ)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันดี อุดมอักษร)

.....กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วณิตา สุขเกษศิริ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
 หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา

.....
 (ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันดี อุดมอักษร)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวสิริกัญญา อนันตเสนา)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวสิริกัญญา อนันตเสนา)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน <i>UGT2B17</i> ในตัวแทนประชากรไทยมุสลิมที่จังหวัดสงขลา
ผู้เขียน	นางสาวสิริกัญญา อนันตเสนา
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

UDP glucuronosyltransferase 2B17 (*UGT2B17*) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปของยาในเฟส II โดยการเกิดปฏิกิริยาการกลูคูโรนิเดชันของสารที่เป็นสับสเตรท ทั้งสารที่ถูกสร้างขึ้นภายในร่างกาย เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน (เทสโทสเตอโรน และสารเมแทบอลิท์) รวมทั้งยาที่มีความเกี่ยวข้องกับการรักษาโรคมะเร็ง เช่น exemestane และ vorinostat เป็นต้น ยีน *UGT2B17* มีหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ *UGT2B17* ซึ่งการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* จะส่งผลให้เอนไซม์ *UGT2B17* ทำงานลดน้อยลงหรือไม่มีการทำงานของเอนไซม์ *UGT2B17* โดยการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ deletion สามารถพบได้มากในประชากรชาวเอเชียถึง 67% แต่ยังไม่พบว่ามีการศึกษาในประชากรชาวไทย ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความถี่ของการกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์และเอกซอน 1 ของยีน *UGT2B17* ในตัวแทนประชากรชาวไทยมุสลิมในจังหวัดสงขลา โดยการนำจีโนมิกดีเอ็นเอจำนวน 99 ตัวอย่าง ที่ถูกสกัดมาจากตัวอย่างเลือดจากสายสะดือของเด็กทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา มาทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนบริเวณโปรโมเตอร์และเอกซอน 1 ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เพื่อตรวจหาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน จากผลการศึกษาพบความชุกของจีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* แบบ homozygous deletion (del/del) จำนวน 53 (53.54%) ตัวอย่าง แบบ heterozygous deletion (del/ins) จำนวน 41 (41.41%) ตัวอย่าง และแบบ wild-type homozygous (ins/ins) จำนวน 5 (5.05%) ตัวอย่าง โดยการศึกษาการกลายพันธุ์ของ wild-type *UGT2B17* จะพบว่ายีนทั้ง 5 ตัวอย่างมีการกลายพันธุ์แบบ homozygous mutation บริเวณโปรโมเตอร์ 2 ตำแหน่ง ซึ่งเป็น known SNPs ได้แก่ -198G>A และ -15C>T นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *UGT2B17* แบบ del/del มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันกับยีน *UGT2B15* ซึ่งหมายถึงการขาดการแสดงออกของยีน *UGT2B17* และเมื่อนำมาตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* พบการกลายพันธุ์ของยีน 2 ตำแหน่ง คือ known SNPs บริเวณเอกซอน 1 (253T>G, Y⁸⁵D) และ novel SNPs บริเวณเอกซอน 1 (643A>T, M²¹⁵L) การกลายพันธุ์ของยีนตรงตำแหน่ง 253T>G มีความถี่จีโนไทป์ของ

homozygous mutation (G/G) และ heterozygous mutation (T/G) เท่ากับ 0.1698 และ 0.5849 ตามลำดับ (40/53 คน, 75.47%) ในขณะที่การกลายพันธุ์ตำแหน่ง 643A>T มีความถี่จีโนไทป์ของ heterozygous mutation (A/T) เท่ากับ 0.0377 (2/53 คน, 3.77%) ความถี่แอลลีลของการกลายพันธุ์เรียงจากสูงไปต่ำ คือ 0.4623 (253T>G) และ 0.0189 (643A>T) จากการวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของยีน *UGT2B15* พบว่าการกลายพันธุ์ตรงตำแหน่ง 253T>G เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($p>0.05$) แต่การกลายพันธุ์ตรงตำแหน่ง 643A>T ไม่เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($p<0.05$) สรุปได้ว่าประชากรชาวไทยมุสลิมพบการแสดงออกของจีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* แบบ homozygous deletion (del/del) มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อชาติอื่นๆ ในเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี และจีน ซึ่งการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ del/del จะส่งผลให้ขาดการทำงานของเอนไซม์ *UGT2B17* ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการกลูคูโรนิเดชันของสเตียรอยด์ฮอร์โมน (เทสโทสเตอโรน และสารเมแทบอลิท์) ส่งผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก หรืออาจเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งบริเวณ upper aerodigestive tract ในคนที่สูบบุหรี่ หรือดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เนื่องจากสารก่อมะเร็ง และเอทานอลจัดเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ *UGT2B17* อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการเกิดโรคร่วมด้วย เช่น เพศ อายุ หรือสภาพแวดล้อม เป็นต้น

Thesis Title	The Study of <i>UGT2B17</i> Polymorphism in Representative Thai Muslim Population at Songkhla Province
Author	Miss Sirikanya Anantasena
Major Program	Pharmacology
Academic Year	2019

ABSTRACT

The human UDP glucuronosyltransferase 2B17 (*UGT2B17*) enzyme play an important role in phase II drug metabolism, that catalyze the glucuronidation of various substrates, including endogenous as well as xenobiotic, such as steroid hormones (testosterone and its metabolites), exemestane and vorinostat. *UGT2B17* is encoded by the *UGT2B17* gene. The mutation of the *UGT2B17* gene may affect to loss of enzyme activity or no enzyme activity. Although the polymorphic gene deletion of *UGT2B17* gene has a high prevalence in Asian (67%), there is no report in Thai population. The aim of this study was to determine the genetic polymorphism of *UGT2B17* in promoter and exon 1 regions in representative Thai-Muslim population in Songkhla province. Ninety-nine genomic DNAs were extracted from Thai-Muslim neonates cord blood samples, which were collected at Songkhla hospital and then were amplified the promoter and exon 1 regions of *UGT2B17* gene by PCR. The mutations of *UGT2B17* gene were detected by direct sequencing. The result showed that 53 samples (53.54%) were homozygous deletion (del/del), 41 samples (41.41%) were heterozygous deletion (del/ins), and 5 samples (5.05%) were wild-type homozygous insertion (ins/ins) of *UGT2B17* gene. Two known SNPs were found in promoter region (-198G>A and -15C>T) of wild type *UGT2B17* gene. The nucleotide sequence of *UGT2B17* deletion polymorphism was similar to *UGT2B15* gene, which indicated that this sample lack of *UGT2B17* gene. One known SNPs (253T>G, Y⁸⁵D) and 1 novel SNPs (643T>G, M²¹⁵L) were found in exon 1 region of *UGT2B15* gene. The genotype frequency of homozygous mutation (G/G) and heterozygous mutation (T/G) for 253T>G region were 0.1698 and 0.5849, respectively (40/53 คน, 75.47%). The genotype frequency of heterozygous mutation (A/T) for 643A>T region was 0.0377 (2/53 คน, 3.77%). Allele

frequency of the two mutations arranged in descending order are 0.4623 (253T>G) and 0.0189 (643T>G). One SNPs (253T>G) was in Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$). On the other hand, 643T>G was not followed to the Hardy-Weinberg equilibrium ($p<0.05$). Conclusion, Homozygous deletion (del/del) of the *UGT2B17* is the highest prevalence in representative Thai-Muslim population which is similar to other Asians (Japanese, Korean and Chinese). The polymorphic gene deletion of the *UGT2B17* leads to a lack of enzyme activity, which alters glucuronidation of steroid hormones (testosterone and its metabolites) and associated to increase the risk of prostate cancer. Moreover, *UGT2B17* deletion polymorphism has been found associated to increase the risk of upper aero digestive tract (UADT) cancer. However, it should be considered other factors which may related with disease development such as gender, age or environment etc.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและชี้แนะจากบุคลากรทางการศึกษา และหน่วยงานต่าง ๆ ทางผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันดี อุดมอักษร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ให้เป็นไปอย่างถูกต้อง และมีความสมบูรณ์ที่สุด ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีรวรรณ อุชายภิชชาติ ประธานกรรมการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิตา สุขเกษศิริ กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ สำหรับการชี้แนะแนวทางในการปรับปรุง และแก้ไขเนื้อหาของวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์และบุคลากรประจำภาควิชาเภสัชวิทยาทุกท่านที่ถ่ายทอดองค์ความรู้ทางด้านเภสัชวิทยา ประสพการณ์ด้านการทำงานวิจัย รวมทั้งความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนในการทำงานวิจัยครั้งนี้ รวมถึงทุนในการนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 45 ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชวิทยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา รวมทั้งน้องชาย ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้ความสนับสนุนในทุก ๆ ด้านตลอดมา

สิริกัญญา อนันตเสนา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(5)
ABSTRACT.....	(7)
กิตติกรรมประกาศ.....	(9)
สารบัญ.....	(10)
รายการตาราง.....	(11)
รายการภาพประกอบ.....	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ.....	(14)
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และวิธีการศึกษา.....	54
บทที่ 3 ผลการศึกษา.....	65
บทที่ 4 อภิปรายผลการศึกษา.....	82
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา.....	89
เอกสารอ้างอิง.....	91
ภาคผนวก	
ก สำเนาหนังสือรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย ในคนจากเวชระเบียนและสิ่งส่งตรวจจากร่างกายมนุษย์.....	100
ข การสุ่มเลือกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาโดยการใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel.....	101
ค การคำนวณและวิธีการเตรียมสาร.....	102
ประวัติผู้เขียน.....	103

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1-1 ปฏิบัติการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของยา เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา isoform หลักที่อยู่ในตับ ตำแหน่งของเอนไซม์ (cellular localization) และ cofactor ที่ต้องการ.....	7
1-2 สับสเตรทของเอนไซม์ UGT2B17 และ UGT2B15.....	24
1-3 UGT2B17 allele nomenclature.....	42
1-4 UGT2B17 SNPs table.....	43
1-5 UGT2B15 allele nomenclature.....	45
1-6 UGT2B15 SNPs table.....	46
2-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ UGT2B17 ซึ่งใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ (บางส่วน) และเอกซอน 1.....	60
2-2 องค์ประกอบของ PCR reaction mixture ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน UGT2B17.....	61
2-3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ UGT2B15 ซึ่งใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ (บางส่วน) และเอกซอน 1.....	62
2-4 องค์ประกอบของ PCR reaction mixture ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน UGT2B15.....	63
3-1 การแสดงออกของจีโนไทป์ของยีน UGT2B17 ในประชากรชาวไทยมุสลิม.....	68
3-2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน UGT2B17 ในประชากรชาวไทยมุสลิมกับประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ.....	70
3-3 ผลการวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์ ความถี่แอลลีล และสมดุสของฮาร์ดีไวน์เบิร์กของการกลายพันธุ์ของยีน UGT2B17 ในทารกแรกเกิดชาวไทยมุสลิม ณ โรงพยาบาลสงขลา (n=53).....	79
3-4 การเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ และจำนวนคนที่พบการกลายพันธุ์ของยีน UGT2B15 ในเพศชาย และเพศหญิง (n=53).....	80
3-5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน UGT2B15 (Y ⁸⁵ D) ในประชากรชาวไทยมุสลิมกับประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ.....	81

รายการภาพประกอบ

รูป	หน้า
1-1 สัดส่วนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยาในเฟส I และ II.....	6
1-2 แผนผังการเกิดปฏิกิริยากลุ่มโครนิเดชั่น.....	10
1-3 UGT isoforms ที่มีหน้าที่ในมนุษย์ หนู rat และหนู mice.....	11
1-4 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของ UGTs แต่ละ isoforms ที่มีหน้าที่ในมนุษย์...	12
1-5 ชนิดที่แตกต่างกัน และการแพร่กระจายในเนื้อเยื่อของ UGT isoforms.....	13
1-6 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>UGT2B17</i> และ <i>UGT2B15</i>	19
1-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>UGT2B17</i> และ <i>UGT2B15</i> ตำแหน่งที่มีการ แปลรหัสของเอกซอน 1 ถึง 6.....	20
1-8 กรดอะมิโนที่ถูกถอดรหัสมาจาก <i>UGT2B17</i> และ <i>UGT2B15</i>	23
1-9 กระบวนการแปรรูปของยา vorinostat.....	27
1-10 วิธีหลักในการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมใน phase I และ phase II ของยา exemestane.....	28
1-11 วิธีหลักในการทำงานและเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของ testosterone.....	30
1-12 วิธีหลักในการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของแอนโดรเจนโดยอาศัยเอนไซม์ UGTs	31
1-13 การแสดงออกและบทบาทของเอนไซม์ <i>UGT2B17</i> และ <i>UGT2B15</i> ในต่อมลูกหมาก	32
1-14 การแทนที่นิวคลีโอไทด์แบบทรานสิชัน และทรานสเวอร์ชัน.....	34
1-15 Neutral mutation.....	36
1-16 Missense mutation.....	36
1-17 Silent mutation.....	37
1-18 Nonsense mutation.....	37
1-19 Frameshift mutation.....	38
1-20 ลักษณะการรันเจลในแนวตั้ง.....	49
1-21 การรันเจลในแนวนอน.....	49
2-1 PCR cycle ที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>UGT2B17</i>	61
2-2 PCR cycle ที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>UGT2B15</i>	63
3-1 ภาพถ่าย 1.5% agarose gel electrophoresis ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บริเวณเอกซอน 1 ของยีน <i>UGT2B17</i> ขนาด 1,000 bps.....	66
3-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>UGT2B17</i> บริเวณโปรโมเตอร์.....	67

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูป	หน้า
3-3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>UGT2B17</i> บริเวณเอกซอน 1.....	68
3-4 Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>UGT2B17</i> ตำแหน่ง -198G>A.....	71
3-5 Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>UGT2B17</i> ตำแหน่ง -15C>T.....	71
3-6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>UGT2B15</i> บริเวณโปรโมเตอร์.....	73
3-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>UGT2B15</i> บริเวณเอกซอน 1.....	74
3-8 Electropherograms บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>UGT2B15</i> และ <i>UGT2B17</i>	75
3-9 Electropherograms บริเวณการกลายพันธุ์ของยีน <i>UGT2B15</i> บริเวณ เอกซอน 1 ที่ตำแหน่ง 253T>G.....	77
3-10 Electropherograms บริเวณการกลายพันธุ์ของยีน <i>UGT2B15</i> บริเวณ เอกซอน 1 ที่ตำแหน่ง 643A>T.....	78

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

%	=	percentage
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µM	=	micromolar
°C	=	degree Celsius
ADH	=	alcohol dehydrogenase
AKR	=	aldo-keto reductase
ALDH	=	aldehyde dehydrogenase
AO	=	aldehyde oxidase
bps	=	base pair
C/EBP	=	CAAT/enhancer binding protein
Co.,Ltd	=	Company Limited
CYPs	=	cytochrome P450
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphates
DME	=	drug metabolizing enzymes
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytidine triphosphate
DHT	=	dihydrotestosterone
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
EXE	=	exemestane
et al.	=	<i>et alii</i> (and others)
FMOs	=	flavin-containing monooxygenases
GSTs	=	glutathione S-transferases
Inc	=	Incorporate
Kbp	=	kilo base pair
KCl	=	potassium chloride
LD	=	linkage disequilibrium

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

MAO	=	monoamine oxidase
Mg ²⁺	=	magnesium ion
MgCl	=	magnesium chloride
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
MW	=	molecular weight
NAT	=	<i>N</i> -acetyltransferase
NAD ⁺	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Oct-1	=	octamer transcription factor 1
OR	=	odds ratio
<i>p</i>	=	<i>p</i> -value
Pbx	=	pre-B-cell homeobox
PCR	=	polymerase chain reaction
pH	=	potential of hydrogen ion
PHS	=	prostaglandin H synthase
rpm	=	revolution per minute
SNP	=	single nucleotide polymorphism
SULT	=	sulfotransferase
<i>Taq</i> polymerase	=	<i>Thermus aquaticus</i> polymerase
U	=	unit
UDP	=	uridine 5'-diphosphate
UDPGA	=	uridine diphospho glucuronic acid
UGTs	=	UDP-glucuronosyltransferase
95% CI	=	95% confidence interval
XO	=	xanthine oxidase

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

Nucleotide

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

Amino acid codes

Amino acid	3-letter	1-letter	codons
Alanine	Ala	A	GCC,GCA,GCG,GCT
Arginine	Arg	R	CGT, CGG, CGC, CGA, AGA, AGG
Asparagine	Asn	N	AAC,AAT
Aspartic acid	Asp	D	GAC, GAT
Cysteine	Cys	C	TGC, TGT
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Glutamic acid	Glu	E	GAA, GAG
Glycine	Gly	G	GGA, GGC, GGG, GGT
Histidine	His	H	CAC, CAT
Isoleucine	Ile	I	ATA, ATC, ATT
Leucine	Leu	L	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Methionine	Met	M	ATG
Phenylalanine	Phe	F	TTC, TTT
Proline	Pro	P	CCA, CCC, CCG, CCT
Serine	Ser	S	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
Threonine	Thr	T	ACA, ACC, ACG, ACT
Tryptophan	Trp	W	TGG
Tyrosine	Tyr	Y	TAC, TAT
Valine	Val	V	GTA, GTC, GTG, GTT
Stop	-	-	TAA, TAG, TGA

บทที่ 1

บทนำ

บทนำตั้งเรื่อง

UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมเฟส II โดย UGT จะมีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยากกลูคูโรนิเดชัน โดยกระตุ้นให้เกิดการจับกันระหว่างกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) จาก UDP-glucuronic acid (UDPGA) กับหมู่ที่มีขั้ว (ฟีนอล แอลกอฮอล์ อะลิฟาติก อะโรมาติกเอมีน ไทออล และกรดคาร์บอกซิลิก) ของสารที่เป็นสับสเตรท ทั้งสารที่ได้รับจากภายนอกร่างกาย (xenobiotic substrates) เช่น ยา สารก่อมะเร็ง และมลภาวะ และสารที่ถูกสร้างขึ้นภายในร่างกาย (endogenous molecules) เช่น บิลิรูบิน กรดน้ำดี และฮอร์โมน เป็นต้น สารที่ได้จากปฏิกิริยากกลูคูโรนิเดชันจะอยู่ในรูปของกลูคูโรไนด์ (glucuronide) มีคุณสมบัติที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ลดลง ลดความเป็นพิษ มีขั้วมาก และสามารถละลายน้ำได้มากขึ้น เพื่อให้ง่ายต่อการขับออกนอกร่างกายต่อไป (Penner, Woodward, and Prakash 2012, Yang et al. 2017)

ในมนุษย์ ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ UDP-glucuronosyltransferase สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ *UGT1*, *UGT2*, *UGT3* และ *UGT8* (Yang et al. 2017) สำหรับยีน *UGT2B17* ที่ควบคุมการแสดงออกและบทบาทการทำงานของเอนไซม์ *UGT2B17* จะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ตำแหน่ง q13.2 ประกอบด้วย 6 เอกซอน ขนาดประมาณ 30 kbp (Beaulieu et al. 1997) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT2B17* มีความคล้ายคลึงกับ *UGT2B15* ถึง 95% สามารถพบการแสดงออกของเอนไซม์ *UGT2B17* ได้ที่ ตับ อัณฑะ มดลูก ต่อมหมวกไต และต่อมลูกหมาก (Beaulieu et al. 1996) บทบาทสำคัญจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยากกลูคูโรนิเดชันของสารสำคัญภายในร่างกาย เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน, testosterone, androsterone และ etiocholanolone (Mouritsen et al. 2018, Zhang et al. 2018) นอกจากนี้เอนไซม์ *UGT2B17* ยังมีบทบาทสำคัญในการเกิดปฏิกิริยากกลูคูโรนิเดชันของยาหลายชนิด เช่น exemestane, voristat และ ibuprofen เป็นต้น (Bock 2015, Luo et al. 2018, Turgeon et al. 2003)

การกลายพันธุ์แบบ deletion ของยีน *UGT2B17* สามารถพบได้ในชาวเอเชีย ประมาณ 67% แต่จะพบในชาว Caucasians ประมาณ 9% ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ *UGT2B17* ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา หรือสารต่าง ๆ ที่เป็นสับสเตรท โดยการที่เอนไซม์มีการทำงานลดน้อยลง หรือขาดการแสดงออกของเอนไซม์จะส่งผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมากที่เพิ่มขึ้น หรือเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาที่เป็น

สับสเตรทของเอนไซม์ UGT2B17 เช่น Karypidis และคณะ (2008) พบว่าการกลายพันธุ์แบบ deletion ของยีน *UGT2B17* จะเกี่ยวข้องกับระดับของเทสโทสเทอโรนในปัสสาวะลดน้อยลง และสัมพันธ์กันกับความเสี่ยงในการเกิดเป็นโรคมะเร็งต่อมลูกหมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 2.07; 95% CI = 1.32-3.25) (Karypidis et al. 2008) ในทางกลับกันงานวิจัยของ Park และคณะ (2006) พบว่าการกลายพันธุ์แบบ deletion ของยีน *UGT2B17* สัมพันธ์กับการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมากของชาว Caucasians (OR = 1.9; 95% CI = 1.2-3.0) แต่ไม่สัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมากในชาว African American (OR = 1.3; 95% CI = 0.6-2.7) (Park et al. 2006) งานวิจัยของ Urashima และคณะ (2015) พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ deletion จะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งบริเวณ upper aerodigestive tract ในผู้ป่วยที่สูบบุหรี่ หรือดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 2.07; 95% CI = 1.34-3.20) เนื่องจากสารก่อมะเร็งในควันบุหรี่ และเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จัดเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ UGT2B17 การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนจึงส่งผลทำให้ปฏิกริยากลุ่มโรนิตะขึ้นเกิดขึ้นน้อยลง มีความเป็นพิษของสับสเตรทเพิ่มขึ้น (Urashima et al. 2015) นอกจากนี้ Luo และคณะ (2018) พบว่า UGT2B17 เป็นเอนไซม์หลักที่ส่งผลต่อการสร้าง 17 β -DHE-Gluc ดังนั้นการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* จึงสัมพันธ์กันกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ 17 β -DHE ในพลาสมาของผู้หญิงที่ป่วยเป็นโรคมะเร็งเต้านม และได้รับยา exemestane (Luo et al. 2018)

การศึกษถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* จัดว่ามีความสำคัญ ซึ่งในปัจจุบันพบว่ายังขาดการศึกษาถึงความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* ในกลุ่มประชากรของประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ในประชากรชาวไทยมุสลิมที่อาศัยอยู่ที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยคาดว่าผลการศึกษาจะสามารถนำไปใช้ในการป้องกันการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ชนิดนี้ และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการปรับขนาดยาให้มีความเหมาะสมกับผู้ป่วยรายนั้น ๆ ได้

การตรวจเอกสาร

1. เกสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics)

การศึกษาระบวนการเป็นไปของยาต่าง ๆ เมื่อเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ หรือหมายถึงกระบวนการของร่างกายในการจัดการกับยาที่ได้รับ ประกอบไปด้วย การดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกาย (absorption) การกระจายตัวของยา (distribution) การเปลี่ยนแปลงยา (metabolism)

และการกำจัดยาออกนอกร่างกาย (excretion) (ศศิมา กุสุมา ณ.อยุธยา และ รัตนาภรณ์ คงคง 2554)

1.1 การดูดซึมยาเข้าสู่ร่างกาย (drug absorption) หมายถึง การดูดซึมยาจากบริเวณที่ได้รับนอกหลอดเลือดผ่านเยื่อเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งจัดเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะเกิดขึ้นในการให้ยาจากทุก ๆ ทาง เช่น ทางปาก อมใต้ลิ้น ทางทวารหนัก ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ทาผิวหนัง และการสูดดม เป็นต้น ยกเว้นการฉีดเข้าเส้นเลือดดำ (intravenous injection) โดยชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) จัดเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการบอกสัดส่วนของยาที่เข้าสู่กระแสเลือดจากปริมาณยาทั้งหมดที่ได้รับ การบริหารยาโดยการฉีดเข้าเส้นเลือดดำนั้น จะเป็นการที่ยาเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง ส่งผลให้ชีวปริมาณการออกฤทธิ์เท่ากับ 100%

สำหรับการรับประทานยานั้น ยาที่ดูดซึมได้จะเคลื่อนที่จากลำไส้เล็กเข้าสู่ตับ ซึ่งที่ตับจะมีเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายยา ส่งผลให้ปริมาณยาที่เข้าสู่กระแสเลือดลดลง เรียกว่ากระบวนการนี้ว่ากระบวนการเมแทบอลิซึมรอบแรก (first pass metabolism) (นันทพงศ์ บุญฤทธิ์ 2561, ศศิมา กุสุมา ณ.อยุธยา และ รัตนาภรณ์ คงคง 2554)

1.2 การกระจายตัวของยา (drug distribution) หมายถึง ความสามารถในการกระจายตัวของยาจากกระแสเลือดไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกาย ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านกายภาพ (physiological factors) และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของยา (physicochemical properties) เช่น ขนาด ความสามารถในการละลายในไขมัน ความสามารถในการแตกตัวเป็นประจุ ตัวขนส่งยา และความสามารถในการจับกับโปรตีนในเลือด เป็นต้น ในช่วงแรกยาจะกระจายตัวขึ้นกับปริมาณเลือดที่ออกจากหัวใจและการไหลเวียนเลือด โดยจะไปที่หัวใจ ตับ ไต และสมองก่อน หลังจากนั้นจึงกระจายตัวไปยังอวัยวะส่วนอื่น ๆ เช่น กล้ามเนื้อ อวัยวะภายในผิวหนัง และเนื้อเยื่อไขมัน (นันทพงศ์ บุญฤทธิ์ 2561, ศศิมา กุสุมา ณ.อยุธยา และ รัตนาภรณ์ คงคง 2554)

1.3 การเปลี่ยนแปลงยา (drug metabolism) หรือ biotransformation หมายถึง กระบวนการที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวภาพของสารหรือโมเลกุล โดยอาศัยเอนไซม์มากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป เพื่อให้สารเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น และขับออกนอกร่างกายผ่านทางอุจจาระ ปัสสาวะ เหงื่อ หรือการหายใจ อวัยวะหลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาคือ ตับ โดยทั่วไปยาที่ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม สารที่ได้ อาจมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาลดลง หรือเท่าเดิม หรือมากขึ้น จนก่อให้เกิดความเป็นพิษ นอกจากนี้ ยาที่อยู่ในรูปของ prodrug จำเป็นต้องอาศัยกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อให้ยาสามารถมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ (นันทพงศ์ บุญฤทธิ์ 2561, ศศิมา กุสุมา ณ.อยุธยา และ รัตนาภรณ์ คงคง 2554)

กระบวนการเมแทบอลิซึมของยาที่ตับจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ต้องใช้เอนไซม์ 2 กระบวนการ และอีก 1 กระบวนการจะเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารผ่านเมมเบรนได้แก่

1) กระบวนการในระยะที่ 1 (phase I processes) คือปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP) และ flavin-containing monooxygenases (FMOs) เป็นตัวเร่ง จะจับกับออกซิเจน ไฮโดรเจน น้ำ หรือกรดอะมิโนของโมเลกุลยาที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (lipophilic drug) เพื่อให้เกิดหมู่ที่มีขั้วขึ้น ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หมู่อะมิโน (-NH₂) หมู่อาร์บอกล (-COOH) หรือหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (-SH) ส่งผลให้ไปเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของยา ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้ได้แก่ ปฏิกิริยา oxidation, reduction และ hydrolysis (นันทพงศ์ บุญฤทธิ์ 2561)

2) กระบวนการในระยะที่ 2 (phase II processes) เป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของยาโดยการเกิดปฏิกิริยาควบจับ (conjugation) กับสารบางชนิด ได้แก่ glucuronide (glucuronidation), sulfate (sulfation), glutathione (glutathione conjugation), methyl group (methylation) และ *N*-acetyl (*N*-acetylation) โดยอาศัยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจง คือ uridine-5'-diphosphoglucuronosyltransferases (UGTs), sulfotransferase (SULT), glutathione-S-transferase (GSTs), methyltransferases และ *N*-acetyltransferase (NAT) ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดอาจมีหลายไอโซไซม์ (isozyme) (Jančová and Šiller 2012)

ปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมทั้งเฟส I และ II เกิดขึ้นเพื่อให้ยามีความสามารถในการละลายน้ำได้มากขึ้น เพื่อที่ถูกกำจัดออกจากร่างกายได้ดีขึ้น ซึ่งปฏิกิริยาทั้งสองเฟสนี้เกิดขึ้นมากที่ตับ ต้องใช้เอนไซม์เป็นตัวทำปฏิกิริยากับยา และได้สารที่เรียกว่าเมแทบอลิท์ (metabolite) (ศศิมา กุสุมา ณ.อยุธยา และ รัตนาภรณ์ คงคง 2554)

3) กระบวนการในระยะที่ 3 (phase III processes) เป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของ membrane transporters ที่ใช้ในการขนส่งยาทั้งเข้าหรือออกจากเซลล์ตับ เช่น uptake transporter มีหน้าที่นำสารหรือยาเข้าสู่เซลล์ตับ ส่วน efflux transporter มีหน้าที่ในการนำยาหรือสารที่ถูกเมแทบอลิซ์แล้วออกนอกเซลล์ตับ เพื่อการขับออกต่อไป (Penner, Woodward, and Prakash 2012)

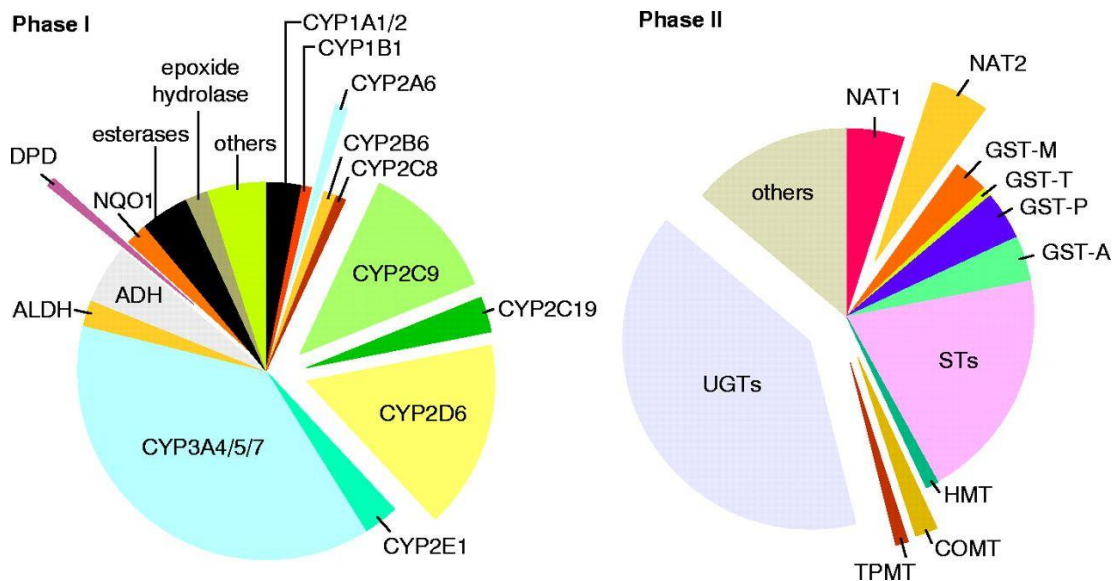
1.4 การกำจัดยาออกนอกร่างกาย (drug excretion) เป็นกระบวนการที่ใช้ในการกำจัดยาออกนอกร่างกายในรูปที่ยาถูกเปลี่ยนแปลง หรือไม่ถูกเปลี่ยนแปลงก็ได้ อวัยวะหลักที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดยาออกนอกร่างกาย ได้แก่ ไต หรือตับ การกำจัดยาผ่านทางไตมีบทบาทสำคัญต่อการกำจัดยาในรูปที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (unchanged drugs) หรือสารเมแทบอลิท์ผ่านทางปัสสาวะ ลักษณะสำคัญของสารประกอบที่ถูกขับออกมาทางปัสสาวะ คือ มีขั้ว (เช่น มี

ประจุ) และสามารถละลายในน้ำได้ ยาที่มีความสามารถในการละลายในไขมันจะไม่สามารถกำจัดออกทางไตได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ตับ (phase I และ phase II) เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและจึงจะสามารถขับออกทางปัสสาวะได้ สำหรับยาหรือเมแทบอลิท์ที่ไหลเวียนอยู่ในระบบเลือดของตับจะจับกับน้ำดี และผ่านออกทางลำไส้เล็ก ซึ่งจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีของยา ยาบางชนิดอาจถูกดูดซึมอีกครั้งที่ลำไส้เล็ก และหมุนเวียนในร่างกายอีกครั้ง ส่วนยาที่ไม่ถูกดูดซึมซ้ำอีกครั้งจะถูกขับออกทางอุจจาระ นอกจากนี้ยายังสามารถขับออกทางปอด (แก๊ส หรือไอระเหย) นานม เหงื่อ น้ำตา ผิวหนัง ผม หรือน้ำลายได้ (ศศิมา กุสุมา ณ.อยุธยา และ รัตนาภรณ์ คงคง 2554)

2. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา (drug metabolizing enzymes, DME)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา คือ กลุ่มของโปรตีนที่มีความหลากหลาย ซึ่งจะตอบสนองต่อปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมของสารเคมีแปลกปลอม (xenobiotic chemicals) หลากหลายชนิด เช่น ยา สารก่อมะเร็ง ยาฆ่าแมลง มลพิษ และสารพิษในอาหาร รวมทั้งสารจำเป็นภายในร่างกาย (endogenous compounds) เช่น steroids prostaglandins และ bile acids ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของยา (metabolic biotransformation) โดยอาศัยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปของยา จะส่งผลให้สารนั้นมีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้น และมีขั้ว ซึ่งไม่ใช่เพียงเพื่อให้สารสามารถกำจัดออกจากร่างกายได้อย่างง่ายเท่านั้น แต่ยังรวมถึงการลดหรือเพิ่มฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และความเป็นพิษของสารนั้นอีกด้วย

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยาที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidative ในเฟส I ได้แก่ CYP450, FMOs, monoamine oxidases (MAOs) และ xanthine oxidase หรือ aldehyde oxidase (XO หรือ AO) เป็นต้น ส่วนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยาที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา conjugation ในเฟส II ได้แก่ UGTs, SULTs, GSTs, NATs และ methyl (N-methyl-, thiomethyl-, และ thiopurinemethyl-) transferases ซึ่งจำเป็นต้องอาศัย cofactors ในการทำปฏิกิริยาร่วมด้วย (รูปที่ 1-1) (ตารางที่ 1-1) (Penner, Woodward, and Prakash 2012) Williams และคณะ พบว่าเอนไซม์ที่มีบทบาทเด่นในกระบวนการแปรรูปยา ได้แก่เอนไซม์ P450 ตามด้วย UGTs และ esterases ซึ่งการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เหล่านี้คิดเป็น 95% ในขณะที่การทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นพบเพียง 5% เท่านั้น (Williams et al. 2004)



รูปที่ 1-1 สัดส่วนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยาในเฟส I และ II

ตัวย่อ: ADH, alcohol dehydrogenase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; CYP, cytochrome P450; DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase; NQO1, NADPH:quinone oxidoreductase or DT diaphorase; COMT, catechol O-methyltransferase; GST, glutathione-S-transferase; HMT, histamine methyltransferase; NAT, N-acetyltransferase; STs, sulfotransferase; TPMT, thiopurine methyltransferase; UGTs, uridine 5'-triphosphate glucuronosyltransferase (Evans and Relling 1999)

ตารางที่ 1-1 ปฏิบัติการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของยา เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา isoform หลักที่อยู่ในตับ ตำแหน่งของเอนไซม์ (cellular localization) และ cofactor ที่ต้องการ (Penner, Woodward, and Prakash 2012)

ปฏิกิริยา	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา	isoform หลักที่อยู่ในตับ	ตำแหน่งของเอนไซม์	cofactor
Oxidation	Cytochrome P450	CYP3A4, 2D6, 2C, 1A2, 2E1	Microsomes	O ₂ , NADPH
	Flavin-containing monooxygenases	FMO3, FMO4, FMO5	Microsomes	O ₂ , NADPH
	Peroxidase			
	Monoamine oxidase	MAO-A, MAO-B	Mitochondrial outer membrane	O ₂ , H ₂ O
	Alcohol dehydrogenase	ADH1A, 1B, 1C	Cytosol	NAD ⁺
	Aldehyde dehydrogenase	ALDH1, ALDH2	Mitochondria, cytosol	NAD(P) ⁺
	Aldehyde oxidase	AO	Cytosol	O ₂ , H ₂ O
	Xanthine oxidase	XO	Cytosol	O ₂ , H ₂ O
	Prostaglandin H synthase	PHS-1, PHS-2	Microsomes	O ₂
Reduction	Nitro-reductase	P450, non-P450 enzymes	Microsomes, microflora	NADPH
	Azo-reductase	P450, non-P450 enzymes	Microsomes, microflora	NADPH
	Aldo-keto reductase	AKR1A1, 1B1, 1C1-4, 1D1	Cytosol, microsomes	NADPH, NADH
	Quinone reductase	NQO1, P450 reductase	Cytosol, microsomes	NAD (P) H, NADPH

ตารางที่ 1-1 ปฏิบัติการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของยา เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา isoform หลักที่อยู่ในตับ ตำแหน่งของเอนไซม์ (cellular localization) และ cofactor ที่ต้องการ (ต่อ) (Penner, Woodward, and Prakash 2012)

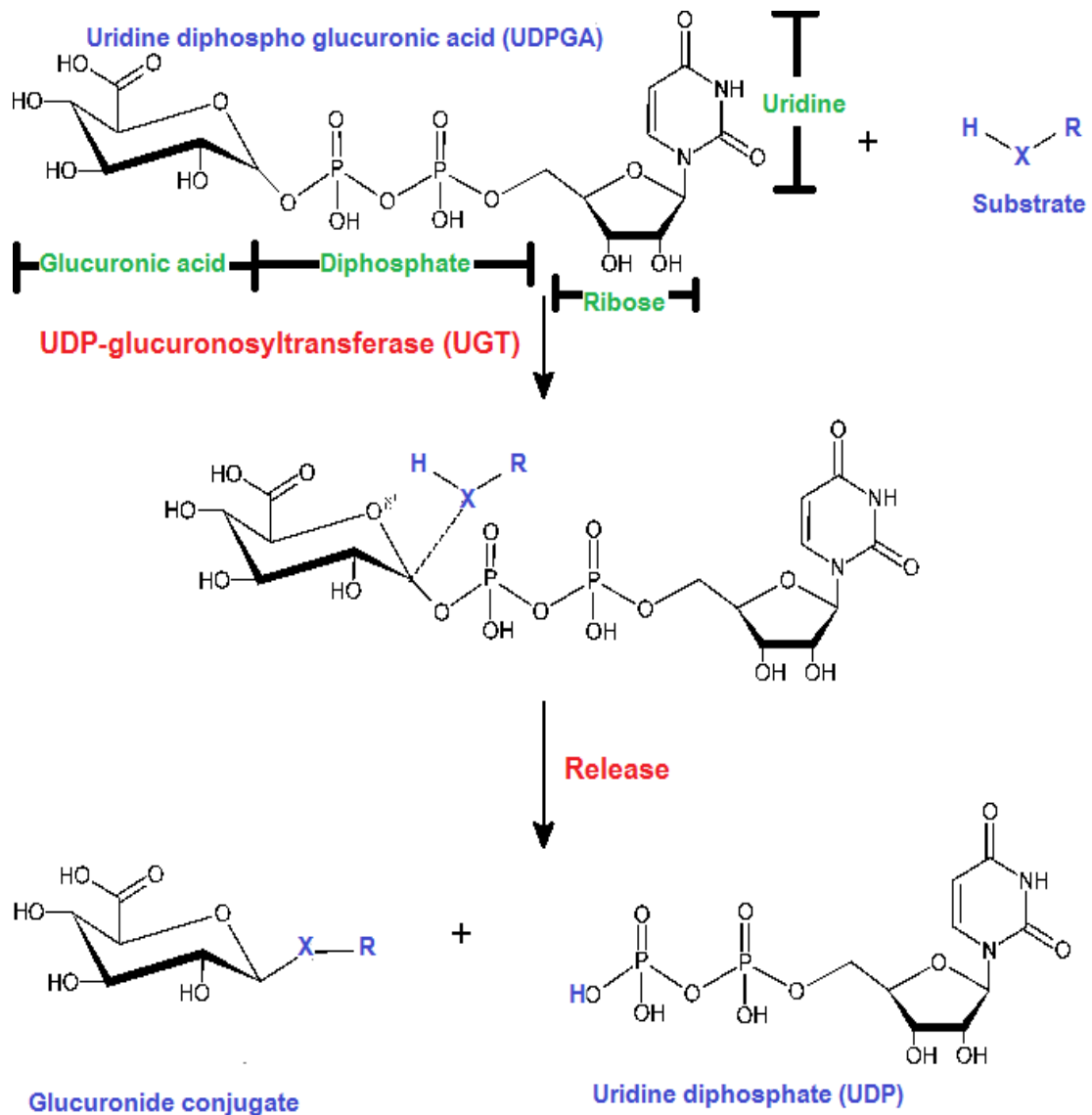
ปฏิกิริยา	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา	isoform หลักที่อยู่ในตับ	ตำแหน่งของเอนไซม์	cofactor
Hydrolysis	Epoxide hydrolase	EPHX1 (mEH), EPHX2 (sEH)	Microsomes, cytoplasm	H ₂ O
	Esterase	hCE1, hCE2	Microsomes, cytosol, lysosomes	H ₂ O
	Peptidase	Aminopeptidase, carboxypeptidase, endopeptidase	Lysosomes	H ₂ O
	Alkaline phosphatase		Plasma membrane	H ₂ O
Conjugation	Uridine diphospho-glucuronosyltransferase	UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, UGT2B4, 2B7, 2B15, 2B17	Microsomes	UDPGA
	Sulfotransferase	SULT1A1, 1B1, 1E1, 2A1	Cytosol	PAPS
	Methyltransferase	COMT, PNMT, TPMT	Cytosol, microsomes	SAM
	N-acetyltransferase	NAT1, NAT2	Cytosol, mitochondria	Acetyl CoA
	Glutathione S-transferase	GST A1-1, M1-1, P1-1	Cytoplasm	GSH

ตารางที่ 1-1 ปฏิบัติการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของยา เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา isoform หลักที่อยู่ในตับ ตำแหน่งของเอนไซม์ (cellular localization) และ cofactor ที่ต้องการ (ต่อ) (Penner, Woodward, and Prakash 2012)

ปฏิกิริยา	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปยา	isoform หลักที่อยู่ในตับ	ตำแหน่งของเอนไซม์	cofactor
Conjugation	Amino acid conjugation enzyme	Acyl-CoA synthetase, acyl-CoA: amino acid N-acyltransferase	Cytosol, microsomes, mitochondria	ATP, acetyl CoA, amino acids

3. Uridine 5'-diphospho (UDP)-glucuronosyltransferases (UGTs)

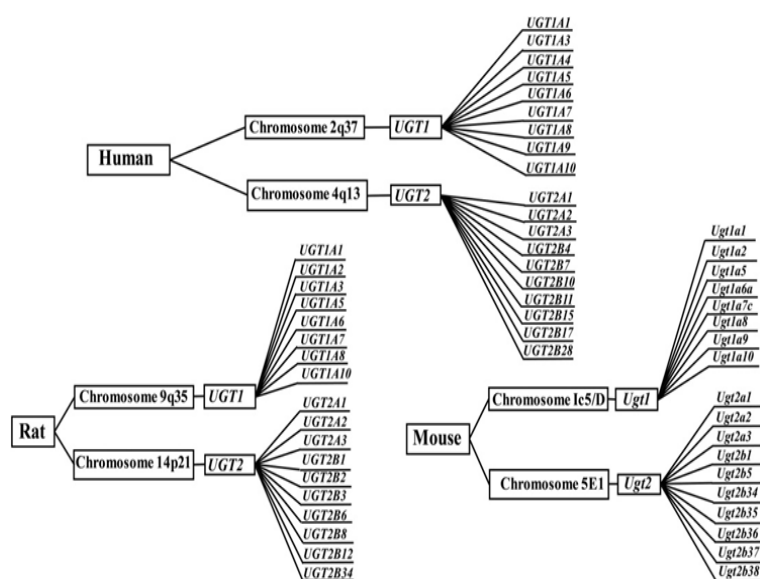
UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) เป็นเอนไซม์หลักใน phase II ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา เกี่ยวข้องกับการลดความเป็นพิษของสารแปลกปลอม (xenobiotics) และรักษาสมดุลของ endobiotics โดย UGTs จะทำงานร่วมกับ CYP450 และ SULTs (Bock 2015) ปฏิบัติการกลูคูโรนิเดชัน (glucuronidation) จะถูกกระตุ้นโดย UGTs ที่อยู่ในบริเวณเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum: ER) ของตับ ไต ลำไส้ ปอด ต่อมลูกหมาก ต่อมไทรอยด์ ต่อมพิทูอิทารี ต่อมหมวกไต ต่อมรังไข่ ต่อมต่อมไทรอยด์ ต่อมต่อมใต้สมอง ต่อมต่อมหลัง สมอง ม้าม และเยื่อในจมูก และอาศัย cofactor ที่ชื่อว่า "uridine-5-diphospho- α -D-glucuronic acid (UDPGA)" ในการทำงานเอนไซม์ UGTs จะไปกระตุ้น glucuronic acid ที่ได้มาจาก UDPGA ให้เกิดการควบจับด้วยพันธะโคเวเลนต์กับหมู่ฟังก์ชันของสับสเตรท เช่น ฟีนอล แอลกอฮอล์ อะลิฟาติก อะโรมาติกเอมีน ไทออล และกรดคาร์บอกซิลิก ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่อะตอมของคาร์บอนตัวที่ 1 ของ glucuronic acid ได้ออกมาเป็นสารที่อยู่ในรูปของ glucuronide ทำให้ง่ายต่อการกำจัดออก กับ uridine diphosphate ซึ่งปฏิกิริยาเช่นเดียวกันนี้จะเกิดขึ้นกับ endogenous molecules เช่น บิลิรูบิน กรดไขมัน กรดน้ำดี สเตียรอยด์ฮอร์โมน ไทรอยด์ฮอร์โมน และวิตามินที่ละลายในไขมัน เช่นกัน (รูปที่ 1-2) (Penner, Woodward, and Prakash 2012, Rowland, Miners, and Mackenzie 2013, Yang et al. 2017)



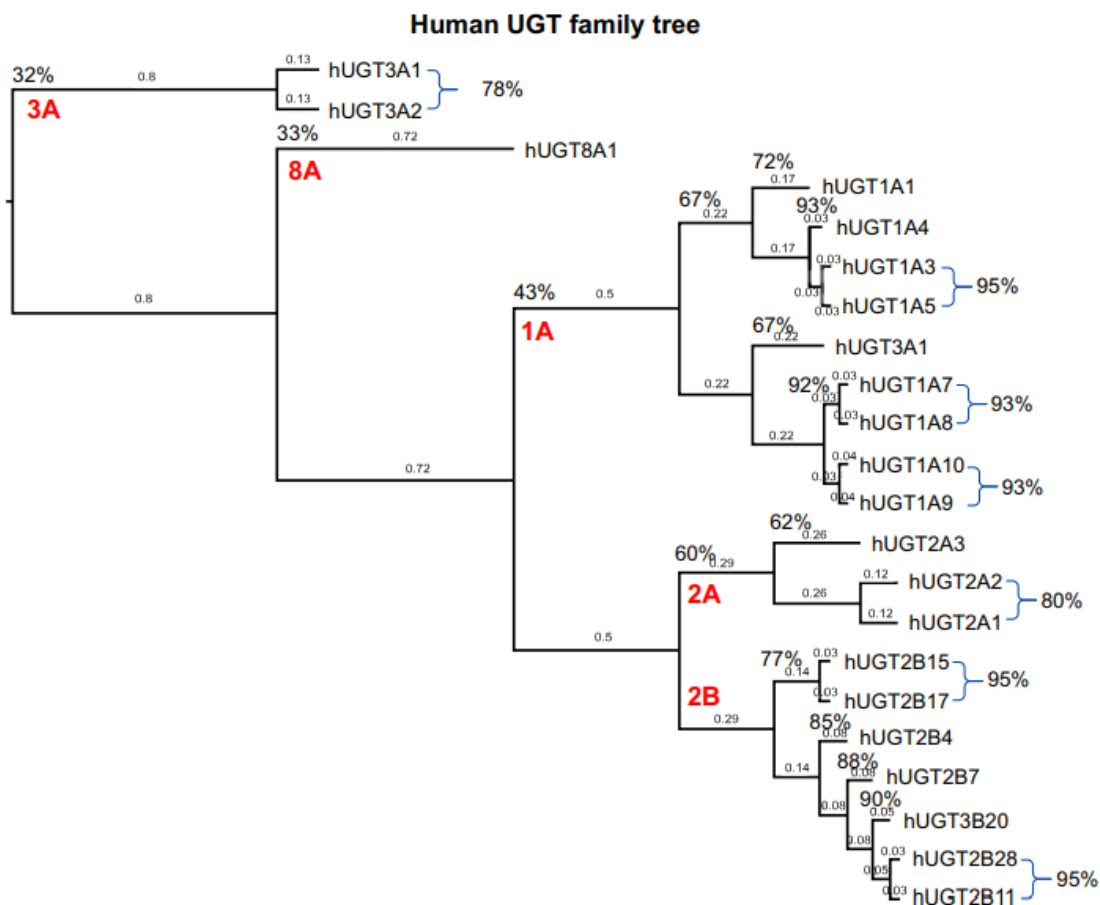
รูปที่ 1-2 แผนผังการเกิดปฏิกิริยากกลูคูโรนิเตชัน โดย UGT จะไปกระตุ้นการควบจับระหว่าง glucuronic acid ของ UDPGA กับตำแหน่งหมู่ฟังก์ชันของสารที่เป็นสับสเตรท เกิดเป็นสารกลูคูโรไนด์ที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีขึ้น ทำให้ง่ายต่อการกำจัดออกนอกร่างกาย
 ดัดแปลงจาก: (Rowland, Miners, and Mackenzie 2013)

3.1 การตั้งชื่อเอนไซม์

UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการจับกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ระหว่างน้ำตาล (UDP-glucuronic acid, UDP-glucose, UDP-galactose และ UDP-xylose) กับหมู่ฟังก์ชันของสับสเตรท (hydroxyl, carboxyl หรือ amine) เกิดเป็น glucuronides โดยทั่วไปแล้ว UDP-glycosyltransferase superfamily ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถแบ่งออกเป็น 4 subfamilies ได้แก่ UGT1, UGT2, UGT3 และ UGT8 เมื่อนำมาเทียบกันจะพบว่า UDP-glucuronosyltransferases family จะประกอบไปด้วย 2 subfamilies ได้แก่ UGT1 (1A) และ UGT2 (2A และ 2B) เนื่องจาก UGT3 จะใช้ UDP-glucose, UDP-xylose และ UDP-N-acetylglucosamine และ UGT8 ใช้ UDP-galactose เป็น sugar donor เพื่อให้เกิด galactosidate ceramide (Meech et al. 2019) สำหรับยีน *UGT1* family จะประกอบด้วย 5-exons แบ่งเป็น 1 unique first exon รวมกันกับ 4 shareable exons นำไปสู่การสร้างโปรตีนร่วมกับ unique N-terminal domains และ identical C-terminus domains ส่วนยีน *UGT2A1* และ *2A2* ของ *UGT2* family จะประกอบไปด้วย 1 unique first exon รวมกันกับ 5 sharing exon และจะไม่พบ exon-sharing ใน *UGT2A3* (6 exons) และ *UGT2B* (6 exons) ในมนุษย์ *UGT1A* จะประกอบด้วย 13 unique first exon แต่จะมี 4 ชนิด (*1A2P*, *1A11P*, *1A12P* และ *1A13P*) ที่จัดเป็น pseudogenes เนื่องจากมี pseudogenes เกิดขึ้น ส่งผลให้หน้าที่ของ UGT แต่ละ isoforms มีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น *UGT1A4* ในหนู rat และ *Ugt1a4* ในหนู mice จัดเป็น pseudogenes แต่ในมนุษย์ *UGT1A4* จัดเป็นยีนที่มีหน้าที่ (Yang et al. 2017) โดย UGT isoforms ที่มีหน้าที่ในมนุษย์ หนู rat และ หนู mice จะแสดงดังรูปที่ 1-3 และ 1-4



รูปที่ 1-3 UGT isoforms ที่มีหน้าที่ในมนุษย์ หนู rat และหนู mice (Yang et al. 2017)



รูปที่ 1-4 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของ UGTs แต่ละ isoforms ที่มีหน้าที่ในมนุษย์ (Meech et al. 2019)

3.2 ความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ และการแพร่กระจายในเนื้อเยื่อ

แม้ว่า UGT superfamily ในมนุษย์ และสัตว์ฟันแทะจะมีความคล้ายคลึงกัน แต่การแพร่กระจาย ประสิทธิภาพการเมแทบอลิซึม หรือระดับที่แสดงออกของแต่ละ isoforms นั้นจะมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ โดย *UGT1* ที่มีหน้าที่ในมนุษย์ ประกอบด้วย 9 isoforms (*UGT1A1* และ *UGT1A3-1A10*) 8 isoforms ในหนู rats (*UGT1A1-1A3*, *UGT1A5-1A8* และ *UGT1A10*) และ 8 isoforms ในหนู mice (*Ugt1a1-1a2* และ *Ugt1a5-1a10*) เช่นเดียวกับสมาชิกของ *UGT2* และ *UGT3* ที่ถูกถอดรหัสโดยยีนที่แตกต่างกันระหว่างมนุษย์ และสัตว์ฟันแทะ UGTs จะแพร่กระจายในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ตับ ไต ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ กระเพาะอาหาร ปอด สมอง หัวใจ รังไข่ อัณฑะ ต่อมลูกหมาก และรก ซึ่งอัตราการแสดงออกของเอนไซม์ UGT แต่ละตัวในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันยังไม่ทราบแน่ชัด

ตับ ระบบทางเดินอาหาร (กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่) และไต จัดเป็นอวัยวะเด่น ๆ ที่มีการแสดงออกของ UGT เนื่องจากมีบทบาทสำคัญ เป็นตำแหน่งในการ

แม้ว่ากลไกการควบคุมของ UGTs ยังไม่ได้รับการศึกษาที่ครบถ้วน แต่มีรายงานว่าสาเหตุของการเกิดโรคบางโรค หรือมะเร็ง จะมีความเกี่ยวข้องกันกับการสูญเสียหน้าที่การทำงานของ UGTs โดยปกติแล้ว UGTs จะมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อ เช่น UGT1A1 จะพบการแสดงออกมากในตับ และมีความจำเพาะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของ bilirubin หากพบว่ามีการทำงานที่ลดลง หรือขาดไป จะส่งผลให้พัฒนาไปเป็น Crigler-Najjar syndrome หรือ Gilbert's syndrome ส่วน UGT1A1, 1A6 และ 1A7 ที่พบมากในระบบทางเดินอาหาร จะตอบสนองต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารอาหารที่เป็นอนุพันธ์ของ heterocyclic amines และ polycyclic aromatic hydrocarbons มีความเกี่ยวข้องกันกับการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ในปอดจะพบการแสดงออกของ UGT1A isoform เท่านั้น ซึ่งการสูญเสียหน้าที่การทำงานของ UGT1A6 จะส่งผลต่อการเพิ่มความเป็นพิษของควันที่ก่อให้เกิดมะเร็งปอด นอกจากนี้ UGT2B15 และ 2B17 จัดเป็นเอนไซม์สำคัญสำหรับแอนโดรเจน ซึ่งจะพบการแสดงออกที่บริเวณต่อมลูกหมาก และเกี่ยวข้องกันกับการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก ดังนั้นการแพร่กระจายที่เนื้อเยื่อ และคุณสมบัติในการเมแทบอลิซึมของ UGT isoforms ต่าง ๆ จัดเป็นประโยชน์ที่จะช่วยเพิ่มความเข้าใจต่อการเกิดโรค ความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง และความปลอดภัยจากการใช้ยาทางคลินิก (Yang et al. 2017)

4. UDP-glucuronosyltransferases 2B17 (UGT2B17)

UGT2 family แบ่งออกเป็น 2 subfamilies คือ *UGT2A* และ *UGT2B* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ตำแหน่ง q13 สมาชิกของ *UGT2B* ประกอบด้วย 7 isoform ได้แก่ *UGT2B4*, *UGT2B7*, *UGT2B10*, *UGT2B11*, *UGT2B15*, *UGT2B17* และ *UGT2B28* (Wilson et al. 2004) *UGT2B17* gene ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1996 (Beaulieu et al. 1996)

4.1 โครงสร้างและลักษณะของยีน *UGT2B17*

4.1.1 บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter region)

บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* จะประกอบด้วย TATA-box 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ -63, -152, -230 และ -307 มีหน้าที่ในการเป็นตำแหน่งที่ให้ RNA polymerase II complex เข้ามาจับ เพื่อเริ่มเข้าสู่ขบวนการถอดรหัสของยีน การจับกันของ TATA box และ RNA polymerase II complex จะต้องอาศัย transcription factor เข้ามามีส่วนร่วม เพื่อให้กระบวนการถอดรหัสของยีนนั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* จะประกอบไปด้วยตำแหน่งของ transcription factor binding site ชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถอดรหัส transcription factor บางตัวมีหน้าที่เป็น activator คือเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดกระบวนการถอดรหัสของยีน หรือบางตัวมีหน้าที่เป็น

repressor ทำหน้าที่ในการขัดขวางไม่ให้ activator เข้าจับกับดีเอ็นเอ ส่งผลให้ยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีน เช่น ที่ตำแหน่ง -84 ถึง -96 bp จะเป็นตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อ transcription factor ที่มีชื่อเรียกว่า hepatocyte nuclear factor (HNF1) โดยมีการศึกษาวิจัยในเซลล์ HepG2 พบว่าเมื่อมี HNF1 alpha เข้ามาจับจะมีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* ให้ดียิ่งขึ้น ส่วนในเซลล์ LNCaP จะอาศัย HNF1 alpha จากภายนอกเซลล์เข้ามาจับและกระตุ้นการทำงานของโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* นอกจากนี้ที่ตำแหน่ง -75 ถึง -83 bp เป็นตำแหน่งของ Pbx site มีความจำเพาะต่อสมาชิกของ Pbx, Hox, Meis และ Prep1 families ซึ่งเป็น homeodomain-containing proteins จากงานวิจัยพบว่า Pbx2-Prep1 heterodimer จะจับกับโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* ตรงตำแหน่ง Pbx site ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการรบกวนการจับกันระหว่าง HNF1 alpha กับ HNF site ที่อยู่ติดกันกับ Pbx site ทำให้การทำงานของโปรโมเตอร์ที่ถูกควบคุมโดย HNF1 alpha ลดลง (Gregory, Hansen, and Mackenzie 2000, Gregory and Mackenzie 2002) Transcription factor FOXA1 จัดเป็นตัวการสำคัญที่มีส่วนช่วยในการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ *UGT2B17* ในต่อมลูกหมาก เนื่องจาก FOXA1 จะเข้ามาจับกับโปรโมเตอร์ของยีนตรง FOXA binding site (C/AAAC/T) ซึ่งอยู่ตรงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ระหว่าง -147 ถึง -158 และกระตุ้นส่วนของโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* ให้มีการถอดรหัส (Hu et al. 2010) นอกจากนี้บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนยังประกอบไปด้วย cis-acting element(s) อื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับการแสดงออกของยีน *UGT2B17* เช่น AP-1 การขาดหายไปของ AP-1 binding site จะส่งผลให้กระบวนการถอดรหัสของยีนลดลง 3-4 เท่า ซึ่ง AP-1 binding site จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TGA(G/C)T(C/A)A หน้าที่ของ AP-1 คือการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนในเชิงบวก เพื่อให้เกิดการตอบสนองต่อ phorbol esters, cytokines และ growth factors ลำดับนิวคลีโอไทด์ GGGGGATCACCC เป็นตำแหน่ง binding site ของ NF- κ B ซึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นกระบวนการถอดรหัสของยีนให้มีการตอบสนองต่อ interleukins, lipopolysaccharides และ phorbol esters (Beaulieu et al. 1997) (รูปที่ 1-6)

4.2.2 บริเวณที่มีการแปลรหัส (coding region)

ยีน *UGT2B17* ประกอบด้วย 6 เอกซอน ขนาดประมาณ 30 kbps (Beaulieu et al. 1997) มีนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนทั้งหมด 1,593 bps แบ่งเป็น เอกซอน 1 (724 bps), เอกซอน 2 (149 bps), เอกซอน 3 (132 bps), เอกซอน 4 (88 bps), เอกซอน 5 (220 bps) และ เอกซอน 6 (280 bps) (รูปที่ 1-7) ยีน *UGT2B17* สามารถถอดรหัสได้สายพอลิเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 530 ตัว (มวลโมเลกุล 61095 Da) กรดอะมิโนที่ถูกถอดรหัสออกมาจากยีน *UGT2B17* นั้นจะมีความคล้ายคลึงกันกับกรดอะมิโนที่ถูกถอดรหัสมาจากยีน *UGT2B15* ถึง 94% (รูปที่ 1-8) สามารถพบการแสดงออกของเอนไซม์ *UGT2B17* ได้ที่

ตับ ไต รก ปอด ลิ้น ปาก ระบบทางเดินอาหาร อวัยวะ มดลูก ต่อมไขมัน และต่อมลูกหมาก (Beaulieu et al. 1996)

โครงสร้างของโปรตีน หรือเอนไซม์ UGT2B17 ที่ถูกถอดรหัสมาจาก ยีน *UGT2B17* มีเอกซอน 1 เป็นส่วนต้นของเอนไซม์ ซึ่งจะเป็นบริเวณที่ใช้ในการจับกับ สับสเตรท (substrate binding site) และส่วนปลายของเอนไซม์จะถูกถอดรหัสโดยเอกซอน 2-6 ซึ่งจะเป็นบริเวณที่มีโคสับสเตรทมาจับ (co-substrate binding site)

5. UDP-glucuronosyltransferases 2B15 (*UGT2B15*)

UGT2B15 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 ตำแหน่ง q13.2

5.1 โครงสร้างและลักษณะของยีน *UGT2B15*

5.1.1 บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter region)

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B15* และ *UGT2B17* มีความคล้ายคลึงกันถึง 91 % จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่านิวคลีโอไทด์ จำนวน 59 เบสที่อยู่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B15* ตรงตำแหน่งที่ -113 ถึง -171 จะเป็นตำแหน่งที่มี binding site ของ HNF3 β ซึ่งจะไม่พบตำแหน่งนี้ในยีน *UGT2B17* โปรโมเตอร์ของ ยีน *UGT2B15* จะประกอบด้วย TATA-box 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ -63, -290 และ -367 ซึ่งมีความแตกต่างจากยีน *UGT2B17* โดยมีสาเหตุมาจากการที่มีนิวคลีโอไทด์ ตรงตำแหน่ง -212 แตกต่างกันจาก T กลายเป็น C ส่งผลให้ขาดตำแหน่งที่จะเป็น binding site ของ TATA box ไป 1 ตำแหน่ง เนื่องจากบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B15* และ *UGT2B17* มีความคล้ายคลึงกันมาก ทำให้ cis-acting elements ของทั้งสองยีนมีความคล้ายคลึงกัน เช่น Pbx-1, ROR-alpha, Oct-1 และ AP-1 site (รูปที่ 1-6) (Turgeon et al. 2000)

5.2 บริเวณที่มีการแปลรหัส (coding region)

ยีน *UGT2B15* ประกอบด้วย 6 เอกซอน ขนาดประมาณ 25 kbps มี นิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนทั้งหมด 1593 bps แบ่งเป็น เอกซอน 1 (724 bps), เอกซอน 2 (149 bps), เอกซอน 3 (132 bps), เอกซอน 4 (88 bps), เอกซอน 5 (220 bps) และ เอกซอน 6 (280 bps) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันกับยีน *UGT2B17* (รูปที่ 1-7) นอกจากนี้ความยาวของชิ้นส่วนอินทรอนที่ 1-4 ของทั้งสองยีนยังมีขนาดเท่ากัน ยกเว้นอินทรอนชิ้นส่วนที่ 5 ที่มีขนาดแตกต่างกันโดยยีน *UGT2B15* จะมีขนาดอยู่ที่ 6 kbps ส่วนยีน *UGT2B17* จะมีขนาดอยู่ที่ 12 kbps และพบว่า 150 นิวคลีโอไทด์แรกของชิ้นส่วนอินทรอน 1 ของทั้งสองยีนมีความคล้ายกันถึง 98 % (Turgeon et al. 2000) ยีน *UGT2B15* สามารถ ถอดรหัสได้สายพอลิเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 530 ตัว (มวลโมเลกุล 61036 Da) กรดอะมิโนที่ถูก

ถอดรหัสออกมาจากยีน *UGT2B15* นั้นจะมีความคล้ายคลึงกันกับกรดอะมิโนที่ถูกถอดรหัสมาจากยีน *UGT2B17* ถึง 94% (รูปที่ 1-8) สามารถพบการแสดงออกของเอนไซม์ *UGT2B15* ได้ที่ตับ ไต อัณฑะ เต้านม ระบบทางเดินอาหาร รก มดลูก ปอด ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ รังไข่ และต่อมลูกหมาก

UGT2B17						
UGT2B15						-1608 TGCTGTGG
UGT2B17						
UGT2B15	CCTGCTCTCT	GGGGTGGAGG	-1579A>T,G GATAGGTCCA	CAAGCGACAC	AGACCTGAGC	
UGT2B17						
UGT2B15	CCCTCCTAGG	ATTTGGCACC	AGATGTAAGG -1411	TTCTTGAATC	AGTTTGAACC	AP-1
UGT2B17			ACGAGGC	AGTGCGGAGC	AGCGTGCTGT	
UGT2B15	CCAACAGCGC	GCCAACAGAC	AACAGGAGGC	GGTGTGGAGC	AACATGCTGT	C/EBP
UGT2B17	TTAATGAGT	GCCTGGGTGC	AGGTGGGCTG	AGGCCTAAAA	TGGCATCAGC	
UGT2B15	TTAATGAAC	GCCTGGTTGC	AGGTGGGCTG	AGGCCTAAAA	TGGCATCAGC	-1409G>A
UGT2B17	CCCAAGTGAG	GATGGGACAG	TGGTTTTATA	GTTCTCTGTA	AAGAGTAAGT	
UGT2B15	CCCAGTGAG	GATGGGACAG	GGTTTTGTA	GTCTCTGTA	AACAGTAAGT	-1397A>C
UGT2B17	GTCCCAATCT	AACGTGACTG	CTATGTAGTA	TCTGGATGGC	CT----CTTG	
UGT2B15	GTCCCAATCT	GTTGTGACTG	CTATGTAGTA	CCTGGATGGC	CTATTTCTTG	
UGT2B17	ATCTTCAAGG	GTTTATGTC-	TCCAGCCAGG	GTAGGTGTCT	TCTGGCCGGC	
UGT2B15	ATCTTCAAGG	GTACATCTCT	TCCAGCCAGG	GTAAGTGTCT	TCTGGCCGGC	
UGT2B17	TCTTTCCTG	CTTCTGCTAT	CTTGCTGACA	CACGCTGCTG	ATGCAAGCAG	AP-1
UGT2B15	TCTTTCCTG	CTTCTGCTAT	CTTGCTGACA	CACGCTGCTG	ATGCAAGTGG	
UGT2B17	CCTTGCATCT	TGGGACTGGG	CCTGAGAAGG	GAGGAGTTAC	TCATCCCTTC	
UGT2B15	TCTTGCATCT	TGGGGCTGGG	CCTGAGAAGG	GAGGAGTTAC	TCATCCCTTC	
UGT2B17	AAGCTTTCA-	GGCCCAGAA	GAATCTTTGA	ACCCCTGCT	CCGCTGGCCA	-1043C>T,A
UGT2B15	AAGCTTTCAG	GTCTTGAGGA	GAATCTTTGA	ACCCCTGCA	TACTGGCCA	-1139T>C
UGT2B17	CCCTCCTAAA	CGATCACTGT	GGTGCCAGGC	AGGAATGAGC	TGCTTGGGTA	
UGT2B15	CCCTCCTGAT	AGATCCCTGT	GATGCCAGGC	AGGAATGAGC	CGCTTGGGTA	
UGT2B17	TCCAGAGAGC	TCCAGTACC	TTTCTGCTAC	TTCCTCTACC	CCTATATTTT	
UGT2B15	TCCAGAGAGC	TCCAGTGCC	TTTCTGCTAC	TTCCTCTACC	CCTGATTTT	-1007G>A
UGT2B17	GCTTGGCTTG	GTTCTCTAAT	TTGACTCAGC	TTCACATAAA	GTCAGGAACT	AP-1
UGT2B15	GCTTGGCTTG	GTTCTCTAAT	TTGACTCAGC	TTCACATAAA	GTCAGGAACT	
UGT2B17	TCTCCTGCAA	ACAGAACTTC	AGCTTCTCCA	GTGGGGATGT	GTATTCTGGA	
UGT2B15	TCTCCTGCAA	ACAGAACTTC	AGCTTCTCCA	GTGGGGATGT	GTATTCTGGA	-942A>C
UGT2B17	GAGGGGGATC	ACCTTTTCCC	ACTTCCATTG	TTGGGGCACT	CACAGTGTTC	NF-kB
UGT2B15	GAGGGGGATC	ACCTTTTCCC	ACTTCCATTG	TTGGGGCACT	CACAGTGTTC	C/EBP
UGT2B17	GGGATGTCTC	CCAGGTCCTG	CAGGAGCAGT	ACGCTTCCTG	CAGAGGGTGT	
UGT2B15	GGGATGTCTC	CCAGGTCCTG	CAGGAGCAGT	ACTTTCCTG	CAGAGGGTGT	-818T>G

รูปที่ 1-6 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* (NCBI Reference Sequence: NG_017033.1 และ NG_052676.1) และตำแหน่งของ transcription factor (กรอบสีน้ำเงิน) ตัวอักษรสีเขียวแสดงตำแหน่งของ transcription starting site (TSS) ตัวอักษรสีแดง แสดงนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* และตัวอักษรสีม่วงแสดงการกลายพันธุ์ของยีนที่มีรายงานแล้ว (known SNPs)

UGT2B17	GTGGATCCTC	TCAGAATTGC	TGGTCTGTCC	TTGCAGTTGA	-700C>T CCTGCAGCTA
UGT2B15	GTGGATCCTC	TCAGAATTGC	TGGTCTGTTC	TTGCAGTTGA	TCTGCAGCTA
UGT2B17	AAATTCACAA	TGCAAGCCTC	TGCATGCTGC	TCTGTCTGGA	GCTGCAATCT
UGT2B15	AAATTCACAA	TGCAAGCCTC	TGCATGCTGC	TCTGTCTGGA	GCTGCAATCT
UGT2B17	AGTCCTGCAT	CCCATCTGCC	ATGATCACTG	GAAAACCCCTC	ATTTATTTTT
UGT2B15	AGTCCTGCAT	CCCATCTGCC	ATGATCACTG	GAAAACCCCTC	ATTTATTTTT
UGT2B17	TAAAGGGTCC	AGAAAATGCT	AATCTATAGA	GATAGAAATT	AGATTAGTGG
UGT2B15	TAAAGGGTCC	AGAAAATGCT	AATCTATAGA	GATAGAAATT	AGATTAGTGG
UGT2B17	TTGCCTAGGG	TAGGATGGAT	GCAAAATTC	AGAGTGGGGG	GTTAGAGGCT
UGT2B15	TTGCCTAGGG	TAGGATGGAT	GCAAAATTC	AGAGTGGGGG	GTTAGAGGCT
UGT2B17	ATTGTATAGA	ATCTTTTGA	GATAA <u>ACTG</u>	ATTATTGTAG	TGAAAGTAA
UGT2B15	ATTGTATAGA	ATCTTTTGA	GATAA <u>ACTG</u>	ATTATTGTAG	TGATGTAAA AP-1
UGT2B17	ATTCTGTGAA	TATACTAGGA	AACATTGAAC	TGTACACACT	AATTGGTGAG C/EBP
UGT2B15	ATTCTGTGAA	TATACTAGGA	AACATTGAAC	TGTACACACT	AATTGGTGAG
UGT2B17	TCATATGGTA	TATGAATTAT	GTGTCAACAA	AGTTTTAGAA	GACATTACTT
UGT2B15	TCATATGGTA	TATGAATTAT	GTGTCAACAA	AGTTTTAGAA	GACATTACTT
UGT2B17	GCACCACAT	ATTAATAAAT	GGCGTTTGG	TTGTATAAAT	ACTTCTTCTC
UGT2B15	GCACCACGAT	ATTAATAAAT	GCCGTTTGG	TTGTATAAAT	ACTTCTTCTC
UGT2B17	TCTATGTCAA	GGGCACCGAA	CAGGCAGGAG	CCTCTCACCT	GCCACTGTTC
UGT2B15	TCTATGTCAA	GGGCACCGAA	CAGGCAGGAG	CCTCTCACTT	GCCACTGTTC
UGT2B17	TTAACAGTAT	TATAAAATAA	TTACATAAGA	CAGGTTACTT	ACGATTCTA ROR-α
UGT2B15	TTAACAGTAT	TATAAAATAA	TTACATAAGA	CAGGTTACTT	ACATTCTA
UGT2B17	GGTCATAAAA	ATTATTGCTT	GACTAGAGTA	ATTGTAATA	TAAAAGAACA FOXA
UGT2B15	GGTCATAAAA	ATTATTGCTT	GACTAGAGTA	ATTGTAACA	TAAAAGAACA
UGT2B17	CCAAACACAC	TAAAATAAAT	ATGAGGTCA-	-----	-----
UGT2B15	CCAAACACAC	TAAAATAAAT	ATGAGGTCA	CAATCTTTG	TTGGTCTCCT
UGT2B17	-----	-----	-----	----- A C	----- TCAAATTTT
UGT2B15	TGGCATGCAC	CTATTCAGAC	TGTTAGTATT	ATGTATTAC	TCAAATTTT
UGT2B17	AGCAGTTATA	TTTTAACTTG	ATTGATTTTT	CCTCAGATAT	AAGTATGAGA
UGT2B15	AGCAGTTATA	TTTTAACTTG	ATTGATTTTT	CCTCAGATAT	AAGTATGAGA
UGT2B17	AATGACAGAA	AGAAACAACA	ACTGGA ^{-25A>G} AAAAG	AAGCACTGCA	TAAGACCAGG
UGT2B15	AATGACAGAA	AGAAACAACA	ACTGGAAAAG	AAGCATTGCA	TAAGACCAGG

รูปที่ 1-6 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* (NCBI Reference Sequence: NG_017033.1 และ NG_052676.1) และตำแหน่งของ transcription factor (กรอบสีน้ำเงิน) ตัวอักษรสีเขียวแสดงตำแหน่งของ transcription starting site (TSS) ตัวอักษรสีแดงแสดงนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* และตัวอักษรสีม่วงแสดงการกลายพันธุ์ของยีนที่มีรายงานแล้ว (known SNPs) (ต่อ)

Exon 1 (724 bps)

UGT2B17	ATG T CTCTGA	AATGGATGTC	AGTCTTTCTG	CTGATGCAGC	TCAGTTGTTA
UGT2B15	ATG T CTCTGA	AATGGACGTC	AGTCTTTCTG	CTGATACAGC	TCAGTTGTTA
UGT2B17	CTTTAGCTCT	GGGAGTTGTG	GAAAGGTGCT	GGTGTGGCCC	ACAGAATACA
UGT2B15	CTTTAGCTCT	GG A AGCTGTG	GAAAGGTGCT	AGTGTGGCCC	ACAGAATACA
UGT2B17	GCCATTGGAT	AAATATGAAG	ACAATCCTGG	AAGAGCTTGT	TCAGAGGGGT
UGT2B15	GCCATTGGAT	AAATATGAAG	ACAATCCTGG	AAGAGCTTGT	TCAGAGGGGT
UGT2B17	CATGAGGTGA	TTGTGTTGAC	ATCTTCGGCT	TCTAT T CCTTG	TCAATGCCAG
UGT2B15	CATGAGGTGA	CTGTGTTGAC	ATCTTCGGCT	TCTA C TCTTG	TCAATGCCAG
UGT2B17	TAAATCATCT	GCTATTAAT	TAGAAGTTTA	TCCTACATCT	TTAACTAAAA
UGT2B15	TAAATCATCT	GCTATTAAT	TAGAAGTTTA	TCCTACATCT	TTAACTAAAA
UGT2B17	ATG A TTTGGGA	AGATTT T TTT	ATG A AAATGT	TCGATAGATG	GACATATAGT
UGT2B15	AT T ATTTGGGA	AGAT C TCTT	CTG A AAATTC	TCGATAGATG	GATATATGGT
UGT2B17	ATTTCAAAAA	ATACATTTTG	GTCATATTTT	TCACA A CTAC	AAGAATTGTG
UGT2B15	GT T TTCAAAAA	ATACATTTTG	GTCATATTTT	TCACA A TTAC	AAGAATTGTG
UGT2B17	TTGGGAATAT	TCTGACT A TA	AT A TA A AGCT	CTGT A AGAT	GCAGTTTTGA
UGT2B15	TTGGGAATAT	TATGACT A CA	GT A CA A AGCT	CTGT A AGAT	GCAGTTTTGA
UGT2B17	CA A AGAAACT	TATG A AAAA	CTACAAGAGT	CA A AA T TTGA	TGTC C TTCTG
UGT2B15	AT A AGAAACT	TATG A T G AAA	CTACAAGAGT	CA A AG T TTGA	TGTC A TTCTG
UGT2B17	GCAGATGCC G	TTAATCCCTG	TGGTGAGCT G	CTGGCTG A GC	TACTTAACAT
UGT2B15	GCAGATGCC C	TTAATCCCTG	TGGTGAGCT A	CTGGCTG A AC	TATTTAACAT
UGT2B17	ACCCTTTCTG	TACAGTCT C C	G C TTCTCTGT	TGGCTACACA	541G>T/A GTTGAGAAGA
UGT2B15	ACCCTTTCT I G	TACAGTCT T C	G A TTCTCTGT	TGGCTACACA	TTTGAGAAGA
UGT2B17	ATGGTGGAGG	ATTTCTGTTC	CCTCCTTCCT	ATGTACCTGT	TGTTATGTCA
UGT2B15	ATGGTGGAGG	ATTTCTGTTC	CCTCCTTCCT	ATGTACCTGT	TGTTATGTCA
UGT2B17	GAATTAAGTG	ATCAAATGAT	TTTCATGGAG	AGGATA A AAA	ATATGAT A TA
UGT2B15	GAATTAAGTG	ATCAAATGAT	TTTCATGGAG	AG G ATA A AAA	ATATGAT A CA
UGT2B17	TATGCTTTAT	TTTGACTTTT	GGTTTCA A GC	ATATGATCTG	AAGAAGTGGG
UGT2B15	TATGCTTTAT	TTTGACTTTT	GGTTTCA A AT	TTATGATCTG	AAGAAGTGGG
UGT2B17	ACCAGTTT T A	TAGTGAAGTT	CTAG		
UGT2B15	ACCAGTTT T A	TAGTGAAGTT	CTAG		

รูปที่ 1-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* ตำแหน่งที่มีการแปรหลัของเอกซอน 1 ถึง 6 (NCBI Reference Sequence: NG_017033.1 และ NG_052676.1) ตัวอักษรสีเขียวแสดงนิวคลีโอไทด์สามตัวแรกที่เริ่มกระบวนการแปรหลั ตัวอักษรสีแดงแสดงนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* และตัวอักษรสีม่วงแสดงการกลายพันธุ์ของยีนที่มีรายงานแล้ว (known SNPs)

Exon 2 (149 bps)

UGT2B17	GAAGACCCAC	TACATTATTT	GAGACAATGG	GGAAAGCTGA	AATGTGGCTC
UGT2B15	GAAGACCCAC	TACATTATTT	GAGACAATGG	GGAAAGCTGA	AATGTGGCTC
UGT2B17	ATTCGAACCT	ATTGGGATTT	TGAATTCCT	CGCCATTCT	TACCAAATGT
UGT2B15	ATTCGAACCT	ATTGGGATTT	TGAATTCCT	CGCCATTCT	TACCAAATGT
UGT2B17	TGATTTTGT	GGAGGACTTC	ACTGTAAACC	AGCCAAACCC	T TGCCTAAG
UGT2B15	TGATTTTGT	GGAGGACTTC	ACTGTAAACC	AGCCAAACCC	C TGCCTAAG

Exon 3 (132 bps)

UGT2B17	GAAATGGAAG	AGTTTGTGCA	GAGCTCTGGA	GAAAATGGTA	TTGTGGTGT
UGT2B15	GAAATGGAAG	AGTTTGTGCA	GAGCTCTGGA	GAAAATGGTA	TTGTGGTGT
UGT2B17	TTCTCTGGGG	TCGATGATCA	GTAACATGTC	AGAAGAAAGT	GCCAACATGA
UGT2B15	TTCTCTGGGG	TCGATGATCA	GTAACATGTC	AGAAGAAAGT	GCCAACATGA
UGT2B17	TTGCATCAGC	CCTTGCCCAG	ATCCCACAAA	AG	
UGT2B15	TTGCATCAGC	CCTTGCCCAG	ATCCCACAAA	AG	

Exon 4 (88 bps)

UGT2B17	GTTCTATGGA	GATTTGATGG	CAAGAAGCCA	AATACTTTAG	GTTCCAATAC
UGT2B15	GTTCTATGGA	GATTTGATGG	CAAGAAGCCA	AATACTTTAG	GTTCCAATAC
UGT2B17	TCGACTGTAT ^{1065T>C}	AAGTGTTAC	CCCAGAATGA	CCTTCTTG	
UGT2B15	TCGACTGTAC	AAGTGTTAC	CCCAGAATGA	CCTTCTTG	

Exon 5 (220 bps)

UGT2B17	GTCATCCCAA	AACCAAAGCT	TTTATAACTC	ATGGTGAAC	CAATGGCATC
UGT2B15	GTCATCCCAA	AACCAAAGCT	TTTATAACTC	ATGGTGAAC	CAATGGCATC
UGT2B17	TATGAGGC ^{1152A>G} A	TCTACCATGG	GATCCCTATG	GTGGGCATTC	CCTTGTTTGC
UGT2B15	TATGAGGC ^{GA}	TCTACCATGG	GATCCCTATG	GTGGGCATTC	CCTTGTTTGC
UGT2B17	GGATCAACAT	GATAACATTG	CTCACATGAA	AGCCAAGGGA	GCAGCCCTCA
UGT2B15	GGATCAACAT	GATAACATTG	CTCACATGAA	AGCCAAGGGA	GCAGCCCTCA
UGT2B17	GTGTGGACAT	CAGGACCATG	TCAAGTAGAG	ATTTGCTCAA	TGCATTGAAG
UGT2B15	GTGTGGACAT	CAGGACCATG	TCAAGTAGAG	ATTTGCTCAA	TGCATTGAAG
UGT2B17	TCAGTCATTA	ATGACCCTAT			
UGT2B15	TCAGTCATTA	ATGACCCTGT			

รูปที่ 1-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* ตำแหน่งที่มีการแปรหัสของ เอกซอน 1 ถึง 6 (NCBI Reference Sequence: NG_017033.1 และ NG_052676.1) ตัวอักษร สีแดงแสดงนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* และตัวอักษรสีม่วง แสดงการกลายพันธุ์ของยีนที่มีรายงานแล้ว (known SNPs) (ต่อ)

Exon 6 (280 bps)

UGT2B17	CTATAAAGAG	AATATCATGA	AATTATCAAG	^{1348C>T} AATT <u>C</u> ATCAT	GATCAACCGG
UGT2B15	CTATAAAGAG	AATGTCATGA	AATTATCAAG	AATTCATCAT	GACCAACCAA
UGT2B17	TGAAGCCCCT	GGATCGAGCA	GTCTTCTGGA	TTGAGTTTGT	CATGCGCCAT
UGT2B15	TGAAGCCCCT	GGATCGAGCA	GTCTTCTGGA	TTGAGTTTGT	CATGCGCCAC
UGT2B17	AAAGGAGCCA	AGCACCTTCG	GGTCGCAGCC	CACAACCTCA	CCTGGATCCA
UGT2B15	AAAGGAGCCA	AGCACCTTCG	AGTCGCAGCT	CACAACCTCA	CCTGGATCCA
UGT2B17	GTACCACTCT	TTGGATGTGA	TAGCATTCCCT	GCTGGCCTGC	GTGGCAACTA
UGT2B15	GTACCACTCT	TTGGATGTGA	TAGCATTCCCT	^{1498G>A} GCTG <u>G</u> CCTGC	GTGGCAACTG
UGT2B17	TGATATTTAT	GATCACAAAA	TGTTGCCTGT	TTTGTTCCTG	AAAGCTTGCC
UGT2B15	TGATATTTAT	CATCACAAAA	TTTGCCTGT	TTTGTTCCTG	AAAGCTTGCC
UGT2B17	AAAA C AGGAA	AGAAGAAGAA	AAG G GATTAG		
UGT2B15	^{1568A>C} AAAA <u>A</u> AGGAA	AGAAGAAGAA	AAG A GATTAG		

รูปที่ 1-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* ตำแหน่งที่มีการแปรหัสของ เอกซอน 1 ถึง 6 (NCBI Reference Sequence: NG_017033.1 และ NG_052676.1) ตัวอักษร สีแดงแสดงนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* และตัวอักษรสีม่วง แสดงการกลายพันธุ์ของยีนที่มีรายงานแล้ว (known SNPs) (ต่อ)

	Exon1				
UGT2B17	M SL KW MS VFL	LMQLSCYFSS	GSCGKVLVWP	TEYSHWINMK	TILEELVQRG
UGT2B15	M SL KW TS VFL	LIQLSCYFSS	GSCGKVLVWP	TEYSHWINMK	TILEELVQRG
UGT2B17	HEVIVLTSSA	SILVNASKSS	AIKLEVYPTS	LTKNDLEDF	MKMFDRWTYS
UGT2B15	HEVTVLTSSA	STLVNASKSS	AIKLEVYPTS	LTKNYLEDSL	LKILDRWIYG
UGT2B17	ISKNTFWSYF	SQLQELCWEY	SDYNIKLCED	AVLNKKLMRK	LQESKFDVLL
UGT2B15	VSKNTFWSYF	SQLQELCWEY	YDYSNKLCKD	AVLNKKLMMK	LQESKFDVIL
UGT2B17	ADAVNPCGEL	LAELLNIPFL	YSLRFSVGYT	VEKNGGGFLF	PPSYVPVMS
UGT2B15	ADALNPCGEL	LAELFNIPFL	YSLRFSVGYT	FEKNGGGFLF	PPSYVPVMS
UGT2B17	ELSDQMIFME	RIKNMYMLY	FDWFQAYDL	KKWDQFYSEV	LGRPTTLFET
UGT2B15	ELSDQMIFME	RIKNMHMLY	FDWFQIYDL	KKWDQFYSEV	LGRPTTLFET
UGT2B17	MGKAEMWLIR	TYWDFEFPRP	FLPNVDFVGG	LHCKPAKPLP	KEMEEFVQSS
UGT2B15	MGKAEMWLIR	TYWDFEFPRP	FLPNVDFVGG	LHCKPAKPLP	KEMEEFVQSS
UGT2B17	GENGIVVFSL	GSMISNMSEE	SANMIASALA	QIPQKVLRWF	DGKKPNTLGS
UGT2B15	GENGIVVFSL	GSMISNMSEE	SANMIASALA	QIPQKVLWRF	DGKKPNTLGS
UGT2B17	NTRLYKWLPQ	NDLLGHPKTK	AFITHGGTNG	IYEAIYHGIP	MVGIPLFADQ
UGT2B15	NTRLYKWLPQ	NDLLGHPKTK	AFITHGGTNG	IYEAIYHGIP	MVGIPLFADQ
UGT2B17	HDNIAHMKAK	GAALSVDIRT	MSSRDLLNAL	KSVINDPIYK	ENIMKLSRIH
UGT2B15	HDNIAHMKAK	GAALSVDIRT	MSSRDLLNAL	KSVINDPVYK	ENVMKLSRIH
UGT2B17	HDQPVKPLDR	AVFWIEFVMR	HKGAKHLRVA	AHNLTWIQYH	SLDVIAFLA
UGT2B15	HDQPMKPLDR	AVFWIEFVMR	HKGAKHLRVA	AHNLTWIQYH	SLDVIAFLA
UGT2B17	CVATMIFMIT	KCCLFCFRKL	AKTGKKKKRD		
UGT2B15	CVATVIFIIT	KFCLFCFRKL	AKKGKKKKRD		

รูปที่ 1-8 กรดอะมิโนที่ถูกถอดรหัสมาจาก *UGT2B17* และ *UGT2B15* (UniProt 1998, 2011)
ตัวอักษรสีแดงแสดงกรดอะมิโนที่แตกต่างกันระหว่าง *UGT2B17* และ *UGT2B15*

6. สับสเตรทของเอนไซม์ UGT2B17 และ UGT2B15

จากการรวบรวมข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับสับสเตรทของเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ทำให้สามารถยกตัวอย่างสับสเตรทของเอนไซม์ UGT2B17 และ UGT2B15 ดังตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1-2 สับสเตรทของเอนไซม์ UGT2B17 และ UGT2B15

เอนไซม์	สับสเตรท	อ้างอิง
UGT2B17	3-alpha-diol (3-alpha-androstanediol)	(Beaulieu et al. 1996)
	4-methylumbelliferone Eugenol	
	4-methylumbelliferone Umbelliferone Borneol Scopoletin Ibuprofen Anthraflavic acid Emodin Alizarin 7-hydroxyflavone Chrysin Galangin Naringin Menthol 4-ethyl phenol 4-propyl phenol 1-naphthol p-nitrophenol Phenol red	(Turgeon et al. 2003)
	Nicotine-derived tobacco-specific nitrosamine (NNK)	
Vorinostat	(Bock 2015)	
	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol	(Yang et al. 2017)

ตารางที่ 1-2 สับสเตรทของเอนไซม์ UGT2B17 และ UGT2B15 (ต่อ)

เอนไซม์	สับสเตรท	อ้างอิง
UGT2B17	Steroid hormone (androgen) Dihydrotestosterone Testosterone	(Mouritsen et al. 2018)
	5-alpha-dihydrotestosterone Androsterone Etiocholanolone	(Zhang et al. 2018)
	17-Dihydroexemestane Diclofenac Edaravone Eslicarbazepine Gemfibrozil 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine	(Meech et al. 2019)
UGT2B15	Dihydrotestosterone 3-alpha-diol (3 alpha-androstanediol)	(Turgeon et al. 2000)
	Bisphenol A (BPA)	(Divakaran, Hines, and McCarver 2014)
	Lorazepam S-Oxazepam S-Lorazepam Paracetamol	(Yang et al. 2017)
	3,4-Methylenedioxymethamphetamine 3-OH-desloratadine Acetaminophen Dabigatran (thrombin inhibitor) Ethanol Ezetimibe Lorcaserin Phenytoin (anticonvulsant) Rofecoxib Sipoglitazar (anti-diabetic PPAR agonist)	(Meech et al. 2019)

สำหรับสับสเตรทที่ใช้เป็นยาในการรักษาโรคต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่

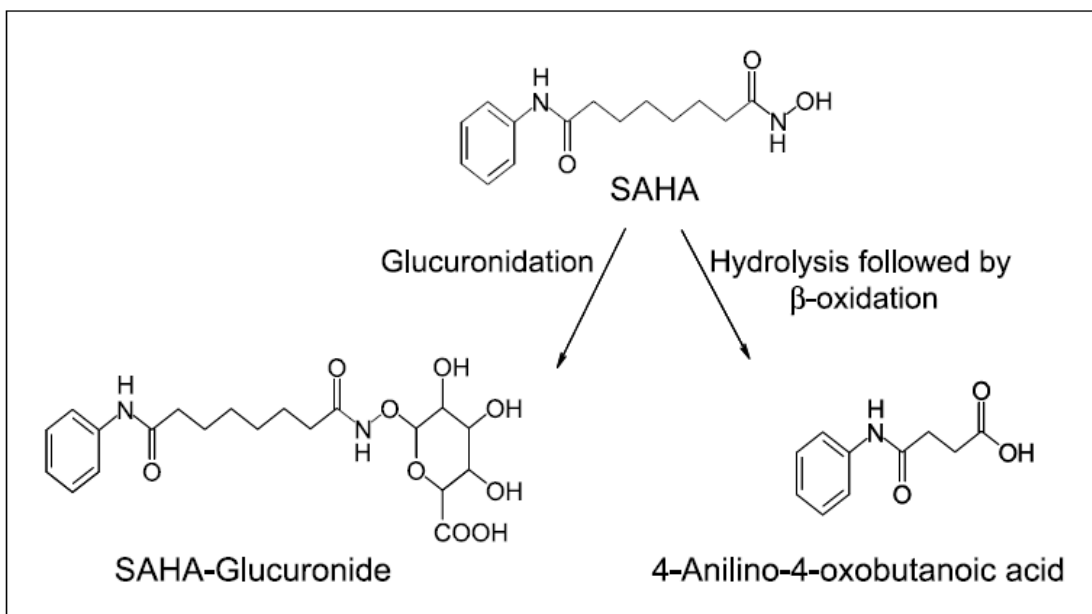
6.1 Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid; SAHA)

เป็นยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด cutaneous T-cell (cutaneous T-cell lymphoma; CTCL) ให้ทางปาก ขนาด 200-600 mg ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฮิสโตนดีแอเซทิลเลส (histone deacetylases; HDAC) 1, 2 และ 3 (class I) และ 6 (class II) มีค่า $IC_{50} < 86$ nM ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะดึงหมู่ acetyl ออกจาก lysine residues ของโปรตีนฮิสโตน ในมะเร็งบางชนิดจะมีการแสดงออกของ HDACs ที่มากเกินไปหรือเกิดความผิดปกติของ HDACs ต่อ oncogenic transcription factors ส่งผลให้เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้เร็วผิดปกติ ยาจะมีความสามารถในการจับกับโปรตีน 71% มีค่าครึ่งชีวิตอยู่ที่ 2 ชั่วโมง

วิถีหลักในการเมแทบอลิซึมของยาชนิดนี้คือการเกิดปฏิกิริยากกลูคูโรนิเดชันที่ตับประมาณ 45% โดยอาศัยเอนไซม์ UGT2B17 เป็นเอนไซม์หลัก และอาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ตามด้วย β -oxidation ได้สารเมแทบอลิท์ (metabolites) 2 ชนิด คือ O-glucuronide และ 4-anilino-4-oxobutanoic acid (รูปที่ 1-9) ซึ่งสารสองชนิดนี้จะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาลดลง และจะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ

อาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้ยา vorinostat จะพบเมื่อได้รับปริมาณยามากกว่า 400 mg ต่อวัน โดยอาการไม่พึงประสงค์ที่พบได้บ่อยจากการใช้ยาชนิดนี้ ได้แก่ อ่อนเพลีย ท้องเสีย คลื่นไส้ และอาเจียน นอกจากนี้ยังพบอาการไม่พึงประสงค์อื่น ๆ เช่น ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ ภาวะขาดน้ำ โรคลิ่มเลือดอุดตันในปอด และโลหิตจาง (Bubna 2015, DrugBank(a) 2019, Wong et al. 2011)

จากการศึกษาผลของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ต่อการเกิดปฏิกิริยากกลูคูโรนิเดชันของ vorinostat พบว่า ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีจีโนไทป์ของยีนแบบ *UGT2B17*2/*2* (homozygous deletion) จะทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากกลูคูโรนิเดชันของยา vorinostat ลดลงถึง 30 % เมื่อเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีจีโนไทป์ของยีนแบบ *UGT2B17*1/*1* (wild-type homozygotes) หรือ *UGT2B17*1/*2* (heterozygotes) ซึ่งประชากรชาวเอเชียโดยส่วนใหญ่มักพบจีโนไทป์ของยีนแบบ *UGT2B17*2/*2* ในขณะที่ชาว Caucasian จะพบจีโนไทป์ลักษณะนี้ได้น้อยกว่า ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องระมัดระวังถึงขนาดของยา และความเป็นพิษที่เกิดจากยาในผู้ป่วยมะเร็งชาวเอเชีย ในทางกลับกันพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* ไม่ได้ส่งผลต่อการเกิดสารเมแทบอลิท์ 4-Anilino-4-oxobutanoic acid (Wong et al. 2011)



รูปที่ 1-9 กระบวนการแปรรูปของยา vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid; SAHA) โดยจะอาศัยการเกิดปฏิกิริยาไกลคูโรนิเดชันประมาณ 45 % ซึ่งเอนไซม์หลักที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ ได้แก่ UGT2B17 ได้เป็น SAHA-Glucuronide อีกส่วนหนึ่งจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและ β -oxidation ได้เป็น 4-anilino-4-oxobutanoic acid (Balliet et al. 2009)

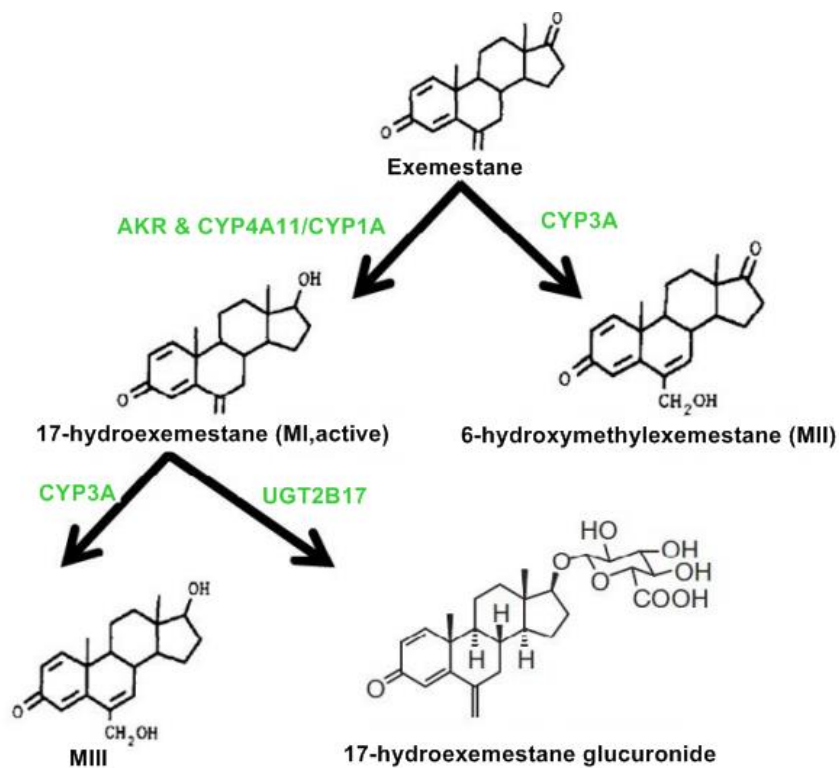
6.2 Exemestane (EXE)

Exemestane เป็น third-generation aromatase inhibitors ที่ใช้ในการป้องกันและรักษามะเร็งเต้านมในผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือน ยาจะเข้าไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ aromatase ยับยั้งการสังเคราะห์ estrone และ estradiol ซึ่งยาจะจับที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ ส่งผลให้มีเอสโตรเจนลดน้อยลง ยาชนิดนี้สามารถดูดซึมได้ 42% จับกับโปรตีน 90% และมีค่าครึ่งชีวิต 24 ชั่วโมง

หลังจากยา EXE ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย วิธีในการเกิดเมแทบอลิซึมของยาจะเกิดขึ้นที่ตับ โดยถูกแบ่งออกเป็น 2 วิธี วิธีแรกจะเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอาศัย CYP3A เป็นหลัก เกิดเป็น 6-hydroxymethylexemestane (MII) ในขณะที่วิธีที่ 2 จะเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดย aldoketoreductase (AKR) และ CYP4A11/CYP1A เกิดเป็น สารเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์เป็น active antiestrogenic และ androgenic เรียกว่า 17-hydroexemestane (MI) (17 β -DHE) ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ตัวหลักที่ได้จากปฏิกิริยาขั้นนี้ จากนั้น active metabolite ของยา EXE จะถูกทำให้หมดฤทธิ์โดย drug metabolizing enzyme 2 ตัว ได้แก่ CYP3A และ UGT2B17 เกิดเป็น MIII และ 17-hydroexemestane glucuronide (17 β -DHE-Gluc) ตามลำดับ เพื่อกำจัดออกนอกร่างกาย (รูปที่ 1-10)

อาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้ยา EXE ได้แก่ ภาวะกระดูกพรุน ปวดกระดูก และข้อต่อ ร้อนวูบวาบ อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ นอนไม่หลับ และมีเหงื่อออกมาก นอกจากนี้ในบางรายอาจพบอาการประสาทหลอน มีเนเวียนศีรษะ ผิวแห้ง และท้องเสีย

จากการศึกษาผลของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ต่อการเกิดปฏิกิริยาการกลูคูโรนิเดชันของยา EXE พบว่า ในผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ *UGT2B17* (*2/*2) จะมีระดับของ 17β-DHE-Gluc ในปัสสาวะและพลาสมาลดลง 39 และ 29 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์แบบ *UGT2B17* (*1/*1) ยิ่งไปกว่านั้นในผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็นแบบ *UGT2B17* (*2/*2) จะมีระดับของ 17β-DHE ในพลาสมาเพิ่มขึ้น 28% แต่เมื่อศึกษาผลกระทบต่อไปอีกเป็นเวลา 1 เดือนหลังจากได้รับยา EXE พบว่าจีโนไทป์ของ *UGT2B17* ไม่ได้มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดอาการปวดข้อหรือร้อนวูบวาบ ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจมีวิถีในการเมแทบอลิซึมยา EXE ทางอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง (Breastcancer.org 2019, DrugBank(b) 2019, Landry, David, and Zeruesenay 2014, Luo et al. 2018, Packard et al. 2018) จากงานวิจัยพบว่าการเกิดปฏิกิริยาการกลูคูโรนิเดชันของยา EXE นอกจากจะอาศัยเอนไซม์ *UGT2B17* เป็นเอนไซม์หลักในการเกิดปฏิกิริยาแล้วนั้น ยังอาศัยเอนไซม์ *UGT1A4*, *UGT1A8* และ *UGT1A10* เป็นเอนไซม์รองในการเกิดปฏิกิริยาการกลูคูโรนิเดชันของยา EXE (Chanawong et al. 2017)



รูปที่ 1-10 วิธีหลักในการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมใน phase I และ phase II ของยา exemestane (Landry, David, and Zeruesenay 2014)

6.3 แอนโดรเจน

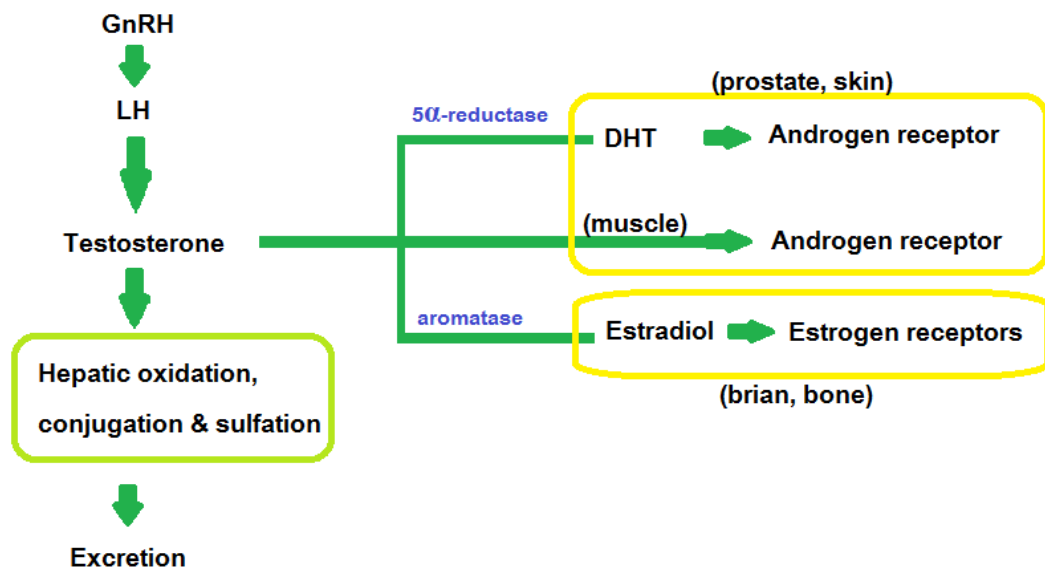
แอนโดรเจนจะมีบทบาทสำคัญทั้งในเพศชาย และเพศหญิง โดยในเพศชายจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเนื้อเยื่อและหน้าที่การทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศชาย เช่น ไขมัน และต่อมลูกหมาก testosterone เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนในกลุ่มแอนโดรเจน ในเพศชาย ฮอร์โมนชนิดนี้จะถูกสร้างที่เลดีกัยเซลล์ของอัณฑะ และส่งไปยังต่อมลูกหมาก ส่วนในเพศหญิง จะถูกสร้างที่รังไข่ ต่อมหมวกไต และเปลี่ยนแปลงมาจาก androstenedione ฮอร์โมน testosterone เป็นฮอร์โมนหลักในเพศชาย มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของร่างกาย เช่น ส่งเสริมและพัฒนาอวัยวะเพศชาย ความต้องการทางเพศ พลังงาน พัฒนา secondary sex characteristic (ลักษณะทางเพศหรือลักษณะทุติยภูมิทางเพศ) สร้างเสปิร์มโดยอัณฑะ และป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุน ในเพศชายที่มีอายุ 30 ปีขึ้นไป จะมีระดับของฮอร์โมน testosterone ลดลงเฉลี่ยปีละ 3.1 ถึง 3.5 nd/dL ซึ่งในผู้สูงวัยเพศชายอายุ 60 ถึง 80 ปี จะมีระดับของฮอร์โมน testosterone ผลิตจากเลดีกัยเซลล์ของอัณฑะอยู่ที่ 20-50% ภาวะฮอร์โมนเพศชายบกพร่องในชายสูงวัย (androgen deficiency) จะรักษาโดยการให้ testosterone จากภายนอก ส่งผลให้อาการเหนื่อยล้าดีขึ้น กล้ามเนื้อแข็งแรงขึ้น และพัฒนาทางด้านอารมณ์ให้ดีขึ้น การได้รับ testosterone ทางผิวหนังจะสามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ประมาณ 10% จับกับโปรตีนโกลบูลิน 40% ส่วนอีก 2% จะจับกับโปรตีนอัลบูมินหรืออื่น ๆ มีค่าครึ่งชีวิต 10-100 นาที

กลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน testosterone จะเริ่มจากการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ bioactive metabolites 2 ตัว ได้แก่ dihydrotestosterone (DHT) และ estradiol อาศัยเอนไซม์ 5 α -reductase (5-10%) และ aromatase (0.2%) ตามลำดับ โดย DHT และ testosterone จะเข้าจับและกระตุ้น androgen receptor (AR) ที่บริเวณเนื้อเยื่อของต่อมลูกหมาก ผิวหนัง และกล้ามเนื้อ ส่งผลให้เนื้อเยื่อบริเวณนี้มีการทำงานของแอนโดรเจนเพิ่มขึ้น ส่วน estradiol จะเข้าจับกับ estrogen receptors (ERs) ที่บริเวณสมองและกระดูก ฮอร์โมน testosterone ที่เหลือจากการถูกเปลี่ยนรูปเป็น bioactive metabolites จะถูกทำให้หมดฤทธิ์ลงโดยปฏิกิริยาการเมแทบอลิซึมที่ตับ phase I และ phase II โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน และการเกิดปฏิกิริยากลคูโรนิเดชันเพื่อขับออกนอกร่างกาย สำหรับ phase II ประมาณ 90% ของ testosterone จะเกิดปฏิกิริยากลคูโรนิเดชัน ได้เป็น testosterone glucuronide อาศัยเอนไซม์ UGT2B17 เป็นหลัก และมีเอนไซม์ UGT2B15 เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่รองลงมา นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยาซัลเฟชัน ได้เป็น testosterone sulfate เพื่อจ่ายต่อการกำจัดออกทางปัสสาวะ ส่วนอีก 6% จะถูกขับออกทางอุจจาระในรูปที่เป็น unconjugated form ในขณะที่ DHT จะสามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูป 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (3 α -DIOL), 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -DIOL) และ androsterone ซึ่งสารเมแทบอลิท์เหล่านี้จะไม่สามารถจับกับ AR ได้ แต่ในต่อมลูกหมาก 3 β -DIOL และ androsterone จะสามารถเปลี่ยนกลับไปอยู่ในรูปของ DHT ได้ DHT

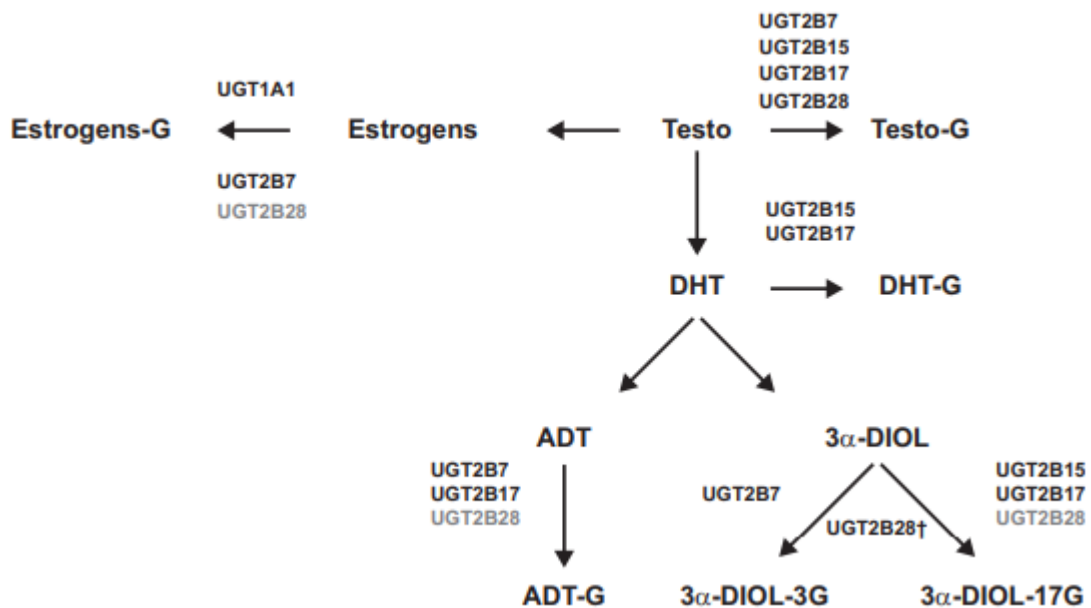
และ 3α -DIOL จะเกิดปฏิกิริยาไกลโคโรนเดชันโดยเอนไซม์ UGT2B17 เป็นหลัก และมี UGT2B15 เป็นเอนไซม์รอง ในขณะที่ androsterone จะอาศัยเอนไซม์ UGT2B17 แต่ไม่อาศัยเอนไซม์ UGT2B15 (รูปที่ 1-11 และ รูปที่ 1-12)

จากการศึกษา immunohistochemical ในต่อมลูกหมากพบว่า เอนไซม์ UGT2B15 จะพบการแสดงออกที่บริเวณ luminal cells ส่วน UGT2B17 จะพบการแสดงออกที่ basal cells ฮอโมน testosterone จะเปลี่ยนเป็น DHT บริเวณ basal cells จากนั้น DHT จะถูกส่งไปยัง luminal cells เพื่อจับกับ AR ซึ่ง DHT จะถูกเมแทบอลิซึมเป็น androsterone, 3α -DIOL และ 3β -DIOL ในทั้งสองเซลล์ เอนไซม์ UGT2B17 ที่พบบริเวณ basal cells จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาควบจับของ testosterone และ DHT ในขณะที่เอนไซม์ UGT2B15 บริเวณ luminal cells จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาควบจับและกำจัด 3α -DIOL เพื่อป้องกันการเปลี่ยนกลับเป็น DHT (รูปที่ 1-13) (Meech et al. 2019)

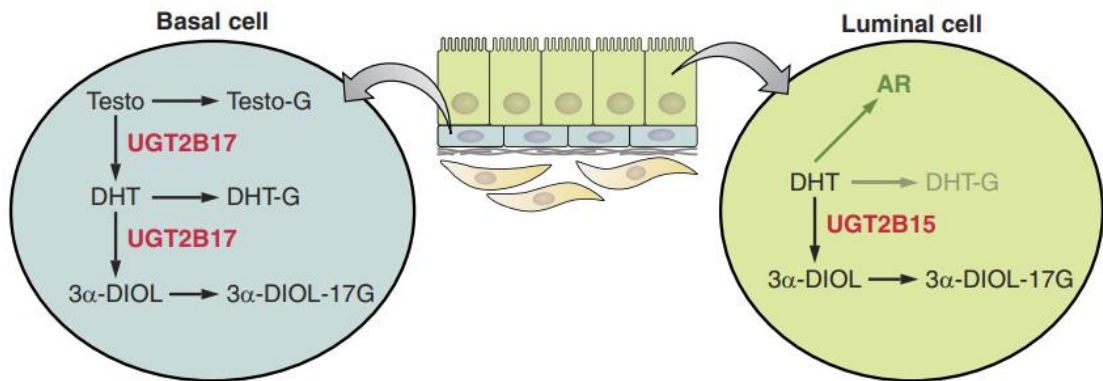
อาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการได้รับ testosterone ได้แก่ เป็นสิ่ว หายใจติดขัดขณะนอนหลับ เต้านมขยายขนาด หรือข้อเท้าบวม (Cheetham et al. 2017, DrugBank(c) 2019, Handelsman 2000, HarvardHealthPublishing 2018, Mouritsen et al. 2018, Zhang et al. 2018)



รูปที่ 1-11 วิธีหลักในการทำงานและเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของ testosterone ดัดแปลงจาก: (Handelsman 2000)



รูปที่ 1-12 วิธีหลักในการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของแอนโดรเจนโดยอาศัยเอนไซม์ UGTs โดยฮอร์โมน testosterone จะถูกเปลี่ยนเป็น dihydrotestosterone (DHT) ด้วยเอนไซม์ 5 α -reductase ในต่อมลูกหมาก จากนั้น DHT จะเปลี่ยนไปเป็น 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (3 α -DIOL) และ 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (3 β -DIOL) (ไม่แสดง) โดยอาศัยเอนไซม์ aldoketo reductases นอกจากนี้ DHT ยังสามารถเปลี่ยนเป็น androsterone (ADT) ซึ่ง testosterone, DHT และ 3 α -DIOL จะเกิดปฏิกิริยาการกลูคูโรนิเดชันโดยอาศัยเอนไซม์ UGT2B17 (เอนไซม์หลัก) และ UGT2B15 (เอนไซม์รอง) เกิดเป็น testosterone glucuronide (Testo-G), DHT-glucuronide (DHT-G), and 3 α -diol-17-glucuronide (3 α -DIOL-17G) ในขณะที่ ADT-glucuronide (ADT-G) จะอาศัยเอนไซม์ UGT2B17 (เอนไซม์หลัก) และ UGT2B7 (เอนไซม์รอง) นอกจากนี้ยังพบว่า UGT2B28 สามารถเกิดปฏิกิริยาควบจับกับ testosterone, ADT และ 3 α -DIOL ได้ แต่จะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าเอนไซม์ UGT2B17 และ UGT2B15 (Meech et al. 2019)



รูปที่ 1-13 การแสดงออกและบทบาทของเอนไซม์ UGT2B17 และ UGT2B15 ในต่อมลูกหมาก โดยเอนไซม์ UGT2B17 จะพบการแสดงออกที่บริเวณ basal cell ของต่อมลูกหมาก ในขณะที่เอนไซม์ UGT2B15 จะพบการแสดงออกที่ luminal cell ของต่อมลูกหมาก (Meech et al. 2019)

7. Single nucleotide polymorphisms (SNPs)

ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตจะประกอบไปด้วยเบส 2 กลุ่ม 4 ชนิด คือ กลุ่มพิวรีน (purine) ได้แก่ อะดีนีน (A) และกวานีน (G) กับกลุ่มไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ ไซโทซีน (C) และไทมีน (T) ซึ่งโดยปกติแล้วสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีการเรียงตัวของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอแทบจะคล้ายคลึงกัน แต่อาจมีบางตำแหน่งที่พบลำดับเบสแตกต่างกันไป ซึ่งเกิดจากการแทนที่คู่เบส (base-pair substitution)

สไนป์ส์ (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) คือ การแปรผันของลำดับดีเอ็นเอชนิดหนึ่ง ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของเบสบนสายนิวคลีโอไทด์ ส่งผลให้เกิดความแตกต่างจากสายนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในสปีชีส์เดียวกัน หรือต่างจากโครโมโซมอีกแห่งของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ในประชากรหนึ่ง ๆ หากพบว่าตำแหน่งของเบส 1 เบสถูกแทนที่ที่บริเวณเดียวกันบนสายดีเอ็นเอมากกว่าร้อยละ 1 ของจำนวนประชากร และไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติใด ๆ ในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น จะจัดว่าเป็น SNPs ซึ่งจัดเป็นความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) รูปแบบหนึ่ง แต่หากประชากรเหล่านั้นมีตำแหน่งของเบสถูกแทนที่ 1 ตำแหน่ง น้อยกว่าร้อยละ 1 ของจำนวนประชากร และก่อให้เกิดความผิดปกติในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น จะจัดว่าเป็นการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) SNPs จะถูกถ่ายทอดทางพันธุกรรมตามกฎของเมนเดล ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้เองที่จะทำให้มนุษย์แต่ละคนมีความแตกต่างกัน เช่น สีผิว ส่วนสูง การเกิดโรค และความรุนแรงต่อการตอบสนองต่อยารักษาโรค เป็นต้น ดังนั้น SNPs จึงถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยโรค การพัฒนา

การทำนายผลของยารวมถึงการเลือกใช้ยาและวิธีให้การรักษาโดยกำหนดขนาดยาที่เหมาะสมต่อบุคคลนั้น (personalized medicine) (ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์ 2555)

8. การกลายพันธุ์ (mutation)

การกลายพันธุ์ คือ การที่ลำดับหรือจำนวนของเบสในสายดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมขึ้นในกลุ่มประชากรเมื่อมีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมที่มีการแปรผันนี้ไปยังรุ่นถัดไป ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์อาจเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรือเกิดจากการชักนำของสารก่อการกลายพันธุ์ เช่น รังสี อุณหภูมิ และสารเคมี เป็นต้น (นันทวัน นันทวนิช และคณะ ม.ป.ป.)

รูปแบบของการกลายพันธุ์แบ่งได้ 2 รูปแบบ คือ

8.1 การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (chromosomal mutation) แบ่งได้ 2 แบบ คือ

8.1.1 จำนวนโครโมโซมเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยอาจมีจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มมากขึ้นหรือลดลงไปจากจำนวนปกติ เกิดได้ 2 ลักษณะ

8.1.1.1 Aneuploidy คือการที่โครโมโซมมีจำนวนที่เพิ่มหรือลดลงผิดปกติไปจากเดิม 1 หรือมากกว่า 1 โครโมโซม ($2n \pm 1$ หรือ $n \pm 2$) ซึ่งเกิดขึ้นจากความผิดปกติในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เช่น การมีโครโมโซมคู่ที่ 21 เกิดมา 1 เส้น ส่งผลให้เกิดกลุ่มอาการดาวน์

8.1.1.2 Euploidy คือการเพิ่มหรือลดโครโมโซมเป็นชุด ($2n \pm n$ หรือ $2n \pm 2n$) มันเกิดขึ้นในพืช

8.1.2 การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และโครงสร้างภายในโครโมโซม ส่งผลให้ตำแหน่งยีนในโครโมโซมเกิดการเปลี่ยนแปลง สามารถแบ่งได้ 4 รูปแบบ

8.1.2.1 การขาดที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซมหายไป (deletion) ส่งผลให้ยีนขาดหายไปด้วย

8.1.2.2 การเพิ่มขึ้นมาของส่วนใดส่วนหนึ่งของโครโมโซม (duplication) ส่งผลให้ยีนเกิดการทํางานมากกว่าปกติเท่าตัว

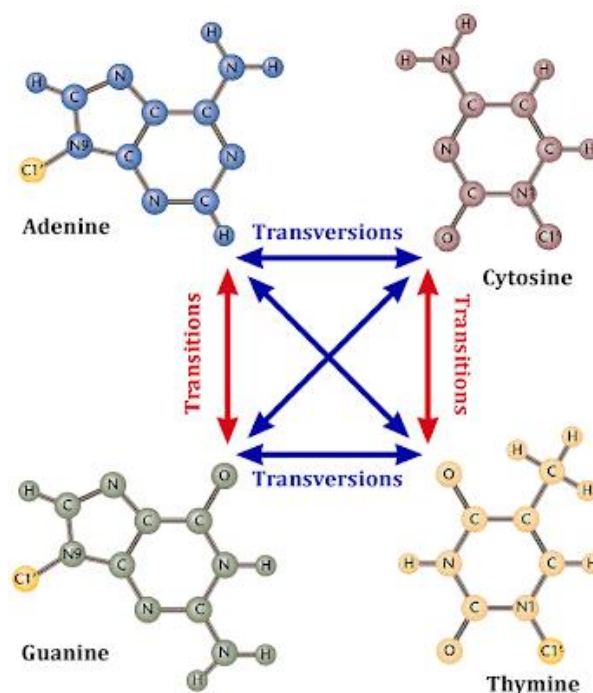
8.1.2.3 การเปลี่ยนทิศทาง (inversion) เป็นการที่ยีนภายในโครโมโซมเกิดการเปลี่ยนตำแหน่งกัน

8.1.2.4 การเปลี่ยนสลับที่ (translocation) เป็นการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมระหว่างโครโมโซมที่ไม่ได้เป็นโฮโมโลกัสต่อกัน (ZenInnovation 2018)

8.2 การกลายพันธุ์ระดับยีน (gene หรือ point mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอ หรืออาจเกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์หนึ่งด้วยอีกตัวหนึ่ง ส่งผลให้ยีนเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม แบ่งได้ 2 ชนิด คือ

8.2.1 การกลายพันธุ์แบบทรานสิชัน (transition mutation) เป็นการแทนที่เบสไพริมิดีนด้วยเบสไพริมิดีน หรือ เบสพิวรีนด้วยเบสพิวรีน

8.2.2 การกลายพันธุ์แบบทรานสเวอร์ชัน (transversion mutation) เป็นการแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสไพริมิดีน หรือเบสไพริมิดีนแทนที่ด้วยเบสพิวรีนดังรูปที่ 1-14 (ธีระชัย ฆานานันต์ 2545)



รูปที่ 1-14 การแทนที่นิวคลีโอไทด์แบบทรานสิชัน และทรานสเวอร์ชัน (Thomas 2013)

นอกจากนี้อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนเพิ่มขึ้น (insertion) หายไป (deletion) หรือเรียงลำดับกลับทิศทาง (inversion) ซึ่งจะส่งผลต่อลำดับของกรดอะมิโนในสายโพลีเพปไทด์เส้นนั้น ๆ สามารถแบ่งออกได้ 5 ประเภท ดังนี้

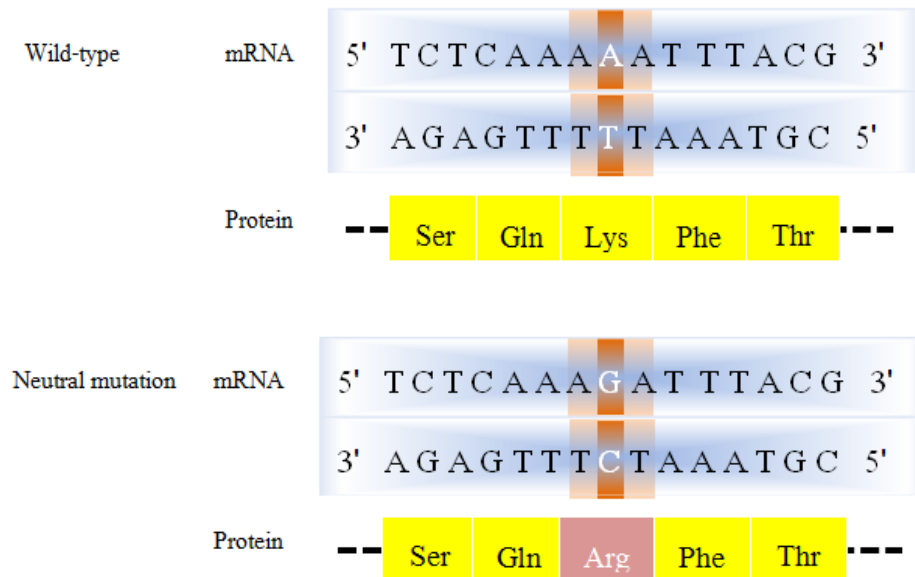
1. Neutral mutation คือการที่นิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในสาย mRNA ด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโน แต่ไม่ส่งผลต่อหน้าที่ของโปรตีน เช่น การเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมจาก 5'-AAA-3' เป็น 5'-AGA-3' ทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนจากไลซีน (lysine) เป็นอาร์จินีน (arginine) ซึ่งทั้งไลซีน และอาร์จินีนเป็นกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบสเหมือนกัน จึงไม่ส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน ดังรูปที่ 1-15

2. Missense mutation หรือ nonsynonymous mutation คือการที่นิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในสาย mRNA ด้วย ซึ่งจะทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโน และส่งผลกระทบต่อฟีโนไทป์ เช่น การเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมจาก 5'-AAA-3' เป็น 5'-GAA-3' ทำให้เกิดการแทนที่ของกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ด้วยกรดกลูตามิก (glutamic acid) หากการกลายพันธุ์ในรูปแบบนี้เกิดขึ้นที่โคดอน (codon) ที่ 6 ของยีนที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์เบตาโกลบิน (β -globin) ในมนุษย์ จะส่งผลให้บุคคลนั้นเกิดโรค sickle cell anemia หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “โรคโลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงรูปเคียว” จะเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพไฮโมไซกัส ดังรูปที่ 1-16

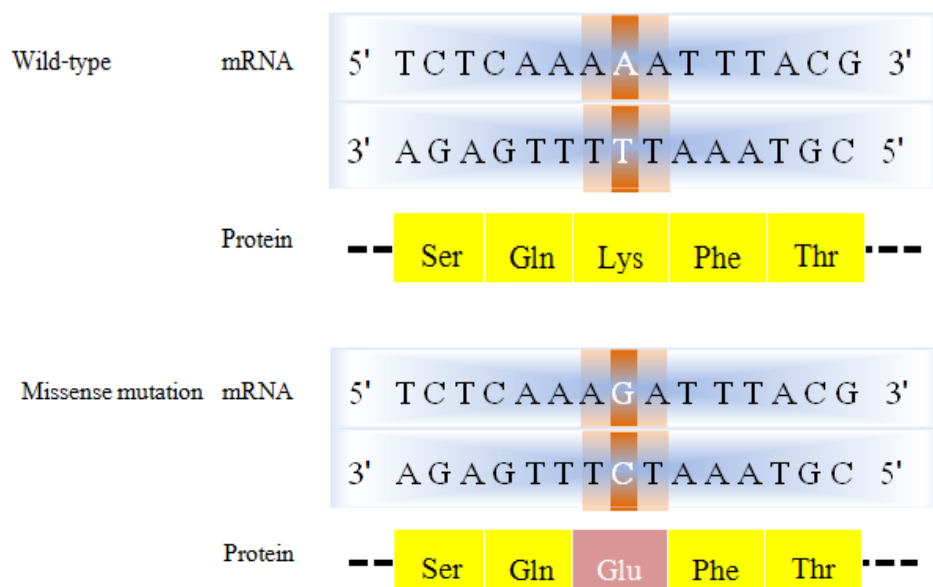
3. Silent mutation หรือ synonymous mutation คือการที่นิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในสาย mRNA ด้วย แต่กรดอะมิโนที่ได้หลังจากกระบวนการแปลรหัส (translation) ยังคงเป็นตัวเดิม เช่น การเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมจาก 5'-AAA-3' เป็น 5'-AAC-3' ซึ่งยังแปลรหัสออกมาเป็นกรดอะมิโนไลซีนดังเดิมดังรูปที่ 1-17

4. Nonsense mutation คือการที่นิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในสาย mRNA ด้วย ทำให้รหัสพันธุกรรมที่ได้หลังจากกระบวนการแปลรหัสกลายเป็นรหัสหยุด (stop codon) ได้แก่ UAA UAG และ UGA เช่น การเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมจาก 5'-AAA-3' เป็น 5'-UAA-3' ซึ่งเป็นรหัสหยุดการสังเคราะห์สายโพลีเพปไทด์ ดังนั้นสายโพลีเพปไทด์ที่ได้จึงไม่สมบูรณ์ และไม่สามารถทำหน้าที่ของโปรตีนชนิดนั้น ๆ ได้ ดังรูปที่ 1-18

5. Frameshift mutation คือการที่นิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยอาจเกิดจากการที่นิวคลีโอไทด์ 1 คู่เบสเกิดการเพิ่มขึ้น หรือหายไป ซึ่งจะส่งผลต่อรหัสพันธุกรรม ทำให้การแปลรหัสของรหัสพันธุกรรมบนสาย mRNA เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลให้สายโพลีเพปไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้นอาจจะสั้นลง หรือยาวขึ้น เนื่องจากอาจแปลรหัสพบรหัสหยุด หรือรหัสพันธุกรรมอื่น ๆ ได้ ดังรูปที่ 1-19 (ธีระชัย ธานานันต์ 2545)



รูปที่ 1-15 Neutral mutation : เบสเปลี่ยนจาก A เป็น G ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจากไลซีน เป็นอาร์จินีน แต่ไม่ส่งผลต่อการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ เนื่องจากไลซีนและอาร์จินีนมีคุณสมบัติเป็นเบสเหมือนกัน ดัดแปลงจาก: (Russell 2009)



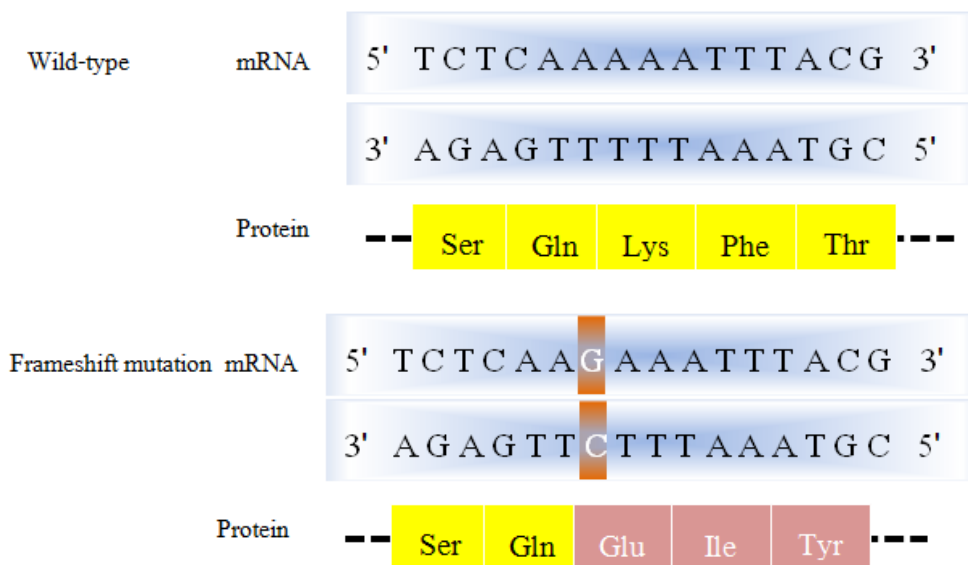
รูปที่ 1-16 Missense mutation : เบสเปลี่ยนจาก A เป็น G ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจากไลซีน เป็นกรดกลูตามิก และส่งผลกระทบต่อฟีโนไทป์ ดัดแปลงจาก: (Russell 2009)



รูปที่ 1-17 Silent mutation : เบสเปลี่ยนจาก A เป็น G แต่แปลรหัสออกมาได้กรดอะมิโนเป็นไลซีนดั้งเดิม ดัดแปลงจาก: (Russell 2009)



รูปที่ 1-18 Nonsense mutation : เบสเปลี่ยนแปลงจาก A เป็น T เมื่อแปลรหัสออกมาได้เป็นรหัสหยุด (stop codon) ดัดแปลงจาก: (Russell 2009)



รูปที่ 1-19 Frameshift mutation : นิวคลีโอไทด์ 1 คู่เบสเกิดการเพิ่มขึ้น หรือหายไป ทำให้การแปลรหัสของรหัสพันธุกรรมบนสาย mRNA เปลี่ยนแปลง ดัดแปลงจาก: (Russell 2009)

9. รายงานการเกิด *UGT2B17* polymorphism

ปัจจุบันพบรายงานการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ทั้งสิ้น 2 variant alleles ดังแสดงในตารางที่ 1-3 และพบการเกิด SNPs บน เอกซอน 1-6 ทั้งสิ้น 6 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 1-4 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงความถี่ในการพบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ในกลุ่มประชากร รวมถึงศึกษาผลของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ต่อการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก และต่อกระบวนการกลูคูโรนิเดชันของยาชนิดต่าง ๆ ดังนี้

1) Park และคณะ (2006) ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* แบบ deletion กับการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากจำนวน 420 ราย แบ่งเป็นชาว Caucasians 293 ราย และชาว African American 127 ราย พบว่าความถี่จีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* แบบ deletion ในผู้ป่วยมะเร็งชาว Caucasians และชาว African American เท่ากับ 0.11 และ 0.12 ตามลำดับ และพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* แบบ deletion จะสัมพันธ์กันกับความถี่ในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (odds ratio (OR) = 1.7; 95% confidence interval (95% CI) = 1.2-2.6) และในชาว Caucasians ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* แบบ deletion จะสัมพันธ์กันกับความถี่ของการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากที่เพิ่มมากขึ้น (OR = 1.9; 95% CI = 1.2-3.0) ซึ่งจะไม่เกิดความสัมพันธ์

เช่นเดียวกันนี้ในชาว African American American (OR = 1.3; 95% CI = 0.6-2.7) (Park et al. 2006)

2) Karypidis และคณะ (2008) กล่าวว่า UGT2B17 เป็นเอนไซม์หลักที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของแอนโดรเจนในปฏิกิริยาไกลูคูโรนิเดชัน สามารถพบ UGT2B17 ได้มากบริเวณต่อมลูกหมาก และค้นพบว่าการกลายพันธุ์แบบ deletion ของยีน *UGT2B17* มีความเกี่ยวข้องกับการลดน้อยลงของระดับเทสโทสเตอโรนรูป conjugation form ในปัสสาวะ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* ต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยจะศึกษาการแสดงออกของพีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ deletion ด้วยการวัดปริมาณการแสดงออกของ *UGT2B17* mRNA ในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากที่มีความปกติของแต่ละบุคคลซึ่งมีจีโนไทป์แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังศึกษาความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ deletion ในประชากรชาวสวีเดนทั้งหมด 337 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก 176 ราย (อายุ 51-79 ปี) และอีก 161 ราย (อายุ 50-59, 60-69 และ 70-79 ปี) เป็นกลุ่มควบคุม พบว่า *UGT2B17* mRNA บริเวณเนื้อเยื่อต่อมลูกหมาก มีการแสดงออกของ homozygous insertion allele (ins/ins) มากกว่า heterozygotes (del/ins) ถึง 30 เท่า อาสาสมัครที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแบบ deletion จะไปเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 2.05; 95% CI = 1.32-3.25) สรุปได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ deletion นั้นมีความสัมพันธ์กันกับความเสี่ยงในการเกิดเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก (Karypidis et al. 2008)

3) Urashima และคณะ (2015) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* แบบ deletion ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งบริเวณ upper aerodigestive tract ของชาวญี่ปุ่น เนื่องจากเอนไซม์ UGT2B17 เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไกลูคูโรนิเดชันของสารก่อมะเร็งที่พบในควันบุหรี่ และเอทานอลในแอลกอฮอล์ที่ใช้สำหรับดื่ม โดยบุหรี่และแอลกอฮอล์จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งบริเวณ upper aerodigestive tract ที่สำคัญ เพราะเยื่อเมือกบริเวณนั้นจะสัมผัสกับปัจจัยเสี่ยงโดยตรงจากการสูบบุหรี่ หรือดื่มแอลกอฮอล์ จากการศึกษาผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นจำนวน 3,092 ราย พบว่าในผู้ป่วยที่ไม่ได้ป่วยเป็นโรคมะเร็งจะตรวจพบยีน *UGT2B17*-deletion 74% ส่วนผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรคมะเร็งจะตรวจพบยีน *UGT2B17*-deletion 77% และเมื่อตรวจโดยตัดแยกมะเร็งแต่ละประเภทจะพบว่า *UGT2B17*-deletion จะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งบริเวณ upper aerodigestive tract อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (OR = 2.07; 95% CI = 1.34-3.20) เนื่องจากการพบ *UGT2B17*-deletion จะส่งผลต่อการกำจัดสารก่อมะเร็ง และเอทานอลโดยปฏิกิริยาไกลูคูโรนิเดชันลดน้อยลง เกิดความเป็นพิษของสับสเตรทเพิ่มขึ้น ในทางกลับกันพบว่า *UGT2B17*

deletion ไม่ได้เป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดมะเร็งประเภทอื่น ๆ ของการศึกษา (Urashima et al. 2015)

4) Luo และคณะ (2018) สนใจยา exemestane (EXE) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเต้านมในผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือน ผลข้างเคียงจากการใช้ยาก่อนข้างรุนแรง คือ มีอาการง่วงซึม เกิดการอักเสบของตับ และทำให้ผิวหนังเปลี่ยนเป็นสีเหลือง โดย UGT2B17 จัดเป็นเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา EXE ดังนั้นงานวิจัยของลูโอ และคณะนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *UGT2B17* ที่มีต่อยา EXE โดยการวัดระดับของ 17 β -DHE-Gluc และ 17 β -DHE ทั้งในปัสสาวะ และพลาสมาของผู้ป่วยที่ได้รับยา EXE จากการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือนชาว Caucasian ที่เป็นผู้ป่วยมะเร็งเต้านมชนิด estrogen-receptor-positive (ER+) และได้รับยา EXE ปริมาณ 25 mg ทุกวัน จะพบจีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* ดังนี้ จากกลุ่มตัวอย่าง 35 คน (37%) พบการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ *UGT2B17* (*1/*1) จากกลุ่มตัวอย่าง 1 คน (1%) พบการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ *UGT2B17* (*1/*3) จากกลุ่มตัวอย่าง 44 คน (46%) พบการแสดงออกของจีโนไทป์เป็น heterozygous แบบ *UGT2B17* (*1/*2) และจากกลุ่มตัวอย่าง 16 คน (17%) พบการแสดงออกของ จีโนไทป์แบบ *UGT2B17* null (*2/*2) และพบว่าระดับของ creatinine-adjusted 17 β -DHE-Gluc ในปัสสาวะของกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ *UGT2B17* (*2/*2) จะลดลง 39 เท่า ($P < 0.0001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ *UGT2B17* (*1/*1) และระดับของ 17 β -DHE-Gluc ในพลาสมาของกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ *UGT2B17* (*2/*2) จะลดลง 29 เท่า ($P < 0.0001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ *UGT2B17* (*1/*1) สรุปรูป *UGT2B17* จัดเป็นเอนไซม์หลักที่ส่งผลต่อการสร้าง 17 β -DHE-Gluc และจีโนไทป์ที่แตกต่างกันของ *UGT2B17* มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับ 17 β -DHE ในพลาสมาของผู้หญิงที่ได้รับยา EXE (Luo et al. 2018)

5) Mouritsen และคณะ (2018) ตั้งสมมติฐานของงานวิจัยว่าเด็กผู้ชายที่มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากลูกูโรนิเดชันลดลงนั้นอาจจะไปเปลี่ยนแปลงหน้าที่และการขับออกของแอนโดรเจน ซึ่งจะส่งผลต่อการเข้าสู่ช่วงวัยรุ่นที่ขึ้นกับ testosterone เด็กผู้ชาย 668 คน ช่วงอายุ 6.1-21.9 ปี จะเข้าร่วมในการศึกษา cross-sectional COPENHAGEN Puberty Study โดยจะมีเด็กผู้ชาย 65 คนที่ได้รับการติดตามทุก ๆ 6 เดือน เป็นเวลา 5 ปี ระยะการเข้าสู่วัยรุ่นจะประเมินโดยวิธีการทางคลินิก ประกอบด้วยการใช้ลูกประคำไข การวัดระยะของ pubic hair และการวัดระดับฮอร์โมนที่ใช้ในการสืบพันธุ์ในซีรัม (follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E2), testosterone (T), dehydroepiandrosterone (DHEAS), androstenedione (adione) และ sex hormone binding globulin (SHBG)) อาสาสมัครจะถูกตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* โดยเทคนิค quantitative PCR และใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ

ต่อ *UGT2B17* จากผลการศึกษาแบบ cross-sectional พบว่าเด็กผู้ชายประมาณ 1 ใน 10 จะมีการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ del/del จำนวน 59 คนจาก 668 คน คิดเป็น 8.8% และ 6 คนจาก 65 คนในการศึกษาแบบ longitudinal study (9.2%) มีการกลายพันธุ์ของยีนแบบ homozygous deletion (del/del) ซึ่งจะมีอายุเฉลี่ยของการเข้าสู่วัยรุ่นอยู่ที่ 12.73 ปี เมื่อเทียบกับเด็กที่มีการกลายพันธุ์ของยีนแบบ heterozygous deletion (del/ins) ที่มีอายุเฉลี่ยของการเข้าสู่วัยรุ่นอยู่ที่ 12.40 ปี และในเด็กที่มีจีโนมไทป์เป็นแบบ wild-type (ins/ins) จะมีอายุเฉลี่ยของการเข้าสู่วัยรุ่นอยู่ที่ 12.06 ปี และพบว่าระดับฮอร์โมน FSH, E2, LH, T, SHBG, DHEAS หรือ andione จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สรุปว่าความหลากหลายของยีน *UGT2B17* อาจจะมีผลกระทบต่อระยะเวลาในการเข้าสู่วัยรุ่นของเพศชายซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ (Mouritsen et al. 2018)

6) Zhang และคณะ (2018) ทำการศึกษาเพื่อตรวจสอบปริมาณและการทำงานของเอนไซม์ *UGT2B17* และ *UGT2B15* ในการเกิดปฏิกิริยาการกลูคูโรนิเดชันของ testosterone ในตับ และลำไส้ของมนุษย์ โดยวิธี LC-MS/MS พบว่าปริมาณของเอนไซม์ *UGT2B17* ใน microsomes ของตับ ($n = 26$) มีความหลากหลายระหว่างบุคคลมากกว่า 160 เท่า ($\bar{X} \pm SD$, 1.7 ± 2.7 pmol/mg microsomal protein) ในขณะที่ปริมาณของเอนไซม์ *UGT2B15* มีความหลากหลายน้อยกว่า 4 เท่า ($\bar{X} \pm SD$) 30.9 ± 8.8 pmol/mg microsomal protein นอกจากนี้ปริมาณของเอนไซม์ *UGT2B17* มีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ในการเกิดปฏิกิริยาการกลูคูโรนิเดชันของ testosterone ($r^2 = 0.77$, $p < 0.001$) ปริมาณของเอนไซม์ *UGT2B17* ใน microsomes ของลำไส้เล็ก ($n = 6$) พบว่ามีค่าเฉลี่ยสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (7.4 ± 6.6 pmol/mg microsomal protein, $p = 0.016$) เมื่อเทียบกับปริมาณของเอนไซม์ใน microsomes ของตับ และจากการตรวจสอบปริมาณของเอนไซม์ในเซลล์ตับ ($n = 5$) พบว่า *UGT2B17* และ *UGT2B15* มีค่าเท่ากับ 0.4 ± 0.4 และ 6.5 ± 4.3 pmol/mg membrane protein ตามลำดับ ส่วนในเซลล์เอนเทอโรไซต์ ($n = 16$) จะมีปริมาณของเอนไซม์ *UGT2B17* เท่ากับ 11.8 ± 12.6 fmol/million cells นอกจากนี้ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเอนไซม์ *UGT2B17* กับการทำงานของเอนไซม์จะพบได้ในเซลล์เอนเทอโรไซต์ ($r^2 = 0.69$, $p = 0.003$) จากผลการศึกษาสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาแบบจำลอง physiological-based pharmacokinetics (PBPK) ของการเกิด first-pass metabolism ของสับสเตรทของเอนไซม์ *UGT2B17* (Zhang et al. 2018)

ตารางที่ 1-3 UGT2B17 allele nomenclature (Canada Research Chair in Pharmacogenomics(a) 2005)

Allele naming	Protein	Nucleotide change	Amino acid change	Effect	Enzyme activity		References
					<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT2B17*1	UGT2B17.1			Wild-type	Normal	Normal	(Beaulieu et al. 1996)
UGT2B17*2	Absent	Deletion of a 150 kb region spanning the UGT2B17 gene	-				(Murata, Warren, and Riddell 2003, Wilson et al. 2004)

ตารางที่ 1-4 *UGT2B17* SNPs table (CanadaResearchChairinPharmacogenomics(b) 2005)

Rs	mRNA ¹	Protein ²	Exon	Nucleotide position ^{1,3}
72551387	c.253G > T	p.Asp85Tyr	Exon 1	253
34664906	c.489G > A	p.Glu163Glu	Exon 1	489
72551386	c.541G > T,A	p.Val181Ile	Exon 1	541
28374627	c.1065T > C	p.Tyr355Tyr	Exon 4	1065
13122149	c.1152A > G	p.Ala384Ala	Exon 5	1152
72551385	c.1348C > T	p.His450Tyr	Exon 6	1348

¹ Coding positions are relative to the adenine (+1) of the ATG

² Amino acid positions are relative to the first amino acid (+1)

³ Promoter positions are relative to adenine (+1) of the ATG; Intronic positions are relative to the end of the previous exon (+1 being the first non-coding nucleotide at the end of each exon)

10. รายงานการเกิด *UGT2B15* polymorphism

ปัจจุบันพบรายงานการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* ทั้งสิ้น 7 variant alleles ดังแสดงในตารางที่ 1-5 และพบการเกิด SNPs บนเอกซอน 1-6 ทั้งสิ้น 5 ตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 1-6 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงความถี่ในการพบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* ในกลุ่มประชากร รวมถึงศึกษาผลของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* ดังนี้

1) MacLeod และคณะ (2000) ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B15* ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจากกรดแอสพาร์ติกเป็นไทโรซีน ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนตัวที่ 85 ($D^{85}Y$) ต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก เนื่องจากเอนไซม์ *UGT2B15* เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการกลูคูโรนิเดชันของ dihydrotestosterone (DHT) ให้เกิดเป็น DHT-glucuronide ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อของต่อมลูกหมากทั้งเนื้อเยื่อที่มีความปกติ และเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งตัวมากเกินไป จากผลการศึกษาจะพบว่าผู้ป่วยที่ป่วยเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากจะมีการทำงานของ homozygous $D^{85} Y^{85}$ *UGT2B15* allele ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสรุปได้ว่าในคนที่มี allele ของยีนแบบ homozygous จะมีการทำงานของเอนไซม์ *UGT2B15* ที่ลดลง และอาจจะส่งผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งต่อมลูกหมาก (MacLeod et al. 2000)

2) Gsur และคณะ (2002) ทำการศึกษาในชาว Caucasian แล้วพบว่าความชุกของผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมากที่มียีนที่มีจีโนไทป์แบบ $Y^{85} Y^{85}$ *UGT2B15* ไม่ได้มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ยิ่งไปกว่านั้นทั้ง $Y^{85} Y^{85}$ และ $D^{85} Y^{85}$ *UGT2B15* ไม่ได้สัมพันธ์กันกับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก (Gsur et al. 2002)

3) Park และคณะ (2004) กล่าวว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B15* ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 85 (กรดแอสพาร์ติกเปลี่ยนเป็นไทโรซีน) จะมีการทำงานต่อ dihydrotestosterone ลดลง 2 เท่า ซึ่งจะสัมพันธ์กันกับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนนี้ ต่อการนำมาใช้เพื่อทำนายการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก พบว่าเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบจะพบการแสดงออกของ mRNA ของยีน *UGT2B15* นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่มีจีโนไทป์แบบ $85Asp/Asp$ *UGT2B15* จะสัมพันธ์กันกับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก (Park et al. 2004)

ตารางที่ 1-5 UGT2B15 allele nomenclature (CanadaResearchChairinPharmacogenomics(c) 2005)

Allele naming	Protein	Nucleotide change	Amino acid change	Effect	Enzyme activity		References
					<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
UGT2B15*1	UGT2B15.1			Wild-type	Normal	Normal	(Chen et al. 1993)
UGT2B15*2	UGT2B15.2	253(G>T)	D ⁸⁵ Y		Decreased clearance of lorazepam (Chung et al. 2005)	Increased activity on androgens (Levesque et al. 1997) Decreased glucuronidation of oxazepam (Court et al. 2004)	(Levesque et al. 1997)
UGT2B15*3	UGT2B15.3	256(T>C)	L ⁸⁶ S				(Tomboc and Witchel 2003)
UGT2B15*4	UGT2B15.4	1568(A>C)	K ⁵²³ T				(Court et al. 2004)
UGT2B15*5	UGT2B15.5	253(G>T)/ 1568(A>C)	D ⁸⁵ Y/ K ⁵²³ T				(Court et al. 2004)
UGT2B15*6	UGT2B15.6	1055(C>T)	T ³⁵² I				(Court et al. 2004)
UGT2B15*7	UGT2B15.7	1055(C>T)/ 1568(A>C)	T ³⁵² I/ K ⁵²³ T				

ตารางที่ 1-6 *UGT2B15* SNPs table (CanadaResearchChairinPharmacogenomics(d) 2005)

Rs	mRNA ¹	Protein ²	Exon	Nucleotide position ^{1,3}
1902023	c.253T > G	p.Tyr85Asp	Exon 1	253
72551392	c.509T>C	p.Leu170Pro	Exon 1	509
72551391	c.633G>A	p.Arg211Arg	Exon 1	633
72551390	c.1498G>A	p.Ala500Thr	Exon 6	1498
4148269	c.1568A > C	p.Lys523Thr	Exon 6	1568

¹ Coding positions are relative to the adenine (+1) of the ATG

² Amino acid positions are relative to the first amino acid (+1)

³ Promoter positions are relative to adenine (+1) of the ATG; Intronic positions are relative to the end of the previous exon (+1 being the first non-coding nucleotide at the end of each exon)

11. Polymerase chain reaction (PCR) (อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และ ธัญชัช สุระ 2534)

11.1 หลักการของเทคนิค PCR

เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) หรือ DNA amplification reaction หรือ *in vitro* enzymatic gene amplification ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2526 โดย Mullis และคณะ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิม โดยการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจในหลอดทดลอง เป็นการเลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA), เอนไซม์ DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, oligonucleotide primer และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม และต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อเนื่องหลาย ๆ รอบ ซึ่งในแต่ละรอบนั้นจะประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 3 ขั้นตอน ได้แก่

1) ขั้นตอน denaturing จะอาศัยอุณหภูมิในหลอดทดลองที่สูงประมาณ 91 – 96 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนที่ทำให้ template DNA สองสายที่พันกันเป็นเกลียวแยกออกจากกัน ได้เป็น DNA สายเดี่ยว ซึ่งจะเป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ DNA สายใหม่

2) ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิในหลอดทดลองให้ต่ำลงมาที่ประมาณ 50 – 55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primer จับกับ DNA สายเดี่ยวด้วยเบสที่เป็นคู่สมกัน (complementary) คือ adenine จับกับ thymine และ guanine จับกับ cytosine

3) ขั้นตอน primer extension จะใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70 -75 องศาเซลเซียส เป็นขั้นตอนของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยมีดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นต้นแบบ สร้างต่อบริเวณที่ primer มาเกาะ โดยอาศัยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเหมาะสม Taq DNA polymerase ที่ทนความร้อน และ dNTPs ที่ประกอบได้ด้วย dATP, dTTP, dGTP และ dCTP ซึ่งดีเอ็นเอสายใหม่จะถูกสร้างจากทิศทาง 5' ไป 3' และลำดับเบสของดีเอ็นเอสายใหม่จะเป็นเบสคู่สมกันกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ

ขั้นตอนที่ 1 ถึง 3 เรียกว่า PCR 1 รอบ จากดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุด 1 รอบจะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ ซึ่งเมื่อทำเช่นนี้หลาย ๆ รอบ ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของทุก ๆ รอบในลักษณะทวีคูณ จะได้ดีเอ็นเอเท่ากับ 2^n เมื่อ n คือจำนวนรอบของ PCR

11.2 องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องในการทำ PCR

ปฏิกิริยา PCR จำเป็นต้องอาศัยการทำปฏิกิริยาร่วมกันขององค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

1) ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) คือดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลำดับเบสเป้าหมายสามารถนำมาใช้ได้ทั้งในลักษณะของดีเอ็นเอสายเดี่ยว หรือสายคู่ มักใช้ genomic DNA 10^5 –

10^6 target molecule ต่อหนึ่งปฏิกิริยา โดยดีเอ็นเอจะมีความเข้มข้นอยู่ที่ 50 ng ถึง 2 μ g ในสารละลายดีเอ็นเอ 1 – 5 μ l (ดีเอ็นเอของคนที่ 1μ g = 3×10^5 target molecule)

2) ไพรมเมอร์ (Primer) ในปฏิกิริยา PCR ต้องการไพรมเมอร์ 2 สาย คือ สาย forward primer และสาย reverse primer ซึ่งแต่ละสายจะมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 μ M ถึง 1 μ M ไพรมเมอร์ที่ถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยา PCR จะถูกออกแบบมาให้มีความจำเพาะในการจับกับสายของดีเอ็นเอต้นแบบ ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ไพรมเมอร์ จึงมีข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบไพรมเมอร์ดังนี้

- ไพรมเมอร์ที่ใช้ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์
- ไพรมเมอร์ที่เลือกควรมี GC-content อยู่ระหว่าง 50-60% ไม่ควรเลือกไพรมเมอร์ที่มีปริมาณ GC-content สูงเกินไป
- ไพรมเมอร์ที่ใช้ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายในดีเอ็นเอต้นแบบ
- หลีกเลี่ยงไพรมเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันเอง เพื่อป้องกันการเกิด primer-dimers
- ค่า T_m (melting temperature) ของแต่ละไพรมเมอร์อยู่ในช่วง 55-80 องศาเซลเซียส
- ไพรมเมอร์ควรมีลำดับเบสคู่สมกับปลายด้าน 3' ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายดีเอ็นเอต้นแบบ

3) Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้กันมากคือ Taq DNA polymerase แยกมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* (Taq) มีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูง และไม่สูญเสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอนการ denature โดยจะสามารถเร่งปฏิกิริยาในการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ได้ดีที่อุณหภูมิ 70 – 85 องศาเซลเซียส Taq DNA polymerase จัดเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 กิโลดาลตัน ขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบที่ชื่อว่า “proofreading” ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการนำมาใช้จะอยู่ในช่วง 1.0 – 2.5 units หากมีการใช้เอนไซม์ในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลให้มีผลผลิตของ PCR ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น

4) Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) เป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิดจะอยู่ระหว่าง 20 – 200 μ M หาก dNTPs ที่ใช้มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะส่งผลให้เกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาด

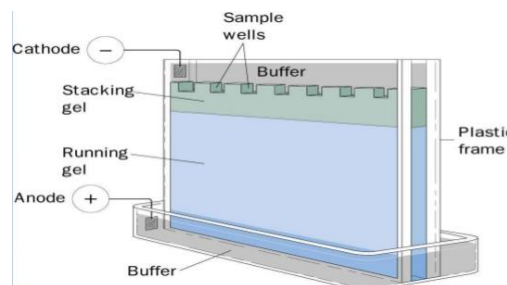
5) บัฟเฟอร์ (Buffer) ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์จะประกอบไปด้วย 10 -15 mM Tris-HCl ที่ pH8.4 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$ และ 0.01% gelatin (W/V) หรืออาจจะเลือกใช้สารอื่นแทน gelatin เช่น 0.01% NP40 และ 0.01% Tween 20 การเลือกใช้ gelatin ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ (100 μ g/ml) เนื่องจากสามารถช่วยคงสภาพของเอนไซม์ได้

6) ความเข้มข้นของ magnesium ion (Mg^{2+}) Mg^{2+} ทำหน้าที่เป็น co-factor ช่วยส่งเสริมการทำงานของ Taq DNA polymerase และมีผลต่อขั้นตอน primer annealing โดยความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เหมาะสมจะเท่ากับ 1.5 mM เพื่อให้เหลือ magnesium ในรูปอิสระประมาณ 0.5 – 1.0 mM ความเข้มข้นที่มากเกินไปของ Mg^{2+} จะส่งผลให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะ

12. Gel Electrophoresis

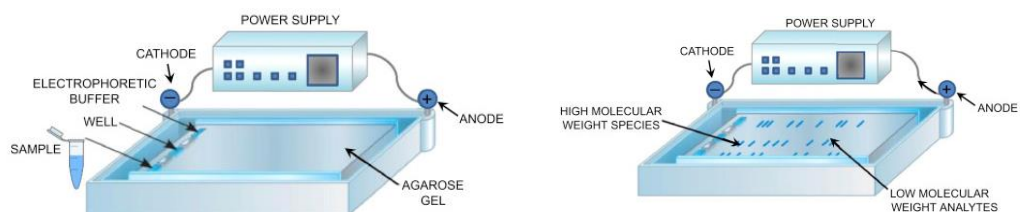
เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารจำพวกโปรตีน กรดนิวคลีอิก หรือเปปไทด์ โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างบนเจลภายใต้สนามไฟฟ้า สารแต่ละชนิดมีความสามารถในการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน โดยจะขึ้นอยู่กับขนาด และจำนวนประจุของสาร ดังนั้นสารจึงสามารถถูกแยกออกจากกันได้บนเจล สามารถจำแนกชนิดของอิเล็กโทรโฟรีซิสออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1) การรันเจลในแนวตั้ง (vertical gel electrophoresis): นิยมใช้ในการแยกโปรตีน และ ดีเอ็นเอขนาดเล็ก มีทั้งแบบแท่ง (column gel) และแบบแผ่น (slab gel) ดังรูปที่ 1-20



รูปที่ 1-20 ลักษณะการรันเจลในแนวตั้ง (Srikanth 2017)

2) การรันเจลในแนวนอน (Horizontal gel electrophoresis): นิยมใช้ในการแยกดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ดังรูปที่ 1-21



รูปที่ 1-21 การรันเจลในแนวนอน (Drabik, Bodzoń-Kuřakowska, and Silberring 2016)

12.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่านเจลของดีเอ็นเอ

12.1.1 ขนาดของโมเลกุล: ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะสามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ไวกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่

12.1.2 รูปร่างดีเอ็นเอ: ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน แต่มีรูปร่างต่างกัน ความสามารถในการเคลื่อนที่บนเจลก็จะแตกต่างกัน เช่น ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (supercoil หรือ covalently circular) จะสามารถเคลื่อนที่ได้ไวกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นเส้นตรง (linear DNA) และดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้ไวกว่าดีเอ็นเอที่คลายเกลียว (open circular หรือ nick circular DNA)

12.1.3 บัฟเฟอร์ที่ใช้: บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดยบัฟเฟอร์ 3 ชนิดที่นิยมใช้ คือ TEA (Tris-acetate), TBE (Tris-borate) และ TPE (Tris-phosphate) ความเข้มข้น 0.5 เท่า ซึ่งการเลือกใช้ชนิดของบัฟเฟอร์นั้นจะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ที่นำมาใช้ในการทดลอง

12.1.4 เปอร์เซ็นต์ของชนิดเจล: การเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจลจะส่งผลให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ polyacrylamide gel (ใช้แยกดีเอ็นเอขนาดโมเลกุล 6 – 1,000 คู่เบส) และ agarose gel (ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุล 100 – 50,000 คู่เบส)

12.1.5 ความต่างศักย์ไฟฟ้า: ยิ่งเพิ่มความต่างศักย์ไฟฟ้า ดีเอ็นเอก็จะเคลื่อนที่ได้ไวยิ่งขึ้น แต่ต้องใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม หากใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงเกินไปจะส่งผลให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ไว แต่แยกตัวได้ไม่ดี แต่หากใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำเกินไป ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ช้า เกิดการแยกตัวดี แต่แถบดีเอ็นเอที่ได้จะไม่ชัดเนื่องจากเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ

13. การวิเคราะห์ข้อมูล

13.1 ความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency)

จีโนไทป์ หมายถึง ลักษณะหรือรูปแบบของยีนที่อยู่กันเป็นคู่ ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะของสิ่งมีชีวิตในร่างกาย โดยทั่วไปแล้วลักษณะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งลักษณะจะถูกควบคุมโดยยีนอย่างน้อย 1 คู่

ความถี่จีโนไทป์ คือ ปริมาณจีโนไทป์ชนิดต่าง ๆ เมื่อคิดเป็นสัดส่วนหรือร้อยละต่อปริมาณจีโนไทป์ ทั้งหมดของยีนในตำแหน่งเดียวกัน

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

13.2 ความถี่แอลลีล (allele frequency)

แอลลีล หมายถึง รูปแบบหนึ่ง ๆ ของยีน โดยหนึ่งยีนสามารถมีได้หลายรูปแบบ

ความถี่แอลลีล คือ ปริมาณของแอลลีลชนิดต่าง ๆ เมื่อคิดเป็นสัดส่วนหรือร้อยละต่อจำนวนแอลลีลทั้งหมดของยีนในตำแหน่งเดียวกัน

$$\text{ความถี่แอลลีล} = \frac{\text{จำนวนของแอลลีลนั้น}}{\text{จำนวนของแอลลีลทั้งหมด}}$$

13.3 สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium)

"Hardy-Weinberg law" ถูกตั้งขึ้นในปี ค.ศ.1908 โดย G.H. Hardy และ Wilhelm Weinberg กล่าวว่า ในประชากรที่มีสภาพสมดุล ความถี่ของยีนและจีโนไทป์จะมีค่าคงที่จากชั่วอายุหนึ่งไปอีกชั่วอายุหนึ่ง โดยที่สภาพความสมดุลดังกล่าวจะต้องอยู่ภายใต้ข้อตกลง (assumption) ต่อไปนี้

1. ประชากรมีขนาดใหญ่ มีการจับคู่ผสมพันธุ์เป็นแบบสุ่ม (random mating)
2. ยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษา มีตำแหน่งอยู่บนออโตโซม (autosome)
3. ไม่เกิดการกลายพันธุ์ คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของยีน จากแอลลีลหนึ่งเป็นอีกแอลลีลหนึ่ง
4. ไม่มีการอพยพ และย้ายถิ่นฐานของสมาชิกจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง
5. ไม่มีการคัดเลือก คือ ทุกจีโนไทป์ในประชากรมีความสามารถในการอยู่รอด ผสมพันธุ์ และผลิตลูกหลานได้เท่าๆ กัน
6. การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสดำเนินไปอย่างปกติ คือ เซลล์สืบพันธุ์ทุกเซลล์ที่ผลิตได้สามารถทำหน้าที่ได้

ซึ่งถ้าประชากรใดอยู่ภายใต้ข้อกำหนดเหล่านี้ ประชากรดังกล่าวจะมีความถี่แอลลีลและความถี่จีโนไทป์คงที่ในทุกรุ่น ลักษณะนี้เรียกว่าสมดุลของประชากร

ยกตัวอย่าง กำหนด A และ a เป็นแอลลีลทั้งหมดของยีนเอ โดยที่แอลลีล A มีความถี่ p และแอลลีล a มีความถี่ q โดยที่ $p + q = 1$ และ $(p + q)^2 = 1$ และ $(p + q)^n = 1$ โดยที่ n เป็นจำนวนรุ่น

เมื่อแตกสมการออกมา	$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$
โดยที่ในความเป็นจริงแล้ว	$p^2 =$ ความถี่ของจีโนไทป์ AA
	$2pq =$ ความถี่ของจีโนไทป์ Aa
	$q^2 =$ ความถี่ของจีโนไทป์ aa

ตัวอย่าง หมู่เลือดของคนในระบบ MN พบว่า M และ N เป็นแอลลีลเด่นร่วมกันจากการสำรวจประชากร 5000 คนพบว่า มี MN 2000 คน MM 1000 คน และ NN 2000 คน จงหาความถี่ของแอลลีล M และ N

$$\text{ความถี่ของ M} = [(1000 \times 2) + (2000 \times 1)] / (5000 \times 2) = 0.4$$

$$\text{ความถี่ของ N} = [(2000 \times 2) + (2000 \times 1)] / (5000 \times 2) = 0.6$$

ตัวอย่าง ยีนเควควบคุมการสร้างเม็ดสีในผิวหนังมีแอลลีล A และ a ถ้าความถี่ของแอลลีลลักษณะผิวเผือก (a) ในประชากรเป็น 10% จงหาว่าใน 1000 คนจะมีพาหะกี่คน

$$\text{ความถี่ a} = 10/100 = 0.1 = p \text{ ดังนั้นความถี่ A} = 0.9$$

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

$$\text{คนเป็นพาหะ} = 2pq = 2 \times 0.9 \times 0.1 = 0.18$$

$$\text{ใน 1000 คน จะมีพาหะ } 0.18 \times 1000 = 180 \text{ คน}$$

13.4 ความถี่แฮปโลไทป์ (haplotype frequency)

แฮปโลไทป์ หมายถึง รูปแบบของสารพันธุกรรม (จีโนไทป์) ที่มีรูปแบบที่แตกต่างกันได้ในกลุ่มประชากรหรือแต่ละบุคคล โดยจะเลือกใช้กลุ่มของ DNA (alleles) ที่มีการส่งผ่านไปสู่ลูกหลานเป็น block เดียวกัน เป็นตัวแทนของความหลากหลายข้างต้น ดังนั้น alleles ที่จะส่งผ่านไปสู่ลูกหลานเป็น block เดียวกันจะต้องมีลักษณะเป็น “linkage disequilibrium-LD” กล่าวคือ block ของ alleles ดังกล่าวจะไม่ถูกแยกออกจากกันโดยกระบวนการ crossing over ในช่วง meiosis

ความถี่แฮปโลไทป์ คือจำนวนรูปแบบของลักษณะลำดับเบสที่สามารถจัดหมวดหมู่ได้ในช่วงที่ศึกษาในทุกตัวอย่าง

13.5 ความไม่สมดุลจากการเชื่อมโยง (linkage disequilibrium)

การวิเคราะห์หา linkage disequilibrium (LD) เพื่อศึกษาการถ่ายทอดอัลลีลที่อยู่คนละตำแหน่งบนโครโมโซมเดียวกัน ซึ่งมีโอกาสที่จะถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นหนึ่งด้วยกัน ปรากฏการณ์ที่สปีชีส์หลายตำแหน่งถูกถ่ายทอดไปด้วยกันในกลุ่มประชากรพบบ่อยกว่าการที่พบโดยบังเอิญ เรียกกลุ่มของสปีชีส์เหล่านี้ว่า linkage disequilibrium ต่อกัน ดังนั้นการศึกษาแฮปโลไทป์จึงมีความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมกกว่าการศึกษาสปีชีส์แค่ตำแหน่งเดียว ซึ่งค่าที่สามารถใช้สำหรับหาความสัมพันธ์ระหว่างแอลลีลในประชากรที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่

- ค่า D' ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์ของ Lewontin โดยการวัดจะขึ้นอยู่กับค่าความถี่ของข้อมูลและค่า D' จะแสดงค่าอยู่ในช่วง -1 ถึง +1

- ค่า r^2 เป็นค่าที่แสดงความสัมพันธ์ของแอลลีลทั้งสองตำแหน่ง โดยค่าที่ได้จะอยู่ในช่วง -1 ถึง +1 ซึ่งค่านี้จะมีความไวต่อความถี่แอลลีล

14. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ในประชากรชาวไทยมุสลิมที่มีถิ่นฐานอยู่บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย

15. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) เพื่อทราบความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ในประชากรชาวไทยมุสลิมที่อาศัยอยู่ภาคใต้ของประเทศไทย
- 2) ใช้เป็นข้อมูลทางการแพทย์ กรณีที่มีการใช้สารหรือยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ *UGT2B17* เพื่อให้เกิดผลทางการรักษาสูงสุด
- 3) ลดความเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา ที่มีสาเหตุมาจากปัจจัยทางพันธุกรรมของผู้ป่วย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และวิธีการศึกษา

1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด genomic DNA การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และการตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี agarose gel electrophoresis แสดงดังนี้

1.1 ขั้นตอนการสกัด genomic DNA

1.1.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.1.1.1 Pipette tips ขนาด 0.1-10 μ l, 1-200 μ l และ 1000 μ l จากบริษัท Labcon North America ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.1.1.2 Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 μ l จากบริษัท Labcon North America ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.1.1.3 ถังมือ รุ่น Sempermed[®] จากบริษัท สยาม เซมเพอร์เมด จำกัด ประเทศไทย

1.1.2 สารเคมี

1.1.2.1 ชุด Illustra[™] blood genomicPrep Mini Spin Kit ประกอบด้วย proteinase K, lysis solution, wash buffer (ก่อนนำไปใช้ต้องเติม ethyl alcohol absolute) และ elution buffer จากบริษัท GE healthcare ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.1.2.2 Ethyl alcohol absolute (C_2H_6O , MW = 46.07) จากบริษัท VWR International S.A.S. ประเทศฝรั่งเศส

1.2 ขั้นตอนการทำ PCR และ agarose gel electrophoresis

1.2.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1.2.1.1 Pipette tips ขนาด 0.1-10 μ l, 1-200 μ l และ 1000 μ l จากบริษัท Labcon North America ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2.1.2 Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 μ l จากบริษัท KIRGEN Bioscience ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2.1.3 PCR tubes ขนาด 0.2 ml จากบริษัท KIRGEN Bioscience ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2.1.4 ถุงมือ nitrile powder free จากบริษัท Glove PFS ประเทศไทย

1.2.1.5 ขวด Duran ขนาด 500 และ 1000 ml จากบริษัท SCHOTT ประเทศเยอรมัน

1.2.2 สารเคมี

1.2.2.1 Primers สำหรับ *UGT2B17* gene (forward และ reverse primers) จากบริษัท Integrated DNA Technologies (IDT) ประเทศสิงคโปร์

1.2.2.2 Primers สำหรับ *UGT2B15* gene (forward และ reverse primers) จากบริษัท Integrated DNA Technologies (IDT) ประเทศสิงคโปร์

1.2.2.3 ชุด *Taq* DNA polymerase ขนาด 500 U ประกอบด้วย *Taq* DNA polymerase, 10X PCR buffer minus Mg^{2+} และ 50 mM $MgCl_2$ จากบริษัท InvitrogenTM ประเทศบราซิล

1.2.2.4 dNTPs จากบริษัท InvitrogenTM ประเทศบราซิล

1.2.2.5 Novel Juice จากบริษัท GeneDireX ประเทศไต้หวัน

1.2.2.6 OneMARK 100 DNA ladder จากบริษัท GeneDireX ประเทศไต้หวัน

1.2.2.7 ผงเจล agarose จากบริษัท InvitrogenTM ประเทศบราซิล

1.2.2.8 Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) disodium salt ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$, MW = 372.24) จากบริษัท AMRESCO ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2.2.9 TRIS ($C_4H_{11}NO_3$, MW = 121.14) จากบริษัท AMRESCO ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2.2.10 Glacial acetic acid (CH_3COOH , MW = 60.05) จากบริษัท Guangdong Guanghua Chemical Factory ประเทศจีน

1.3 เครื่องมือที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด genomic DNA และ ขั้นตอนการทำ PCR และ agarose gel electrophoresis

1.3.1 Micropipette รุ่น Pipetman ขนาด P2, P20, P200 และ P1000 จากบริษัท Gilson S.A.S. ประเทศฝรั่งเศส

1.3.2 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น BioMate 3 จากบริษัท Thermo Electron ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Wise Spin[®] CF-10 จากบริษัท Daihan Scientific ประเทศเกาหลีใต้

1.3.4 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WiseBath® WB-11 จากบริษัท Daihan Scientific ประเทศเกาหลีใต้

1.3.5 เครื่องเขย่า (vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie[®] 2 จากบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.6 ตู้แช่ -80 °C รุ่น MDF-U74V จากบริษัท ชันโย คอมเมอร์เชียล โซลูชันส์ จำกัด ประเทศไทย

1.3.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง (mini centrifuge) รุ่น Mini-6Ks จากบริษัท Hangzhou Allsheng Instruments ประเทศจีน

1.3.8 เครื่อง T100[™] Thermal Cycler จากบริษัท Bio-rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.9 เครื่อง PowerPac[™] Basic และชุด Mini-Sub[®] Cell GE จากบริษัท Bio-rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.10 เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation) รุ่น Biospectrum[®] Multispectral Imaging System จากบริษัท UVP ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.3.11 เครื่องชั่งไฟฟ้า รุ่น PL3002 Precision Balance จากบริษัท Mettler Toledo LTD. ประเทศไทย

1.3.12 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง รุ่น pH 700 จากบริษัท Eutech instruments ประเทศสิงคโปร์

1.3.13 ไมโครเวฟ รุ่น MS2127 CW จากบริษัท แอลจี อิเล็กทรอนิกส์ จำกัด ประเทศไทย

1.3.14 ตู้แช่ -20 °C รุ่น SF-C1497 (GYN) จากบริษัท ชันโย คอมเมอร์เชียล โซลูชันส์ จำกัด ประเทศไทย

1.3.15 Hot plate & magnetic stirrer รุ่น MS-300HS จากบริษัท Misung Scientific ประเทศเกาหลี

1.3.16 Autoclave รุ่น GI80TW จากบริษัท Zealway Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. วิธีการศึกษา

2.1 ประชากรที่ศึกษา

2.1.1 การเก็บตัวอย่างสำหรับการศึกษานี้ได้รับการพิจารณาอนุญาต และรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ภาคผนวก ก)

2.1.2 กลุ่มประชากรตัวอย่างของการศึกษานี้เป็นทารกแรกเกิดที่เกิดจากหญิงตั้งครรภ์ชาวไทยมุสลิม ณ โรงพยาบาลสงขลา ประเทศไทย ซึ่งบิดาและมารดาของเด็กนับถือศาสนาอิสลาม และครอบครัวมีการตั้งถิ่นฐานอยู่ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย โดยก่อนมีการเริ่มเก็บตัวอย่าง (เลือดจากสายสะดือของเด็กทารก) มารดาของเด็กจะได้รับการอธิบายข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา วิธีการศึกษา ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ รวมถึงมีการเซ็นยินยอมเข้าร่วมโครงการ จากนั้นจะทำการสัมภาษณ์และเก็บข้อมูลเกี่ยวกับประวัติโดยทั่วไปของเด็กทารก บิดา มารดา และบรรพบุรุษ โดยใช้แบบสอบถาม

2.2 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

ขนาดตัวอย่าง (sample size; n) คำนวณโดยใช้สูตร ดังนี้

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

เมื่อ p_1 คือ สัดส่วนของจีโนไทป์ที่เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม = $(p_0)(RR)$

p_0 คือ สัดส่วนของจีโนไทป์ที่ไม่เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม

$$q_0 = 1 - p_0; \quad q_1 = 1 - p_1$$

$Z_{1-\alpha/2}$ คือ ค่าการกระจายปกติมาตรฐานที่สอดคล้องกับค่าแอลฟาสำหรับทดสอบ 2 ด้านของเส้นโค้งมาตรฐานที่ระดับ 0.05 = 1.96

$Z_{1-\beta}$ คือ ค่าการกระจายปกติมาตรฐานที่สอดคล้องกับระดับ power of the test; power of 80% = 0.84

2.2.1. การคำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้ผลการศึกษาคความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ในประชากรชาวเกาหลี (Jakobsson et al. 2006)

Polymorphism	Number of subject
Ins/ins	7/66 (10.6%)
Del/ins	15/66 (22.7%)
Del/del	44/66 (66.7%)

ขนาดตัวอย่างของ *UGT2B17* พิจารณาได้จาก

$$\text{แทนค่า } p_0 = 0.106, \quad RR = 1.5 ; (p_0)(RR) = (0.106)(1.5) = 0.159 \quad ; p_1 = 0.159$$

$$p_0 = 0.106 \quad q_0 = 1 - p_0 = 1 - (0.106) = 0.894 \quad ; q_0 = 0.894$$

$$p_1 = 0.159 \quad q_1 = 1 - p_1 = 1 - (0.159) = 0.841 \quad ; q_1 = 0.841$$

$$\text{Alpha} = 0.05, \quad Z_{0.025} = 1.96$$

$$\text{Power of 80\%} = 0.084$$

$$n = \frac{[(0.106)(0.894) + (0.159)(0.841)](1.96 + 0.84)^2}{(0.159 - 0.106)^2}$$

$$n = 637$$

ดังนั้น หากใช้การคำนวณขนาดตัวอย่างจากประชากรชาวเกาหลีจะต้องใช้จำนวนตัวอย่าง 637 คน

2.2.2. การคำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้ผลการศึกษาความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* ในประชากรชาวญี่ปุ่น (Urashima et al. 2015)

Polymorphism	Number of subject
Ins	760 (25%)
Del	2,332 (75%)

ขนาดตัวอย่างของ *UGT2B17* พิจารณาได้จาก

$$\text{แทนค่า } p_0 = 0.25, \quad RR = 1.5 ; (p_0)(RR) = (0.25)(1.5) = 0.375 \quad ; p_1 = 0.375$$

$$p_0 = 0.25 \quad q_0 = 1 - p_0 = 1 - (0.25) = 0.75 \quad ; q_0 = 0.75$$

$$p_1 = 0.375 \quad q_1 = 1 - p_1 = 1 - (0.375) = 0.625 \quad ; q_1 = 0.625$$

$$\text{Alpha} = 0.05, \quad Z_{0.025} = 1.96$$

$$\text{Power of 80\%} = 0.084$$

$$n = \frac{[(0.25)(0.75) + (0.375)(0.625)](1.96 + 0.84)^2}{(0.375 - 0.25)^2}$$

$$n = 211$$

ดังนั้น หากใช้การคำนวณขนาดตัวอย่างจากประชากรชาวญี่ปุ่นจะต้องใช้จำนวนตัวอย่าง 211 คน

เนื่องจากงานวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *UGT2B17* ยังไม่มีการศึกษาในคนไทย ดังนั้นการสุ่มเลือกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจะสุ่มโดยใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel ออกมาจำนวน 100 ตัวอย่าง (ภาคผนวก ข)

2.3 การสกัด genomic DNA

ขั้นตอนการสกัด genomic DNA จาก buffy coat ของกลุ่มตัวอย่าง จะใช้ชุด Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit

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

2.3.2 เติม buffy coat ของตัวอย่าง ปริมาตร 300 µl เขย่าให้เข้ากัน

2.3.3 เติม lysis buffer ปริมาตร 400 µl เขย่าเป็นเวลา 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที (เขย่าทุก ๆ 5 นาที โดยตัวอย่างจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม) จากนั้นนำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงเพื่อให้เกิดการตกตะกอน

2.3.4 คูดตัวอย่างจากข้อ 2.2.3 ลงใน column ของชุดสกัด นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทสารที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง แล้วนำกลับมาสวมกับ column เช่นเดิม

2.3.5 เติม lysis buffer ปริมาตร 500 µl ลงใน column หมุนเหวี่ยง 1 นาที ที่ความเร็ว 13,000 rpm ทิ้งสารใน collection tube แล้วนำกลับมาสวม column เช่นเดิม

2.3.6 เติม wash buffer ปริมาตร 500 µl หมุนเหวี่ยง 3 นาที ที่ความเร็ว 13,000 rpm เทสารใน collection tube ทิ้ง จากนั้นหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็ว 13,000 rpm ได้ purification column

2.3.7 นำ purification column สวมกับ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 µl อันใหม่

2.3.8 เติม elution buffer ปริมาตร 200 µl ตรงกึ่งกลางของ column ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเร็ว 13,000 rpm (elution buffer ที่นำมาใช้จะต้องนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70 °C ก่อน)

2.3.9 นำตัวอย่าง genomic DNA ปริมาตร 5 µl มาเติมน้ำ 495 µl จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของ genomic DNA ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm

2.3.10 เก็บตัวอย่าง genomic DNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

2.4 การตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน UGT2B17

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน UGT2B17 โดยสายไพรเมอร์ที่ถูกสร้างขึ้นจะครอบคลุมตำแหน่งโพรโมเตอร์ (บางส่วน) และเอกซอน 1 (ตารางที่ 2-1) จากนั้นจึงทำการตรวจสอบค่า melting temperature TM, %GC content และตรวจ self-complementary โดยโปรแกรมบนอินเทอร์เน็ตที่ให้บริการฟรี (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

และใช้โปรแกรม nucleotide blast จากเว็บไซต์ของ NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อทดสอบความจำเพาะระหว่างไพรเมอร์ที่ออกแบบมากับยีน *UGT2B17*

ตารางที่ 2-1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *UGT2B17* ซึ่งใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ (บางส่วน) และเอกซอน 1

ตำแหน่ง	ขนาด (bps)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
เอกซอน 1 (-260 ถึง +724)	1000	Forward 5'-CCTCTCACCTGCCACTGTTC-3'
		Reverse 5'-TGGACACACGACTTACCTAGA-3'

หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน NCBI Reference Sequence: NG_017033.1

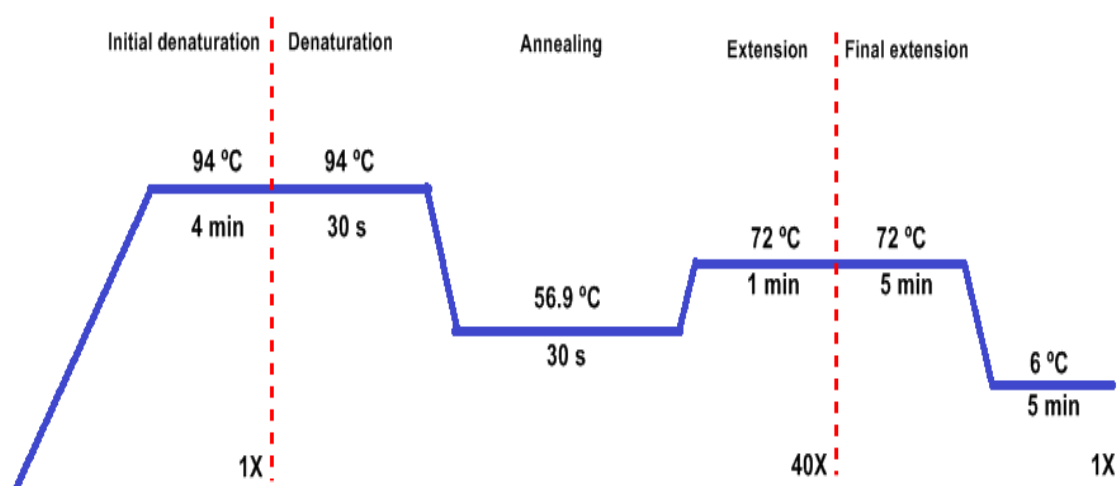
2.5 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *UGT2B17* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนตรงตำแหน่งเอกซอน 1 ของยีน *UGT2B17* จะอาศัยเทคนิค PCR โดยจะต้องมีการเตรียม PCR reaction mixture ประกอบด้วย น้ำกลั่น (sterile distilled water), Taq buffer (MgCl₂ free), MgCl₂ solution ความเข้มข้น 25 mM, forward และ reverse primers, dNTPs mixture ความเข้มข้น 0.2 mM และ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1.25 U/μl (ตารางที่ 2-2) ปิเปิด PCR reaction mixture มา 19 μl ใส่ใน PCR tubes จากนั้นปิเปิด genomic DNA ตัวอย่างละ 1 μl ผสมให้เข้ากัน นำไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนด้วยเครื่อง Mycycler™ Thermal Cycler ซึ่ง PCR cycle ที่ใช้จะประกอบไปด้วยขั้นตอนของ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอน denaturation อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที ขั้นตอน annealing อุณหภูมิ 56.9 °C เวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 6 °C เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ (รูปที่ 2-1)

PCR product ที่ได้จะถูกนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เก็บ PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C แล้วจึงส่งตรวจลำดับเบส DNA sequencing

ตารางที่ 2-2 องค์ประกอบของ PCR reaction mixture ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *UGT2B17*

PCR reaction mixture	ปริมาตร (µl)
Taq buffer (MgCl ₂ free)	2
MgCl ₂ solution	1.4
Primer mixture ของ <i>UGT2B17</i> (forward และ reverse primers)	2
dNTPs mixture	0.5
Taq DNA polymerase	0.5
Sterile distilled water	12.6
Genomic DNA template	1



รูปที่ 2-1 PCR cycle ที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *UGT2B17*

2.6 การตรวจสอบจีโนมไต้บ์ของยีน *UGT2B15*

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *UGT2B15* โดยสายไพรเมอร์ที่ถูกสร้างขึ้นจะครอบคลุมตำแหน่งโปรโมเตอร์ (บางส่วน) และเอกซอน 1 (ตารางที่ 2-3) จากนั้นจึงทำการตรวจสอบค่า melting temperature TM, %GC content และตรวจ self-complementary โดยโปรแกรมบนอินเทอร์เน็ตที่ให้บริการฟรี (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) และใช้โปรแกรม nucleotide blast จากเว็บไซต์ของ NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อทดสอบความจำเพาะระหว่างไพรเมอร์ที่ออกแบบมากับยีน *UGT2B15*

ตารางที่ 2-3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *UGT2B15* ซึ่งใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ (บางส่วน) และเอกซอน 1

ตำแหน่ง	ขนาด (bps)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์
เอกซอน 1 (-167 ถึง +724)	916	Forward 5'-TCTTTTGTGGTCTCCTTGGC-3'
		Reverse 5'-AGCACCAGTTAGACACATGACTT-3'

หมายเหตุ ลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน NCBI Reference Sequence: NG_052676.1

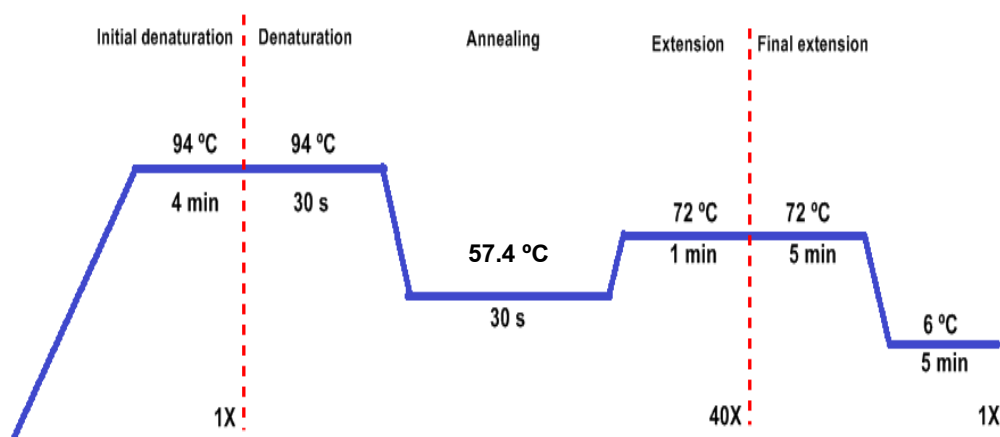
2.7 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *UGT2B15* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนตรงตำแหน่งเอกซอน 1 ของยีน *UGT2B15* จะอาศัยเทคนิค PCR โดยจะต้องมีการเตรียม PCR reaction mixture ประกอบด้วย น้ำกลั่น (sterile distilled water), Taq buffer (MgCl₂ free), MgCl₂ solution ความเข้มข้น 25 mM, forward และ reverse primers, dNTPs mixture ความเข้มข้น 0.2 mM และ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1.25 U/μl (ตารางที่ 2-4) ปิเปิด PCR reaction mixture มา 19 μl ใส่ใน PCR tubes จากนั้นปิเปิด genomic DNA ตัวอย่างละ 1 μl ผสมให้เข้ากัน นำไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีนด้วยเครื่อง Mycycler™ Thermal Cycler ซึ่ง PCR cycle ที่ใช้จะประกอบไปด้วยขั้นตอนของ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอน denaturation อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที ขั้นตอน annealing อุณหภูมิ 57.4 °C เวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 6 °C เวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ (รูปที่ 2-2)

PCR product ที่ได้จะถูกนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เก็บ PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C แล้วจึงส่งตรวจลำดับเบส DNA sequencing

ตารางที่ 2-4 องค์ประกอบของ PCR reaction mixture ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนยีน *UGT2B15*

PCR reaction mixture	ปริมาณ (µl)
Taq buffer (MgCl ₂ free)	2
MgCl ₂ solution	1.4
Primer mixture ของ <i>UGT2B15</i> (forward และ reverse primers)	2
dNTPs mixture	0.5
Taq DNA polymerase	0.5
Sterile distilled water	12.6
Genomic DNA template	1



รูปที่ 2-2 PCR cycle ที่ใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *UGT2B15*

2.8 การตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

2.8.1 เตรียม 1.5% (w/v) agarose gel โดยนำผง agarose gel 1.5 กรัม มาเติม 1X TAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ค้ำมร้อนด้วยไมโครเวฟ จนกระทั่งผง agarose gel ละลายหมด เมื่อสารละลายเริ่มเย็นลงจึงตวงสารละลายมา 45 มิลลิลิตร เทลงใน gel tray ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเจลแข็งตัวดี นำเจลที่ได้ใส่ใน electrophoresis chamber ที่มีสารละลาย 1X TAE buffer

2.8.2 นำ PCR product ผสมกับ novel juice อัตราส่วน 5:1

2.8.3 Well แรกจะทำการ load Onemark-DNA ladder 100 ปริมาตร 6 µl ตามด้วย PCR product จากข้อ 2.7.2 ใน well ถัดไป ลงใน 1.5% agarose gel จากนั้นต่อวงจรไฟฟ้าเข้ากับตัว chamber โดยจะใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ กำลังไฟฟ้า 100 มิลลิแอมป์ เป็นเวลา 30 นาที

2.8.4 ถ่ายภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentation)

2.9 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี DNA sequencing

นำตัวอย่างชิ้นส่วนของยีนที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR และไพรเมอร์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 40 ng/μl และ 10 pmol/μl ตามลำดับ จากนั้นส่งไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* ด้วยวิธี direct sequencing ณ บริษัท FirstBASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย

2.10 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.10.1 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายพันธุ์ โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ส่งไปทำการวิเคราะห์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของยีน *UGT2B17* (NCBI Reference Sequence: NG_017033.1) และ *UGT2B15* (NCBI Reference Sequence: NG_052676.1) โดยใช้โปรแกรม CLC sequence viewer 6

2.10.2 วิเคราะห์ข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน โดยใช้โปรแกรม SNPalyze version 9.0 (trial version) จากบริษัท dynacom Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น (ที่มา: <http://www.dynacom.co.jp/english/product/>) ซึ่งจะทำการวิเคราะห์หา

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

บทที่ 3

ผลการศึกษา

1. ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างของการศึกษาครั้งนี้ คือทารกแรกเกิดที่เกิดจากหญิงตั้งครรภ์ที่มีเชื้อชาติไทย และนับถือศาสนาอิสลาม ตั้งถิ่นฐานอยู่ในภาคใต้ของประเทศไทย และได้รับการทำคลอดที่โรงพยาบาลสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 ข้อมูลของทารก บิดา และมารดาของกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากแบบสอบถามและการเก็บข้อมูล ดังแสดงต่อไปนี้

1.1 ข้อมูลทารกแรกเกิด

ทารกที่เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 99 คน อายุครรภ์เฉลี่ย 39.9 ± 0.8 สัปดาห์ (33.4-41 สัปดาห์) แบ่งเป็นทารกเพศหญิง 51 คน (51.52%) และทารกเพศชาย 48 คน (48.48%) น้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย $3,121.30 \pm 390.49$ กรัม (2,130-4,270 กรัม)

1.2 ข้อมูลบิดา

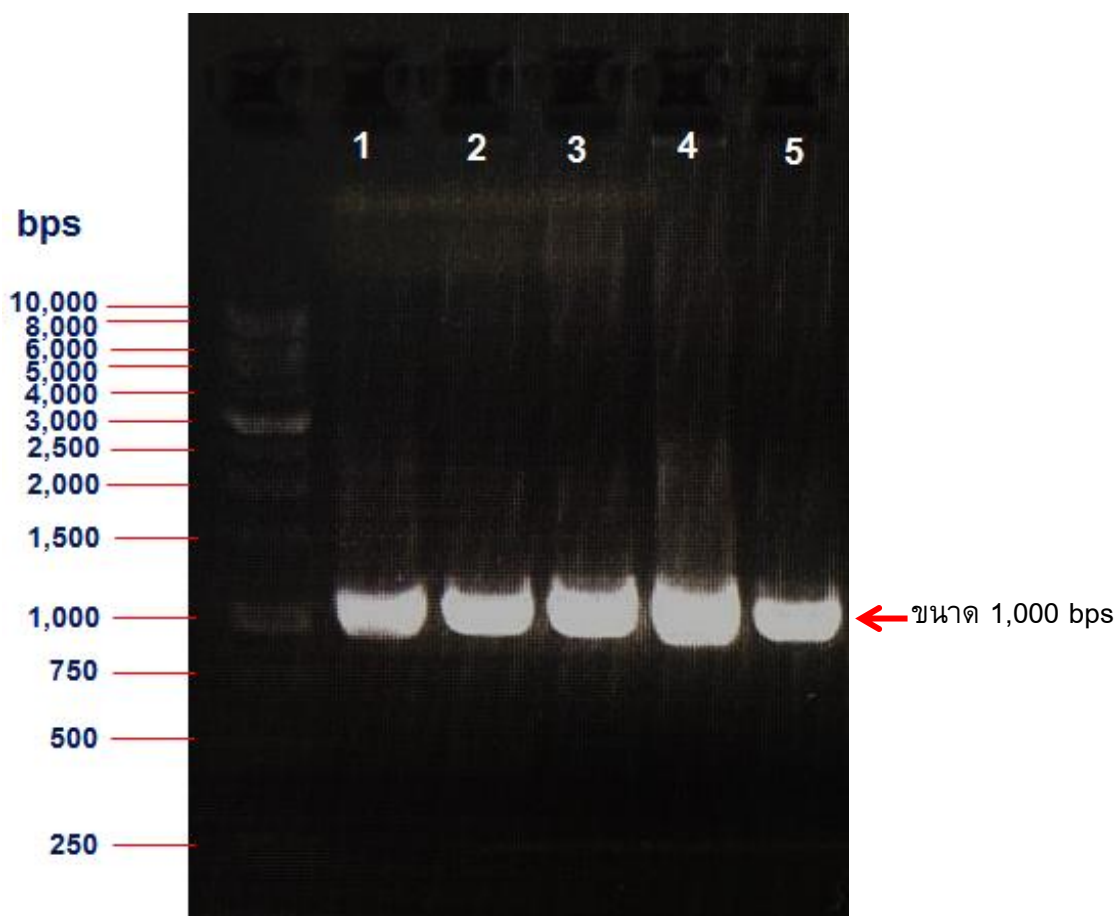
อายุเฉลี่ย 30.08 ± 6.52 ปี (16-53 ปี) นับถือศาสนาอิสลาม และมีภูมิลำเนาเกิดภาคใต้ 100% แบ่งเป็น สงขลา 89 คน นราธิวาส 1 คน นครศรีธรรมราช 3 คน ปัตตานี 1 คน สตูล 2 คน ยะลา 1 คน และพัทลุง 2 คน

1.3 ข้อมูลมารดา

อายุเฉลี่ย 26.94 ± 6.34 ปี (16-46 ปี) นับถือศาสนาอิสลาม และมีภูมิลำเนาเกิดภาคใต้ 100% แบ่งเป็น สงขลา 91 คน นราธิวาส 1 คน นครศรีธรรมราช 4 คน ปัตตานี 2 คน และพัทลุง 1 คน

2. การกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17*

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* บริเวณเอกซอน 1 ในกลุ่มตัวอย่างทารกแรกเกิดจำนวน 99 คน โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากสายสะดือทารกมาสกัด genomic DNA ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนเอกซอน 1 ของยีน *UGT2B17* ด้วย specific primer และเทคนิค PCR และตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนยีนที่ได้ (PCR product) โดยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 3-1) ซึ่งชิ้นส่วนยีนที่ได้จะมีขนาดเท่ากับ 1000 bps ครอบคลุมบางส่วนของโปรโมเตอร์ (-260/-1) และครอบคลุมทั้งเอกซอน 1 (+1/+724) จากนั้นจึงทำการส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของยีน *UGT2B17* จาก NCBI Reference Sequence: NG_017033.1 (รูปที่ 3-2 และรูปที่ 3-3)



รูปที่ 3-1 ภาพถ่าย 1.5% agarose gel electrophoresis ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณเอกซอน 1 ของยีน *UGT2B17* ขนาด 1,000 bps โดย 1 = รหัสตัวอย่าง 210, 2 = รหัสตัวอย่าง 212, 3 = รหัสตัวอย่าง 220, 4 = รหัสตัวอย่าง 223 และ 5 = รหัสตัวอย่าง 257

					-1411 A	CGAGGCAGTG
UGT2B17	CGGAGCAGCG	TGCTGTTTTA	ATGAGTGCCT	GGGTGCAGGT	GGGCTGAGGC	
UGT2B17	CTAAATGGC	ATCAGCCCCA	AGTGAGGATG	GGACAGTGGT	TTTATAGTTC	
UGT2B17	TCTGTAAAGA	GTAAGTGTCC	CAATCTAACG	TGACTGCTAT	GTAGTATCTG	
UGT2B17	GATGGCCTCT	TGATCTTCAA	GGGTTTCATGT	CTCCAGCCAG	GGTAGGTGTC	
UGT2B17	TTCTGGCCGG	CTCTCTTCT	GCTTCTGCTA	TCTTGC	AP-1 TGAC ACACGCTGCT	
UGT2B17	GATGCAAGCA	GCCTTGCATC	TTGGGACTGG	GCCTGAGAAG	GGAGGAGTTA	
UGT2B17	CTCATCCCTT	CAAGCTTTCA	GGCCCCAGAA	GAATCTTTGA	ACCCCTGCT	
UGT2B17	-1043C>T,A CCGCTGGCCA	CCCTCCTAAA	GGATCACTGT	GGTGCCAGGC	AGGAATGAGC	
UGT2B17	TGCTTGGGTA	TCCAGAGAGC	TCCCAGTACC	TTTCTGCTAC	TTCCTCTACC	
UGT2B17	CCTATATTTT	GCTTGGCTTG	GTTCTCTAAT	AP-1 TTGACTCAGC	TTCACATAAA	
UGT2B17	GTCAGGAACT	TCTCCTGCAA	NF-κB ACAGAACTTC	AGCTTCTCCA	GTGGGGATGT	
UGT2B17	GTATTCTGGA	GAGGGGGATC	ACCC	TTTCCC	ACTTCCATTG	TTGGGGCACT
UGT2B17	CACAGTGT	GGGATGTCTC	CCAGGTCCTG	CAGGAGCAGT	ACGCTTCTCTG	
UGT2B17	CAGAGGGTGT	GTGGATCCTC	TCAGAATTGC	TGGTCTGTCC	TTGCAGTTGA	
UGT2B17	-700C>T CTGCAGCTA	AAATTCACAA	TGCAAGCCTC	TGCATGCTGC	TCTGTCTGGA	
UGT2B17	GCTGCAATCT	AGTCTGCAT	CCCATCTGCC	ATGATCACTG	GAAAACCTC	
UGT2B17	ATTTATTTT	TAAAGGGTCC	AGAAAATGCT	AATCTATAGA	GATAGAAATT	
UGT2B17	AGATTAGTGG	TTGCCTAGGG	TAGGATGGAT	GCAAAATTC	Oct-1 AGAGTGGGGG	
UGT2B17	GTTAGAGGCT	ATTGTATAGA	ATCTTTTGGGA	GATAA	ACTG ATTATTGTAG	
UGT2B17	TGAAAGTAAA	ATTCTGTGAA	TATACTAGGA	AACATTGAAC	TGTACACACT	
UGT2B17	AATTGG	AP-1 TGAG TCATATGGTA	TATGAATTAT	GTGTCAACAA	AGTTTTAGAA	
UGT2B17	GACATTACTT	GCACCACGAT	ATTA	AAAAAT	GGCGTTGAG	Oct-1 TTGTAAAT
UGT2B17	ACTTCTTCTC	TCTATGTCAA	GGGCACCGAA	CAGGCAGGAG	CCTCTCACCT	
UGT2B17	GCCACTGTTC	TTAACAGTAT	TATAAA	Oct-1 TAA TTACATAAGA	CAGGTTACTT	
UGT2B17	-198G>C,A ACGTATTCTA	ROR-α GGTCATAAAA	ATTATTGCTT	GACTAGAGTA	-155A>G FOXA ATTGTAAATA	
UGT2B17	TAAAGAACA	HNF1 CCAAACACAC	TAAAATAAAT	ROR-α ATGAGGTCAA	CTCAAATTTT	
UGT2B17	AGCAGTTATA	HNF1 TTTTAACTTG	Pbx ATTGATTTT	CCTCAGATAT	AAGTATGAGA	
UGT2B17	AATGACAGAA	AGAAACAACA	-25A>G ACTGGA	-15C>T AAGCACTGCA	TAAGACCAGG	

-1

รูปที่ 3-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT2B17* บริเวณโปรโมเตอร์ (ความยาว 1,411 bps) (NCBI Reference Sequence: NG_017033.1) ตัวอักษรสีม่วงแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่มีการรายงาน (known SNPs) ได้แก่ -1043C>T/A, -700C>T, -333G>C/A, -198G>C/A, -155A>G, -25A>G และ -15C>T กรอบสีน้ำเงินแสดง transcription binding site ที่พบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* ซึ่งประกอบไปด้วย pre-B-cell homeobox (Pbx), hepatocyte nuclear factor1 (HNF1), forkhead box protein A (FOXA), RAR-related orphan receptor alpha (ROR-α), Octamer transcription factor1 (Oct-1), Activator protein 1 (AP-1) และ nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)

Exon 1 (724 bps)

UGT2B17	ATGTCCTCTGA	AATGGATGTC	AGTCTTTCTG	CTGATGCAGC	TCAGTTGTTA
UGT2B17	CTTTAGCTCT	GGGAGTTGTG	GAAAGGTGCT	GGTGTGGCCC	ACAGAATACA
UGT2B17	GCCATTGGAT	AAATATGAAG	ACAATCCTGG	AAGAGCTTGT	TCAGAGGGGT
UGT2B17	CATGAGGTGA	TTGTGTTGAC	ATCTTCGGCT	TCTATTCTTG	TCAATGCCAG
UGT2B17	TAAATCATCT	GCTATTAAT	TAGAAGTTTA	TCCTACATCT	TTAACTAAAA
UGT2B17	AT ^{253G>T} GATTTGGA	AGATTTTTTT	ATGAAAATGT	TCGATAGATG	GACATATAGT
UGT2B17	ATTTCAAAAA	ATACATTTTG	GTCATATTTT	TCACAACACTAC	AAGAATTGTG
UGT2B17	TTGGGAATAT	TCTGACTATA	ATATAAAGCT	CTGTGAAGAT	GCAGTTTTGA
UGT2B17	ACAAGAAACT	TATGAGAAAA	CTACAAGAGT	CAAAATTTGA	TGTCCTTCTG
UGT2B17	GCAGATGCCG	TTAATCCCTG	TGGTGAGCTG	CTGGCTGA ^{489G>A} <u>G</u> C	TACTTAACAT
UGT2B17	ACCCTTTCTG	TACAGTCTCC	GCTTCTCTGT	TGGCTACACA	^{541G>T/A} <u>G</u> TTGAGAAGA
UGT2B17	ATGGTGAGG	ATTTCTGTTC	CCTCCTTCCT	ATGTACCTGT	TGTTATGTCA
UGT2B17	GAATTAAGTG	ATCAAATGAT	TTTCATGGAG	AGGATAAAAA	ATATGATATA
UGT2B17	TATGCTTTAT	TTTGACTTTT	GGTTTCAAGC	ATATGATCTG	AAGAAGTGGG
UGT2B17	ACCAGTTTTA	TAGTGAAGTT	CTAG		

รูปที่ 3-3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT2B17* บริเวณเอกซอน 1 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 724 (724 bps) (NCBI Reference Sequence: NG_017033.1) ตัวอักษรสีม่วงแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่มีการรายงาน (known SNPs) ได้แก่ 253G>T, 489G>A และ 541G>T/A

จากผลการศึกษาการกระจายของจีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* ในกลุ่มประชากรชาวไทยมุสลิม มีการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ wild-type homozygous (ins/ins) จำนวน 5 (5.05%) ตัวอย่าง, แบบ heterozygous deletion (del/ins) จำนวน 41 (41.41%) ตัวอย่าง และแบบ homozygous deletion (del/del) จำนวน 53 (53.54%) ตัวอย่าง (ตารางที่ 3-1)

ตารางที่ 3-1 การแสดงออกของจีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* ในประชากรชาวไทยมุสลิม

จีโนไทป์	เพศชาย	เพศหญิง	รวม
	จำนวน (%)	จำนวน (%)	จำนวน (%)
Ins/ins	1 (1.01)	4 (4.04)	5 (5.05)
Del/ins	20 (20.20)	21 (21.21)	41 (41.41)
Del/del	27 (27.27)	26 (26.26)	53 (53.54)

2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* กับเชื้อชาติ

เมื่อวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* กับเชื้อชาติของกลุ่มตัวอย่าง พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาในประชากรชาวไทยมุสลิมจะพบเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* แบบ mutant homozygous deletion มากกว่าแบบ wild-type หรือ heterozygous deletion ซึ่งหมายถึงกลุ่มคนเหล่านี้ขาดการแสดงออกของยีน *UGT2B17* และการทำงานของเอนไซม์ *UGT2B17* ในร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าการศึกษาชาติการแสดงออกของยีน *UGT2B17* นั้นมีรูปแบบของการเกิดลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกันกับประชากรชาวเอเชียในประเทศญี่ปุ่น และเกาหลี แต่จะแตกต่างจากประชากรชนชาติอื่น ๆ ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนแบบ wild-type หรือ heterozygous deletion มากกว่าแบบ mutant homozygous deletion เช่นในประชากรชาว Caucasians, African Americans, Danish และ Swedish เป็นต้น (ตารางที่ 3-2)

ตารางที่ 3-2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* ในประชากรชาวไทยมุสลิมกับประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ

<i>UGT2B17</i> genotypes	n (%)	Allele frequency	reference
Thai			
<i>UGT2B17</i> [+] ^a	46 (46.46)	0.26	This study
<i>UGT2B17</i> null ^b	53 (53.54)	0.74	
Japanese			
<i>UGT2B17</i> [+]	760 (25)	nd	(Urashima et al. 2015)
<i>UGT2B17</i> null	2,332 (75)	nd	
Koreans			
<i>UGT2B17</i> [+]	22 (33)	0.33	(Jakobsson et al. 2006)
<i>UGT2B17</i> null	44 (67)	0.67	
Caucasians			
<i>UGT2B17</i> [+]	73 (89)	0.86	(Martin-Escudero et al. 2015)
<i>UGT2B17</i> null	9 (11)	0.14	
African Americans			
<i>UGT2B17</i> [+]	94 (83)	0.83	(Park et al. 2006)
<i>UGT2B17</i> null	19 (17)	0.17	
Danish			
<i>UGT2B17</i> [+]	609 (91)	nd	(Mouritsen et al. 2018)
<i>UGT2B17</i> null	59 (9)	nd	
Swedish			
<i>UGT2B17</i> [+]	156 (97)	0.81	(Karypidis et al. 2008)
<i>UGT2B17</i> null	5 (3)	0.19	

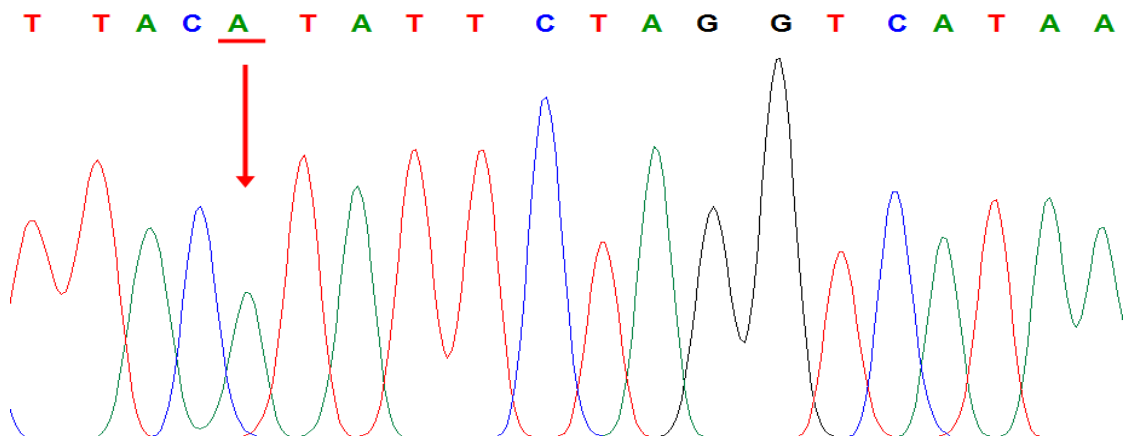
ตัวย่อ: n, จำนวน; nd, ไม่ปรากฏข้อมูล

^a*UGT2B17* [+] = wild type homozygous และ heterozygous

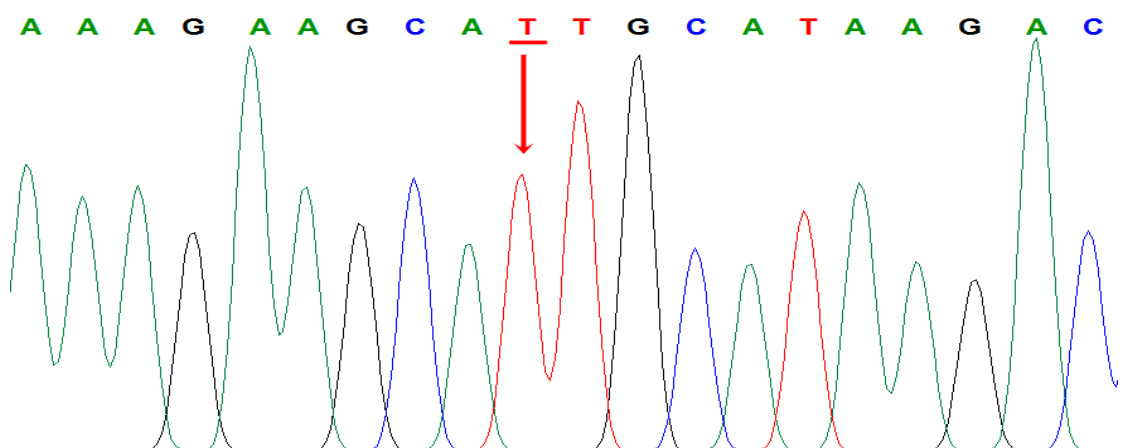
^b*UGT2B17* null = mutant homozygous deletion

2.2 ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17*

จากผลการศึกษาในยีน *UGT2B17* ที่มีจีโนไทป์เป็น wild-type homozygous (ins/ins) จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าในทุกตัวอย่างจะเกิดการกลายพันธุ์ของยีนตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ -198G>A และ -15C>T เป็นแบบ homozygous ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการรายงานมาก่อนแล้ว (known SNPs) (รูปที่ 3-2) แต่ไม่พบการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนตรงตำแหน่งเอกซอน 1 โดยการเปรียบเทียบตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายพันธุ์จะเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน NCBI Reference Sequence: NG_017033.1 และแสดงเป็น electropherograms ดังรูปที่ 3-4 และ 3-5



รูปที่ 3-4 Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* ตำแหน่ง -198G>A แบบ homozygous (-198A/A)



รูปที่ 3-5 Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* ตำแหน่ง -15C>T แบบ homozygous (-15T/T)

3. การกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ homozygous deletion (del/del) จำนวน 53 ตัวอย่าง ที่ได้จากผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* บริเวณ เอกซอน 1 เมื่อนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน NCBI Reference Sequence: NG_052676.1 ของยีน *UGT2B15* (รูปที่ 3-6 และ 3-7) พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากกว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน NCBI Reference Sequence: NG_017033.1 ของยีน *UGT2B17* (รูปที่ 3-2 และรูปที่ 3-3) โดยตำแหน่งเด่นชัดที่ทำให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างยีน *UGT2B15* และ *UGT2B17* คือตำแหน่งโปรโมเตอร์ที่ -171 ถึง -113 ของยีน *UGT2B15* จะมี นิวคลีโอไทด์จำนวน 59 bps เพิ่มขึ้นมา ในขณะที่จะไม่ปรากฏนิวคลีโอไทด์นี้ในยีน *UGT2B17* แสดงเป็น electropherograms ดังรูปที่ 3-8 ดังนั้น 53 ตัวอย่างที่มีการแสดงออกของจีโนไทป์ แบบ homozygous deletion (del/del) ของยีน *UGT2B17* นี้จึงจัดว่าเป็นยีน *UGT2B15*

UGT2B15					-1608 TGCTGTGG
UGT2B15	CCTGCTCTCT	GGGGTGGAGG	-1579A>T,G GATAGGTCCA	CAAGCGACAC	AGACCTGAGC
UGT2B15	CCCTCCTAGG	ATTTGGCACC	AGATGTAAGG	TTCTTGAATC	AGTTTGAACC
UGT2B15	CCAACAGCGC	GCCAACAGAC	AACAGGAGGC	GGTGTGGAGC	AACATGCTGT
UGT2B15	TTAATGAAC	GCCTGGTTGC	AGGTGGGCTG	AGGCCTAAAA	-1409G>A TGGCATCAGC
UGT2B15	-1397A>C CCCAAGTGAG	GATGGGACAG	GGGTTTTGTA	GTCCTCTGTA	AACAGTAAGT
UGT2B15	GTCCAGTCT	GTTGTGACTG	CTATGTAGTA	CCTGGATGGC	CTATTTCTTG
UGT2B15	ATCTTCAGGG	GTACATCTCT	TCCAGCCAGG	GTAAGTGTCT	TCTGGCCGGC
UGT2B15	TCTTTCCTG	CTTCTGCTAT	CTTGTGACA	CA ^{AP-1} CGCTGCTG	ATGCAAGTGG
UGT2B15	TCTTGCATCT	TGGGGCTGGG	CCTGAGAAGG	GAGGAGTTAC	TCATCCCTTC
UGT2B15	AAGCCTTCAG	-1139T>C GTCCTGAGGA	GAATCTTTGA	ACCCCTGCA	TCACTGGCCA
UGT2B15	CCCTCCTGAT	AGATCCCTGT	GATGCCAGGC	AGGAATGAGC	CGCTTGGGTA
UGT2B15	TCCAGAGAGC	TCCAGTGCC	TTTCTGCTAC	TTCCTCTACC	-1007G>A CCTGTATTTT
UGT2B15	GCTTGGCTTG	GTTCTCTAAT	TTGACTCAGC	TTCACATAAA	GTCAGGAAct
UGT2B15	TCTCCTGCAA	TCCAGAACTTC	AGCTTCTCCA	GTGGGGATGT	GTATTCTGGA
UGT2B15	-942A>C GAGGGGGATC	ACCC ^{NF-kB} TTTCCC	ACTTCCATTG	TTGGGGCACT	CACAGT ^{C/EBP} TTTT
UGT2B15	GGGATGTCTC	CCAGGTCCTG	CAGGAGCAGT	ACTTCTCCTG	CAGAGGGTGT
UGT2B15	GTGGATCCTC	TCAGAATTGC	TGGTCTGT ^{-772T>C} TC	TTGCAGTTGA	TCTGCAGCTA
UGT2B15	AAATTCACAA	TGCAAGCCTC	TGCATGCTGC	TCTGTCTGGA	GCTGCAATCT
UGT2B15	AGTCCTGCAT	CCCATCTGCC	ATGATCACTG	GAAAACCCCTC	ATTTATTTTT
UGT2B15	TAAAGGGTCC	AGAAAATGCT	AATCTATAGA	GATAGAAATT	AGATTAGTGG
UGT2B15	TTGCCTAGGG	TAGGATGGAT	GCAAAATTC	AGAGTGGGGG	GTTAGAGGCT
UGT2B15	ATTGTATAGA	ATCTTTTGGGA	GATAA ^{Oct-1} ACTG	ATTATTGTAG	TGGATGTAAA
UGT2B15	ATTCTGTGAA	TATACTAGGA	AACATTGAAC	TGTACACACT	AATTGG ^{C/EBP} TGAG ^{AP-1}
UGT2B15	-442T>C TCATATGGTA	TATGAATTAT	GTGTCAACAA	AGTTTTAGAA	GACATTACTT
UGT2B15	GCACCACGAT	ATTA ^{Oct-1} AAAAAT	GCCGTTTGAG	TTGTATA ^{Oct-1} AATT	ACTTCTTCTC
UGT2B15	TCTATGTCAA	GGGCACCGAA	CAGGCAGGAG	CCTCTCACT ^{Oct-1}	GCCACTGTTC
UGT2B15	TTAACAGTAT	TATAAA ^{Oct-1} ATAA	TTACATAAGA	CAGGTTACTT	ACATATTCTA ^{ROR-α}
UGT2B15	GGTCATAAAA	ATTATTGCTT	GACTAGAGTA	ATTGTAAACA	TAAAAGAACA
UGT2B15	CCAAACACAC	TAAAATAAAT	ATGAGGTCAT	CAATCTTTG	TTGTGCTCCT
UGT2B15	TGGCATGCAC	CTATTCAGAC	TGTTAGTATT	ATGTATTAC	TTCAAATTTT
UGT2B15	AGCAGTTATA	TTTTAAC ^{Pbx} TTG	ATTGATTTTT	CCTCAGATAT	AAGTATGAGA
UGT2B15	AATGACAGAA	AGAAACAACA	ACTGGAAAAG	AAGCATTGCA	TAAGACCAGG

-1

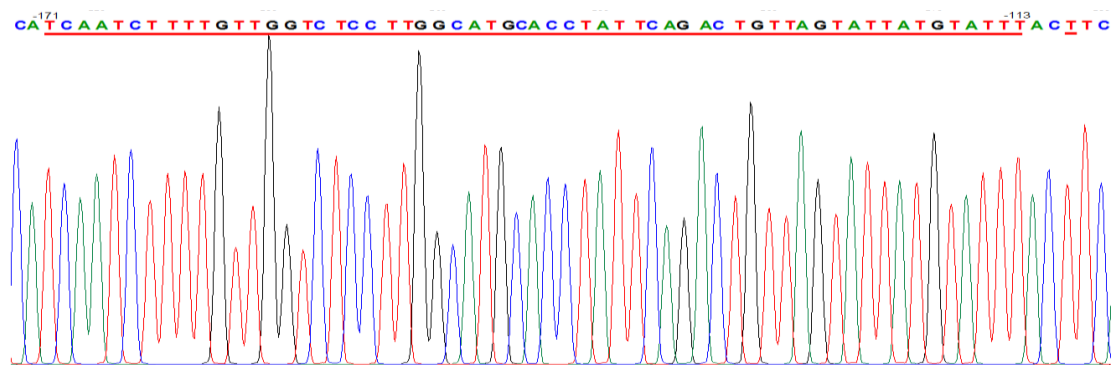
รูปที่ 3-6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT2B15* บริเวณโปรโมเตอร์ (ความยาว 1,608 bps) (NCBI Reference Sequence: NG_052676.1) ตัวอักษรสีม่วงแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่มีการรายงาน (known SNPs) กรอบสีน้ำเงินแสดง transcription binding site ที่พบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B15*

Exon 1 (724 bps)

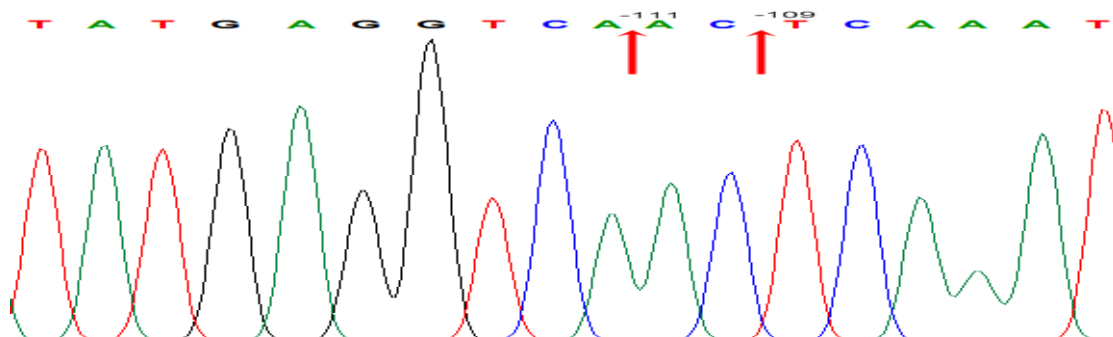
UGT2B15	AT GTCTCTGA	AATGGACGTC	AGTCTTTCTG	CTGATACAGC	TCAGTTGTTA
UGT2B15	CTTTAGCTCT	GGAAGCTGTG	GAAAGGTGCT	AGTGTGGCCC	ACAGAATACA
UGT2B15	GCCATTGGAT	AAATATGAAG	ACAATCCTGG	AAGAGCTTGT	TCAGAGGGGT
UGT2B15	CATGAGGTGA	CTGTGTTGAC	ATCTTCGGCT	TCTACTCTTG	TCAATGCCAG
UGT2B15	TAAATCATCT	GCTATTAAT	TAGAAGTTTA	TCCTACATCT	TTAACTAAAA
UGT2B15	AT ^{253T>G} TATTGGA	AGATTCTCTT	CTGAAAATTC	TCGATAGATG	GATATATGGT
UGT2B15	GTTTCAAAAA	ATACATTTTG	GTCATATTTT	TCACAATTAC	AAGAATTGTG
UGT2B15	TTGGGAATAT	TATGACTACA	GTAACAAGCT	CTGTAAAGAT	GCAGTTTTGA
UGT2B15	ATAAGAAACT	TATGATGAAA	CTACAAGAGT	CAAAGTTTGA	TGTCATTCTG
UGT2B15	GCAGATGCCC	TTAATCCCTG	TGGTGAGCTA	CTGGCTGAAC	TATTTAACAT
UGT2B15	ACCCTTTC ^{509T>C} I	TACAGCTTC	GATTCTCTGT	TGGCTACACA	TTTGAGAAGA
UGT2B15	ATGGTGGAGG	ATTTCTGTTC	CCTCCTTCCT	ATGTACCTGT	TGTTATGTCA
UGT2B15	GAATTAAGTG	ATCAAATGAT	TTTCATGGAG	^{633G>A} AGATAAAAA	ATATGATACA
UGT2B15	TATGCTTTAT	TTTGACTTTT	GGTTTCAAAT	TTATGATCTG	AAGAAGTGGG
UGT2B15	ACCAGTTTTA	TAGTGAAGTT	CTAG		

รูปที่ 3-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT2B15* บริเวณเอกซอน 1 ตั้งแต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 724 (724 bps) (NCBI Reference Sequence: NG_052676.1) ตัวอักษรสีม่วงแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่มีการรายงาน (known SNPs) ได้แก่ 253T>G, 509T>C และ 633G>A

ก. ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B15*



ข. ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17*



รูปที่ 3-8 Electropherograms บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B15* และ *UGT2B17*

ก. ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B15* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นมาจากยีน *UGT2B17* ตรงตำแหน่ง -171 ถึง -113 จำนวน 59 bps

ข. ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B17* โดยตำแหน่งที่ลูกศรสีแดงชี้ (ตำแหน่งระหว่าง -112 กับ -111 และ -110 กับ -109) แสดงถึงตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากยีน *UGT2B15*

3.1 ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15*

จากผลการศึกษาในยีน *UGT2B15* จำนวน 53 ตัวอย่าง พบว่าเกิดการกลายพันธุ์ของยีน 2 ตำแหน่งตรงบริเวณที่มีการแปรหัสของเอกซอน 1 ได้แก่ 253T>G โดยจัดเป็นการกลายพันธุ์แบบ Missense mutation คือเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 253 จาก thymine (T) เป็น guanine (G) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงโคดอนที่ 85 จาก tyrosine (TAT) เป็น aspartic acid (GAT) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการรายงานก่อนหน้านี้แล้ว (known SNPs) และตำแหน่งที่ 2 ได้แก่ 643A>T จัดเป็นการกลายพันธุ์แบบ missense mutation คือเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 643 จาก adenine (A) เป็น thymine (T) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงโคดอนที่ 215 จาก methionine (ATG) เป็น leucine (TTG) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน (novel SNPs) การเปรียบเทียบตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายพันธุ์จะเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน NCBI Reference Sequence: NG_052676.1 และแสดงเป็น electropherograms ดังรูปที่ 3-9 และ 3-10

3.2 สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

การวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของยีน *UGT2B15* พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 253T>G บนบริเวณที่มีการแปรหัสของเอกซอน 1 เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ในขณะที่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 643A>T บนบริเวณที่มีการแปรหัสของเอกซอน 1 ไม่เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3-3)

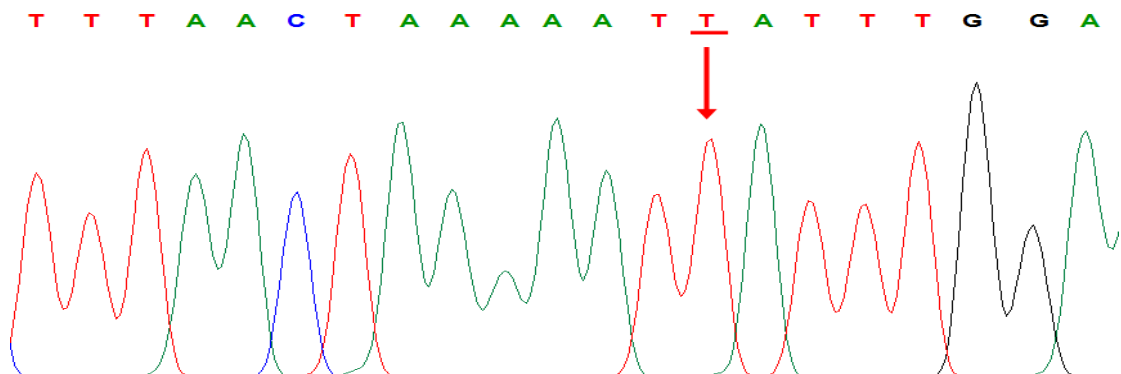
3.3 ความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency)

ความถี่จีโนไทป์ของแต่ละ variant ที่พบในกลุ่มตัวอย่าง ($n=53$) จะแสดงดังตารางที่ 3-3 ซึ่ง variant ของการกลายพันธุ์ของยีนตรงตำแหน่ง 253T>G จะพบการกลายพันธุ์แบบ homozygous 9 คน ความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.1698 และพบการกลายพันธุ์แบบ heterozygous 31 คน ความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.5849 ส่วนการกลายพันธุ์ของยีนตรงตำแหน่ง 643A>T จะพบการกลายพันธุ์แบบ heterozygous 2 คน ความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.0377

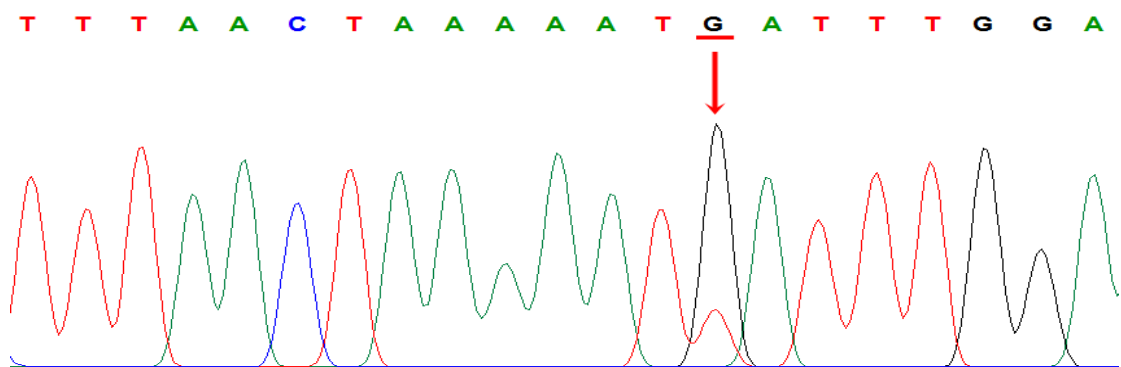
3.4 ความถี่แอลลีล (allele frequency)

ความถี่แอลลีลของยีน *UGT2B15* ที่เกิดการกลายพันธุ์ในกลุ่มตัวอย่าง ($n=53$) พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 253T>G มีความถี่แอลลีลเท่ากับ 0.4623 ซึ่งมากกว่าความถี่แอลลีลของการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 643A>T โดยจะมีความถี่แอลลีลอยู่ที่ 0.0189 (ตารางที่ 3-3)

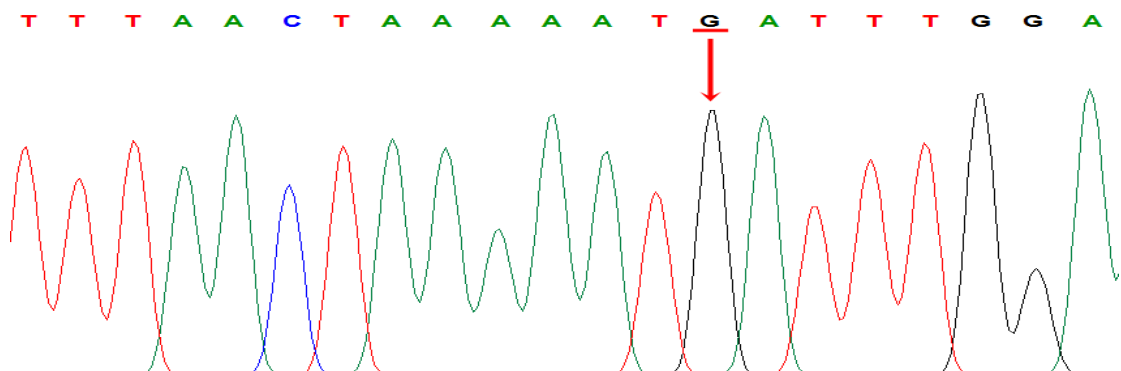
ก. Wild-type (253T/T)



ข. Heterozygous (253T/G)

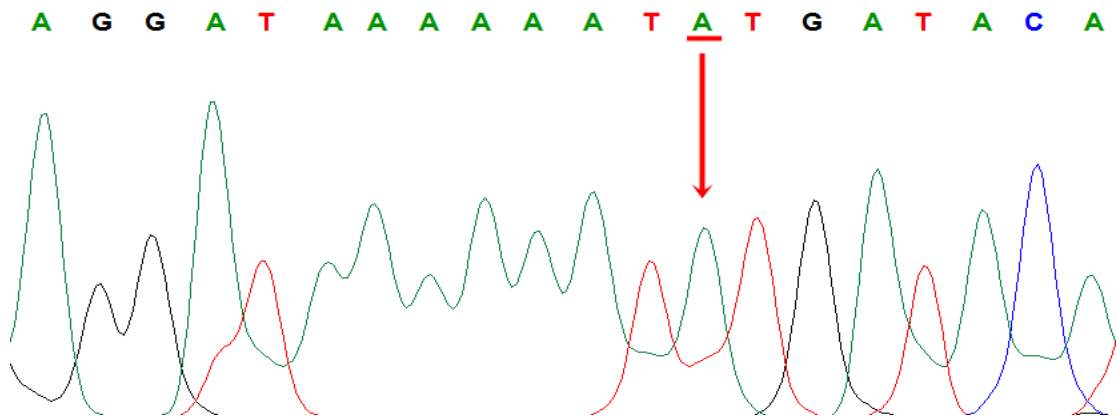


ค. Homozygous (253G/G)

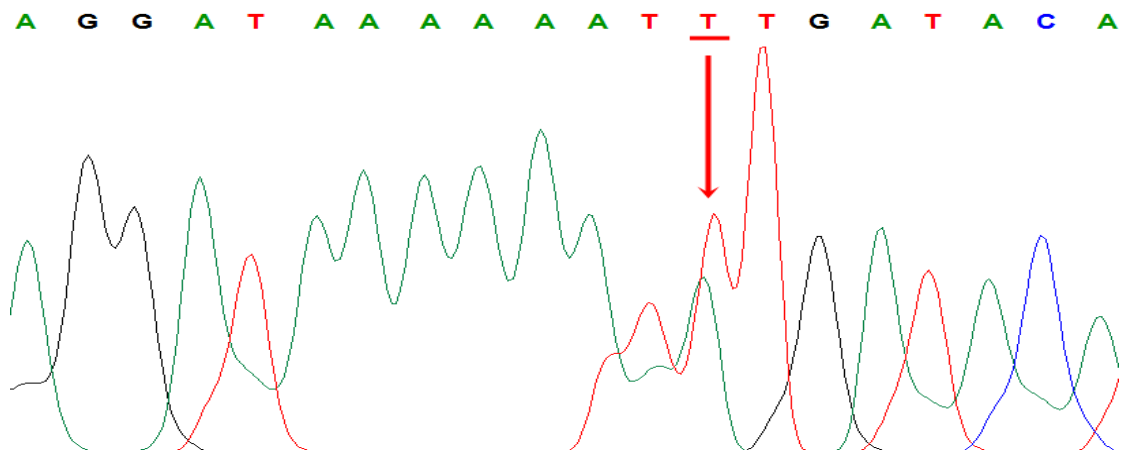


รูปที่ 3-9 Electropherograms บริเวณการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* บริเวณเอกซอน 1 ที่ตำแหน่ง 253T>G: ก. Wild-type (253T/T), ข. Heterozygous (253T/G) และ ค. Homozygous (253G/G)

ก. Wild-type (643A/A)



ข. Heterozygous (643A/T)



รูปที่ 3-10 Electropherograms บริเวณการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* บริเวณเอกซอน 1 ที่ตำแหน่ง 643A>T: ก. Wild-type (643A/A) และ ข. Heterozygous (643A/T)

ตารางที่ 3-3 ผลการวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์ ความถี่แอลลีล และสมมูลของฮาร์ดีไวน์เบิร์กของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* ในทารกแรกเกิดชาวไทยมุสลิม ณ โรงพยาบาลสงขลา (n=53)

SNPs	Allele frequency	Genotype frequency	Observed values allele	Expected values allele	Chi-square	D _f	p-values
253T>G (Y ⁸⁵ D)	T= 0.5377	T/T=0.2453	13	15.3255	1.018	1	0.3131
	G= 0.4623	T/G=0.5849	31	26.3491			
		G/G=0.1698	9	11.3255			
643A>T (M ²¹⁵ L)	A= 0.9811	A/A=0.9623	51	51.0189	12.7453	1	0.0004*
	T= 0.0189	A/T=0.0377	2	1.9623			
		T/T=0	0	0.0189			

หมายเหตุ:

- Observed values คือ ค่าสังเกตซึ่งเป็นค่าแท้จริงที่ได้มาจากการประชากรของกลุ่มตัวอย่าง
- Expected values คือ ค่าที่ได้มาจากการคำนวณของสมการฮาร์ดีไวน์เบิร์ก
- * คือ $p < 0.05$ หมายถึง ไม่เป็นไปตามสมมูลของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

4. ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* กับเพศ

การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 253T>G ทั้งในทารกเพศชาย และหญิง จะพบการกลายพันธุ์แบบ heterozygous (T/G) มากที่สุด โดยมีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.5556 และ 0.6154 ตามลำดับ ในขณะที่ตำแหน่ง 643A>T ทั้งในทารกเพศชาย และหญิงจะแสดงลักษณะของ wild-type (A/A) มากกว่าการเกิดการกลายพันธุ์แบบ heterozygous (A/T) มีความถี่จีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ในทารกเพศชาย และเพศหญิงเท่ากับ 0.037 และ 0.0385 ตามลำดับ (ตารางที่ 3-4)

ตารางที่ 3-4 การเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์ และจำนวนคนที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* ในเพศชาย และเพศหญิง (n=53)

<i>UGT2B15</i>		เพศ				รวม	
SNPs	จีโนไทป์	ชาย		หญิง		ความถี่จีโนไทป์	จำนวน (คน)
		ความถี่จีโนไทป์	จำนวน (คน)	ความถี่จีโนไทป์	จำนวน (คน)		
253T>G (Y ⁸⁵ D)	T/T	0.2963	8	0.1923	5	0.2453	13
	T/G	0.5556	15	0.6154	16	0.5849	31
	G/G	0.1481	4	0.1923	5	0.1698	9
643A>T (M ²¹⁵ L)	A/A	0.963	26	0.9615	25	0.9623	51
	A/T	0.037	1	0.0385	1	0.0377	2
	T/T	0	0	0	0	0	0

5. ความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B15* (Y⁸⁵D) กับเชื้อชาติ

253T>G คือการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 253 จาก thymine (T) เป็น guanine (G) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงโคดอนที่ 85 จาก tyrosine (Y) เป็น aspartic acid (D) เมื่อวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B15* (Y⁸⁵D) กับเชื้อชาติอื่น พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาในประชากรชาวไทยมุสลิมจะพบเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B15* แบบ heterozygous mutation (Y⁸⁵/D⁸⁵) มากที่สุด ตามด้วยแบบ wild-type (Y⁸⁵/Y⁸⁵) และ homozygous mutation (D⁸⁵/D⁸⁵) ตามลำดับ ซึ่งจะสอดคล้องกันกับข้อมูลของประชากรชาว

Caucasians, Australia, Slovenian และ Sweden ในขณะที่การศึกษาก่อนหน้านี้ในประชากรชาวเอเชียจะพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนแบบ homozygous mutation มากที่สุด ส่วนประชากรชาว Saudi จะพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนแบบ heterozygous mutation มากที่สุด ตามด้วย homozygous mutation และ wild-type ตามลำดับ (ตารางที่ 3-5)

ตารางที่ 3-5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B15* ($Y^{85}D$) ในประชากรชาวไทยมุสลิมกับประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ

เชื้อชาติ	Genotype frequency (%)			Allele frequency		อ้างอิง
	Y^{85}/Y^{85}	Y^{85}/D^{85}	D^{85}/D^{85}	Y^{85}	D^{85}	
	This study (n=53)	0.2453 (25%)	0.5849 (58%)	0.1698 (17%)	0.46	
Asian (n=32)	0.187 (19%)	0.344 (34%)	0.469 (47%)	0.36	0.64	(Lampe et al. 2000)
Caucasians (n=202)	0.322 (32%)	0.455 (46%)	0.223 (22%)	0.55	0.45	(Lampe et al. 2000)
Australia (n=190)	nd (26%)	nd (49%)	nd (25%)	nd	nd	(Gsur et al. 2002)
Slovenian (n=178)	nd (32%)	nd (52%)	nd (16%)	nd	nd	(Hajdinjak and Zgradisnik 2004)
Sweden (young adult men) (n=1061)	nd (29%)	nd (50%)	nd (21%)	0.53	0.47	(Swanson et al. 2007)
Sweden (elderly men) (n=976)	nd (28%)	nd (50%)	nd (22%)	0.55	0.45	(Swanson et al. 2007)
Saudi (n=191)	nd (3%)	nd (62%)	nd (35%)	0.34	0.66	(Alkharfy et al. 2017)

ตัวย่อ: n, จำนวน; nd, ไม่ปรากฏข้อมูล; Y, tyrosine (wild-type); D, aspartic acid (mutant)

บทที่ 4

อภิปรายผลการศึกษา

เอนไซม์ UGT2B15 และ UGT2B17 เป็นโปรตีนที่ถูกสร้างมาจากยีน *UGT2B15* และ *UGT2B17* โดย UGT2B15 สามารถพบได้ที่ ตับ ระบบทางเดินอาหาร และต่อมลูกหมาก (luminal cells) (Hu et al. 2010) ส่วน UGT2B17 สามารถพบได้ที่ ตับ อัณฑะ มดลูก ต่อมไทรอยด์ และต่อมลูกหมาก (basal cells) (Beaulieu et al. 1996, Hu et al. 2010) ลำดับกรดอะมิโนที่ถูกถอดรหัสมาจากยีน *UGT2B15* และ *UGT2B17* มีความคล้ายคลึงกันถึง 94% จึงทำให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีสับสเตรทที่คล้ายคลึงกัน เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน แต่จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าเอนไซม์ UGT2B17 มีความจำเพาะกับสับสเตรทที่หลากหลายกว่าเอนไซม์ UGT2B15 เนื่องจากเอนไซม์ UGT2B17 จะไปควบจับกับโมเลกุลของสเตียรอยด์ตรงตำแหน่ง 3 α และ 17 β ส่งผลให้มีความสามารถในการเมแทบอลิซึม androsterone (ADT), dihydrotestosterone (DHT), testosterone (T) และ 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol (3 α -diol) ในขณะที่เอนไซม์ UGT2B15 จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ DHT, T และ 3 α -diol ตรงตำแหน่ง 17 β เท่านั้น (Turgeon et al. 2000) นอกจากฮอร์โมนภายในร่างกายแล้ว เอนไซม์ UGT2B17 ยังมีหน้าที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของยาที่ใช้ในการรักษา เช่น exemestane, ibuprofen และ vorinostat เป็นต้น (Bock 2015, Luo et al. 2018, Turgeon et al. 2003) ส่วนเอนไซม์ UGT2B15 มีหน้าที่ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ lorazepam, S-oxazepam, S-lorazepam และ paracetamol เป็นต้น (Yang et al. 2017)

1. การกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17*

จากผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* บริเวณเอกซอน 1 ในทารกแรกเกิดชาวไทยมุสลิมที่ได้รับการทำคลอดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา ประเทศไทย จำนวน 99 คน พบว่ายีน *UGT2B17* มีการกลายพันธุ์ของยีนแบบ homozygous deletion (del/del) มากที่สุด คิดเป็น 53.54% (53/99 คน) แบบ heterozygous deletion (del/ins) คิดเป็น 41.41% (41/99 คน) และคิดเป็นความถี่แอลลีลอยู่ที่ 0.74 ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนแบบ del/del กับการศึกษาในกลุ่มประชากรชนชาติต่าง ๆ ที่มีรายงานก่อนหน้านี้นี้ พบว่าประชากรชาวไทยมุสลิมมีเปอร์เซ็นต์ของการกลายพันธุ์แบบ del/del ไกล่เคียงกับประชากรชาวเอเชียในประเทศอื่น ๆ ได้แก่ ชาวญี่ปุ่น (75%) (Urashima et al. 2015) ชาวเกาหลี (67%) (Jakobsson et al. 2006) และชาวจีน (73.9%) (Bai et al. 2010) แต่

ในทางกลับกันชาวคอเคเซียน (caucasian) ชาวอเมริกันเชื้อสายแอฟริกา (African Americans) ชาวเดนมาร์ก รวมทั้งชาวสวีเดน จะพบการกลายพันธุ์แบบ del/del น้อย ประมาณ 3-11% แต่จะพบยีนในลักษณะของ wild-type (ins/ins) หรือ heterozygous deletion (del/ins) มากกว่า (Karypidis et al. 2008, Martin-Escudero et al. 2015, Mouritsen et al. 2018, Park et al. 2006) การกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ del/del จะส่งผลให้ไม่มีเอนไซม์ *UGT2B17* ซึ่งจะไปสู่การเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ หรือเกิดความเป็นพิษจากสับสเตรท นอกจากนี้อาจจะมีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง เช่น ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ del/del เมื่อได้รับการรักษาด้วยยา vorinostat จะพบว่าการเกิดปฏิกิริยากลุ่มโครินเดชันของยาลดลงถึง 30% เมื่อเทียบกับ ins/ins หรือ del/ins (Wong et al. 2011) นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ del/del ยังส่งผลต่อการลดลงของ 17-hydroxymestane glucuronide ในปัสสาวะ แต่ไม่ได้สัมพันธ์กับการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา (ปวดข้อหรืออ่อนนุชวาม) เนื่องจากยา exemestane อาศัยเอนไซม์ UGTs isoform อื่น ๆ มาเป็นเอนไซม์รองในการเกิดปฏิกิริยากลุ่มโครินเดชัน (Chanawong et al. 2017) แอนโดรเจนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของร่างกาย และรักษาสมดุลของต่อมลูกหมาก คือ สเตียรอยด์ฮอร์โมนในต่อมลูกหมาก ได้แก่ testosterone และ dihydrotestosterone ซึ่งถูกตั้งสมมติฐานว่ามีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับการระบาดวิทยาของโรคมะเร็งต่อมลูกหมากส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับ steroidogenic pathway เช่น CYP3A4, CYP17 และ SRD5A2 เป็นต้น (Kpoghomou et al. 2013) ยีน *UGT2B17* สามารถพบการแสดงออกของยีนได้บริเวณต่อมลูกหมาก และเอนไซม์ *UGT2B17* มีหน้าที่ในการเกิดปฏิกิริยากลุ่มโครินเดชันของ testosterone และ dihydrotestosterone ดังนั้นจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ del/del กับการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากในชาวคอเคเซียน และชาวอเมริกันเชื้อสายแอฟริกา พบว่าชาวคอเคเซียนที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีนแบบ del/del จะมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากที่เพิ่มขึ้น แต่จะไม่มีผลต่อชาวอเมริกันเชื้อสายแอฟริกา (Park et al. 2006) นอกจากนี้ชาวสวีเดนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ del/del จะมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากเช่นกัน (Karypidis et al. 2008) นอกจากสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากแล้ว ชาวญี่ปุ่นที่สูบบุหรี่ หรือดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และมีการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ del/del ยังสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งบริเวณ upper aerodigestive tract แต่ไม่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งชนิดอื่น เนื่องจากการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* แบบ del/del จะส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยากลุ่มโครินเดชันของสารก่อมะเร็ง (นิโคติน) และเอทานอลที่ลดลง (Urashima et al. 2015) ดังนั้นจากการศึกษาข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าเชื้อชาติที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากที่แตกต่างกัน โดยสภาวะแวดล้อมและการดำรงชีวิตจัดเป็นอีกปัจจัยที่จะ

ส่งผลต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากในแต่ละเชื้อชาติ นอกจากนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT2B17* แบบ del/del กับการเกิดปฏิกิริยาไกลูคูโรนิเดชันของยา tamoxifen พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ 4-OH-TAM-N-Gluc ที่พบจากการมีจีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* ทั้งสามรูปแบบ (wt, del/ins และ del/del) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.042$) โดยจีโนไทป์ของยีนแบบ del/del จะมีระดับของ 4-OH-TAM-N-Gluc เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.036$) เมื่อเทียบกับจีโนไทป์แบบ wt หรือ del/ins นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์แบบ del/del จะมีค่าเฉลี่ยของ 4-OH-TAM/4-OH-TAM-N-Gluc ratio น้อยกว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์แบบ wt และ del/ins อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.028$) การเกิดผลการทดลองที่ขัดแย้งเช่นนี้ สามารถอธิบายได้ว่า อาจเกิดจากกลไกการปรับตัวชดเชย (compensatory mechanism) โดยจะไปเพิ่มการแสดงออกของยีนอื่น ๆ ให้มาทำหน้าที่แทนยีน *UGT2B17* ที่มีการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ del/del จึงส่งผลให้มี glucuronide metabolite เพิ่มขึ้นได้ โดยมีงานวิจัยพบว่าในคนที่จีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* แบบ deletion จะมีระดับ mRNA ของยีน *UGT2B15* ในตับมากถึง 4.5 เท่า แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดถึงกลไกนี้ เนื่องจากมีตัวอย่างของจีโนไทป์แบบ del/del น้อย ($n = 12$) (Romero-Lorca et al. 2015) และจากการศึกษาของ Murata และคณะ แสดงให้เห็นว่าการขาด *UGT2B17* จะกระทบต่อความสามารถในการกระตุ้นให้เกิด specific immune response (immunogenicity) (Murata, Warren, and Riddell 2003)

จากผลการศึกษารายการกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์และเอ็กซอน 1 ของยีน *UGT2B17* ที่มีจีโนไทป์เป็น wild-type homozygous (ins/ins) ในทารกแรกเกิดชาวไทยมุสลิม จำนวน 5 ตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์ของยีนตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ -198G>A และ -15C>T เป็นแบบ homozygous ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการรายงานมาก่อนแล้ว โดย -198G>A คือการเปลี่ยนแปลงเบสจาก G (guanine) เป็น A (adenine) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ -198 มีรายงานใน NCBI SNP database รหัส rs62317003 ส่วน -15C>T คือการเปลี่ยนแปลงเบสจาก C (cytosine) เป็น T (thymine) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ -15 มีรายงานใน NCBI SNP database รหัส rs28672900 ตำแหน่ง -15 ของยีน *UGT2B17* มีหน้าที่เป็น 5' UTR (untranslated regions) คือดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ได้ถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดอะมิโนทางด้านปลาย 5' โดยทั้งตำแหน่ง -198 และ -15 ของยีน *UGT2B17* อยู่ตรงบริเวณใกล้เคียงกับ TATA box region ซึ่งอาจจะเป็นบริเวณ binding site ของ coactivator หรือ corepressor ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการเกิดการกลายพันธุ์ทั้งสองตำแหน่งนี้ อาจจะมีหรือไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน และการทำงานของเอนไซม์ *UGT2B17* ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาผลของการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าวต่อไป

ยีน *UGT2B17* อาจเกิดจาก tandem duplication event ซึ่งเป็นกระบวนการ unequal recombination ในธรรมชาติ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของเอ็กซอนของยีน

UGT2B17 กับ *UGT2B15* มีความเหมือนกัน 95% ซึ่งจากปรากฏการณ์ดังกล่าวทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาคอนจูเกชัน ได้ทั้ง 2 ชนิด โดยที่เอนไซม์ *UGT2B17* สามารถควมจับกับสับสเตรทที่เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนได้ดีกว่าเอนไซม์ *UGT2B15* และจากการที่เอนไซม์ *UGT2B17* มีสับสเตรทที่เป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนจำนวนมากว่า *UGT2B15* ดังนั้นเอนไซม์ *UGT2B17* อาจจะมีบทบาทสำคัญทางชีวภาพในการรักษาสมดุลของระดับสเตียรอยด์ฮอร์โมนในร่างกาย (Wilson et al. 2004)

2. การกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15*

จากผลการศึกษาการกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์และเอกซอน 1 ของยีน *UGT2B17* ที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous deletion (del/del) ทั้ง 53 ตัวอย่างในทารกแรกเกิดชาวไทยมุสลิม พบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ได้มาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของยีน *UGT2B15* นั้นมีความคล้ายคลึงกัน จึงสรุปได้ว่าทั้ง 53 ตัวอย่างตรวจพบการแสดงออกของยีน *UGT2B15* แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *UGT2B17* โดยตำแหน่งที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างเด่นชัดระหว่างยีน *UGT2B17* และ *UGT2B15* คือนิวคลีโอไทด์จำนวน 59 bps ของยีน *UGT2B15* ตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์ระหว่างนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ -113 ถึง -171 และเป็นตำแหน่งที่มี binding site ของ HNF3 β ซึ่งจะไม่พบนิวคลีโอไทด์ 59 bps และ binding site นี้ในยีน *UGT2B17* นอกจากนี้บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *UGT2B15* จะประกอบไปด้วย TATA box จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ -63, -290 และ -367 ในขณะที่ TATA box ของยีน *UGT2B17* จะมี 4 ตำแหน่ง เนื่องจากการมีนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งของยีนแตกต่างกัน (Turgeon et al. 2000) การที่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *UGT2B17* สามารถเข้าจับกับยีน *UGT2B15* ได้นั้นอาจเกิดจากการที่อาสาสมัครเหล่านั้นขาดการแสดงออกของยีน *UGT2B17* ซึ่งถือว่าเป็นเรื่องปกติที่พบได้ในประชากรชาวเอเชีย

จากผลการศึกษาการกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์และเอกซอน 1 ของยีน *UGT2B15* ในทารกแรกเกิดชาวไทยมุสลิมจำนวน 53 ตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์ของยีน 2 ตำแหน่งตรงบริเวณเอกซอน 1 ได้แก่ 253T>G และ 643A>T จัดเป็นการกลายพันธุ์แบบ missense mutation คือเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอแล้วส่งผลให้กรดอะมิโนที่ถูกแปลรหัสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 253T>G คือการที่เบส thymine (TAT) ถูกแทนที่ด้วย guanine (GAT) ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 253 แล้วส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงโคดอนที่ 85 จาก tyrosine (Y) เป็น aspartic acid (D) (Y⁸⁵D) พบจากการศึกษานี้ถึง 58% ส่วน Y⁸⁵Y (wild-type) และ D⁸⁵D พบได้ 25% และ 17% ตามลำดับ ซึ่งการกลายพันธุ์แบบ Y⁸⁵D เป็นตำแหน่งที่มีรายงานใน NCBI SNP database รหัส rs1902023 เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การเกิดการกลายพันธุ์แบบ Y⁸⁵D มาเปรียบเทียบกับ

กับชนชาติอื่น ๆ พบว่าการกลายพันธุ์แบบ $Y^{85}D$ สามารถพบได้ประมาณ 34-62% (Alkharfy et al. 2017, Gsur et al. 2002, Hajdinjak and Zagradisnik 2004, Lampe et al. 2000, Swanson et al. 2007) แอนโดรเจนมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการเจริญ การแบ่งตัว และการลุกลามของโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก ในขณะที่ยีน *UGT2B15* ที่มีการแสดงออกในต่อมลูกหมาก จะถูกแปลรหัสเป็นเอนไซม์ *UGT2B15* ทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของ C19 steroid androgens (เช่น dihydrotestosterone; DHT) โดยการเกิดปฏิกิริยาการกลูโคโรนิเดชันของสารแล้วกำจัดออกนอกร่างกาย จากงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่ายีน *UGT2B15* ที่มีการแสดงออกของแอลลีล Y (wild-type) จะป้องกันการเกิดมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยค่า V_{max} ของเอนไซม์กับสับสเตรท C19 steroids (เช่น 5-androstane-3, 17-diol และ DHT) ในคนที่มีแอลลีล Y จะมีค่าเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับแอลลีล D (กลายพันธุ์) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ได้มาจากการแปลรหัสด้วยแอลลีล D ไม่มีประสิทธิภาพในการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมของ DHT ส่งผลให้ความเข้มข้นของ DHT ในเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากสูงขึ้น ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาไปเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากต่อไป (Zhong et al. 2017) นอกจากนี้ในคนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* จะเกิดความแปรปรวนของปฏิกิริยาการกลูโคโรนิเดชันของยา oxazepam โดยแอลลีล $Y^{85}Y$ จะมีความสามารถในการกำจัดยาออกนอกร่างกายต่ำกว่าแอลลีล $D^{85}D$ (He et al. 2009) การกลายพันธุ์อีกตำแหน่งที่พบคือ 643A>T เป็นการแทนที่เบส adenine (ATG) ด้วย thymine (TTG) ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 643 ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงโคดอนที่ 215 จาก methionine (M) เป็น leucine (L) ($M^{215}L$) โดยจากการศึกษานี้พบเพียง 2 ตัวอย่างจากทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ยังไม่เคยมีการรายงานใน NCBI SNP database และยังไม่พบการศึกษาถึงผลกระทบที่เกิดจากการกลายพันธุ์ตำแหน่งนี้

3. การวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

จากผลการวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กในการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* ในทารกแรกเกิดชาวไทยมุสลิมที่เกิดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา จำนวน 53 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* ทั้งหมด 2 ตำแหน่ง คือ 253T>G และ 643A>T โดยการกลายพันธุ์บนเอกซอน 1 ที่ตำแหน่ง 253T>G เป็นไปตามกฎของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ซึ่งจะสอดคล้องกับแบบสอบถามที่พบว่าทารกแรกเกิดมีบิดามารดาตั้งถิ่นฐานและอาศัยอยู่ในภาคใต้ของประเทศไทย (นราธิวาส นครศรีธรรมราช ปัตตานี สตูล ยะลา พัทลุง และสงขลา) นอกจากนี้ชาวไทยเชื้อสายมุสลิมส่วนใหญ่มักจะแต่งงานกันภายในศาสนาเดียวกัน จึงส่งผลให้รูปแบบของยีนที่ถ่ายทอดกันรุ่นสู่รุ่นนั้นไม่มีความแตกต่างกันมาก ในขณะที่การกลายพันธุ์บนเอกซอน 1 ที่ตำแหน่ง 643A>T นั้นไม่เป็นไปตามกฎของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก อาจเกิดเนื่องมาจากมีความผิดปกติของยีนในทารก หรือบิดามารดาของทารกเอง เพราะการกลายพันธุ์

ตรงตำแหน่งนี้พบการแสดงออกเพียง 2 ตัวอย่างจากทั้งหมด 53 ตัวอย่าง นอกจากนี้อาจจะมีผลมาจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากรุ่นสู่รุ่นที่ไม่สามารถห้ามการอพยพย้ายถิ่นฐานของมนุษย์ได้ ซึ่งอาจจะได้รับการถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติมาได้ เป็นต้น

4. การคำนวณขนาดตัวอย่าง โดยใช้ผลจากการศึกษา

4.1 การคำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้ผลการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17*

Polymorphism	Number of subject
Ins/ins	5/99 (5.05%)
Del/ins	41/99 (41.41%)
Del/del	53/99 (53.54%)

ขนาดตัวอย่างของ *UGT2B17* พิจารณาได้จาก

แทนค่า $p_0 = 0.0505$, $RR = 1.5$; $(p_0)(RR) = (0.0505)(1.5) = 0.076$; $p_1 = 0.076$

$p_0 = 0.0505$ $q_0 = 1 - p_0 = 1 - (0.0505) = 0.9495$; $q_0 = 0.9495$

$p_1 = 0.076$ $q_1 = 1 - p_1 = 1 - (0.076) = 0.924$; $q_1 = 0.924$

Alpha = 0.05, $Z_{0.025} = 1.96$

Power of 80% = 0.84

$$n = \frac{[(0.0505)(0.9495) + (0.076)(0.924)](1.96 + 0.84)^2}{(0.076 - 0.0505)^2}$$

$n = 1,424$

ดังนั้น หากใช้การคำนวณขนาดตัวอย่างจากผลการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* จะต้องใช้จำนวนตัวอย่าง 1,424 คน

4.2 การคำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้ผลการกลายพันธุ์ตำแหน่ง 253T>G

ของยีน *UGT2B15*

Polymorphism	Number of subject
T/T	13/53 (24.5%)
T/G	31/53 (58.5%)
G/G	9/53 (17%)

ขนาดตัวอย่างของ *UGT2B15* พิจารณาได้จาก

แทนค่า $p_0 = 0.245$, $RR = 1.5$; $(p_0)(RR) = (0.245)(1.5) = 0.3675$; $p_1 = 0.3675$

$$p_0 = 0.245 \quad q_0 = 1 - p_0 = 1 - (0.245) = 0.755 \quad ; \quad q_0 = 0.755$$

$$p_1 = 0.3675 \quad q_1 = 1 - p_1 = 1 - (0.3675) = 0.6325 \quad ; \quad q_1 = 0.6325$$

$$\text{Alpha} = 0.05, Z_{0.025} = 1.96$$

$$\text{Power of 80\%} = 0.84$$

$$n = \frac{[(0.245)(0.755) + (0.3675)(0.6325)](1.96 + 0.84)^2}{(0.3675 - 0.245)^2}$$

$$n = 218.08$$

ดังนั้น หากใช้การคำนวณขนาดตัวอย่างจากผลการกลายพันธุ์ตำแหน่ง 253T>G ของ ยีน *UGT2B15* จะต้องใช้จำนวนตัวอย่างประมาณ 218 คน

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* บริเวณโปรโมเตอร์ และ เอกซอน 1 ในทารกแรกเกิดชาวไทยมุสลิมที่เกิดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา ประเทศไทย จำนวน 99 ตัวอย่าง สามารถสรุปผลการศึกษาดังนี้

1. พบ prevalence ของการกระจายของจีโนไทป์ของยีน *UGT2B17* ดังนี้
 - 1.1 wild-type homozygous (ins/ins) 5.05% (5 ตัวอย่าง)
 - 1.2 heterozygous deletion (del/ins) 41.41% (41 ตัวอย่าง)
 - 1.3 homozygous deletion (del/del) 53.54% (53 ตัวอย่าง)
2. พบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B17* บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน 2 ตำแหน่ง แบบ known SNPs คือ
 - 2.1 -198G>A NCBI SNP database รหัส rs62317003 จำนวน 5 ตัวอย่าง
 - 2.2 -15C>T NCBI SNP database รหัส rs28672900 จำนวน 5 ตัวอย่าง
3. พบการแสดงออกของยีน *UGT2B15* ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการแสดงออกของจีโนไทป์แบบ homozygous deletion (del/del) ในยีน *UGT2B17*
4. พบการกลายพันธุ์ยีน *UGT2B15* บริเวณเอกซอน 1 ของยีนทั้งหมด 2 ตำแหน่ง คือ
 - 4.1 Novel SNPs 1 ตำแหน่ง ได้แก่ 643A>T, M215L จำนวน 2 ตัวอย่าง
 - 4.2 Known SNPs 1 ตำแหน่ง ได้แก่ 253T>G, Y85D NCBI SNP database รหัส rs1902023 จำนวน 40 ตัวอย่าง
5. ความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* ตำแหน่ง 253T>G พบความถี่ของการกลายพันธุ์แบบ homozygous เท่ากับ 0.1698 และพบความถี่ของการกลายพันธุ์แบบ heterozygous เท่ากับ 0.5849 ในขณะที่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 643A>T พบความถี่ของการกลายพันธุ์แบบ heterozygous เท่ากับ 0.0377
6. ความถี่แอลลีล (allele frequency) ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* ทั้ง 2 ตำแหน่ง เรียงลำดับจากความถี่สูงไปต่ำ ดังนี้ 253T>G (0.4623) และ 643A>T (0.0189)

7. การวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT2B15* พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 253T>G บริเวณเอกซอน 1 เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ในขณะที่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 643A>T บริเวณเอกซอน 1 ไม่เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ($p<0.05$)

Further study

ควรมีการศึกษาโดยการเพิ่มประชากรกลุ่มตัวอย่าง เนื่องจากในงานวิจัยครั้งนี้มีตัวอย่างของการศึกษาเพียง 99 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นการศึกษาครั้งแรก ซึ่งอาจจะไม่เพียงพอต่อการเป็นตัวแทนของการเกิดการกลายพันธุ์ในประชากรชาวไทยทั้งหมด รวมทั้งควรมีการศึกษาในประชากรภูมิภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย เพื่อนำมาเปรียบเทียบถึงความแตกต่างของความถี่ในการกลายพันธุ์ของยีน และควรมีการศึกษาการกลายพันธุ์ตรงตำแหน่งเอกซอนอื่น ๆ ของยีน เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นให้ครอบคลุมทั้งยีนในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นตัวแทนประชากรชาวไทยจากทุกภูมิภาค เพื่อเป็นประโยชน์ในการทำนายการเกิดโรคหรือปรับขนาดยาเพื่อป้องกันการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์

เอกสารอ้างอิง

- ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์. 2555. Single nucleotide polymorphism (SNP). <http://biology.ipst.ac.th/?p=953> (สืบค้นเมื่อ 20 มิถุนายน 2561).
- ธีระชัย ธนาคันต์. 2545. การกลาย (mutation). ใน *พันธุศาสตร์และพัฒนาการของมนุษย์*. หน้า 146-154.
- นันทพงศ์ บุญฤทธิ์. 2561. ผลของพัฒนาการตามวัยด้านร่างกายต่อเภสัชจลนศาสตร์และเภสัชพลศาสตร์ในผู้ป่วยเด็ก. *วารสารเภสัชกรรมไทย* 10 (2):462-476.
- นันทวัน นันทวนิช, ศศิวิมล แสงผล, ภิญญาญ โปพานิชพันธ์ และ พิณฑิพ. ม.ป.ป. กลไกการเกิดวิวัฒนาการ. https://il.mahidol.ac.th/e-media/150charles-darwin/Less5_5.html. (สืบค้นเมื่อ 17 มิถุนายน 2561).
- ศศิมา กุสุมา ณ.อยุธยา และ รัตนาภรณ์ คงคง. 2554. เภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) และเภสัชพลศาสตร์ (Pharmacodynamics). [http://www.ns.mahidol.ac.th/english/th/departments/MN/th/doc/km54/เภสัชจลนศาสตร์%20\(Pharmacokinetics\).pdf](http://www.ns.mahidol.ac.th/english/th/departments/MN/th/doc/km54/เภสัชจลนศาสตร์%20(Pharmacokinetics).pdf). (สืบค้นเมื่อ 8 พฤษภาคม 2561).
- อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และ ธนยชัย สุระ. 2534. ความรู้พื้นฐานเรื่องเอนไซม์ Polymerase Chain Reaction. *วารสารโลหิตวิทยา และเวชศาสตร์บริการโลหิต* 1 (4):469-477.
- Alkharfy, K. M., B. L. Jan, S. Afzal, F. I. Al-Jenoobi, A. M. Al-Mohizea, S. Al-Muhsen, R. Halwani, M. K. Parvez, and M. S. Al-Dosari. 2017. "Prevalence of UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms (UGT1A6 *2, 1A7 *12, 1A8 *3, 1A9 *3, 2B7 *2, and 2B15 *2) in a Saudi population." *Saudi Pharm J* 25 (2):224-230.
- Balliet, R. M., G. Chen, C. J. Gallagher, R. W. Dellinger, D. Sun, and P. Lazarus. 2009. "Characterization of UGTs active against SAHA and association between SAHA glucuronidation activity phenotype with UGT genotype." *Cancer Res* 69 (7):2981-9.
- Beaulieu, M., E. Levesque, D. W. Hum, and A. Belanger. 1996. "Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on C19 steroids." *J Biol Chem* 271 (37):22855-62.

- Beaulieu, M., E. Levesque, A. Tchernof, B. G. Beatty, A. Belanger, and D. W. Hum. 1997. "Chromosomal localization, structure, and regulation of the UGT2B17 gene, encoding a C19 steroid metabolizing enzyme." *DNA Cell Biol* 16 (10):1143-54.
- Bock, K. W. 2015. "Roles of human UDP-glucuronosyltransferases in clearance and homeostasis of endogenous substrates, and functional implications." *Biochem Pharmacol* 96 (2):77-82.
- Breastcancer.org. 2019. "Aromasin." Last Modified March 9, 2019 accessed June 15, 2019. https://www.breastcancer.org/treatment/hormonal/aromatase_inhibitors/aromasin.
- Bubna, A. K. 2015. "Vorinostat-An Overview." *Indian J Dermatol* 60 (4):419.
- CanadaResearchChairinPharmacogenomics(a). 2005. "UGT2B17 allele nomenclature." accessed July 2, 2019. <https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/04/HAP-UGT2B17.htm>.
- CanadaResearchChairinPharmacogenomics(b). 2005. "UGT2B17 SNPs table." accessed July 2, 2019. <https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/04/SNP-UGT2B17.htm>.
- CanadaResearchChairinPharmacogenomics(c). 2005. "UGT2B15 allele nomenclature." accessed July 2, 2019 <https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/04/HAP-UGT2B15.htm>.
- CanadaResearchChairinPharmacogenomics(d). 2005. "UGT2B15 SNPs table." accessed July 2, 2019 <https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/04/SNP-UGT2B15.htm>.
- Chanawong, A., P. I. Mackenzie, R. A. McKinnon, D. G. Hu, and R. Meech. 2017. "Exemestane and Its Active Metabolite 17-Hydroexemestane Induce UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 2B17 Expression in Breast Cancer Cells." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 361 (3):482-491..
- Cheetham, T. C., J. An, S. J. Jacobsen, F. Niu, S. Sidney, C. P. Quesenberry, and S. K. VanDenEeden. 2017. "Association of Testosterone Replacement With Cardiovascular Outcomes Among Men With Androgen Deficiency." *JAMA Intern Med* 177 (4):491-499.

- Chen, F., J. K. Ritter, M. G. Wang, O. W. McBride, R. A. Lubet, and I. S. Owens. 1993. "Characterization of a cloned human dihydrotestosterone/androstenediol UDP-glucuronosyltransferase and its comparison to other steroid isoforms." *Biochemistry* 32 (40):10648-57.
- Chung, J. Y., J. Y. Cho, K. S. Yu, J. R. Kim, H. R. Jung, K. S. Lim, I. J. Jang, and S. G. Shin. 2005. "Effect of the UGT2B15 genotype on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and drug interactions of intravenous lorazepam in healthy volunteers." *Clin Pharmacol Ther* 77 (6):486-94.
- Court, M. H., Q. Hao, S. Krishnaswamy, T. Bekaii-Saab, A. Al-Rohaimi, L. L. von Moltke, and D. J. Greenblatt. 2004. "UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 pharmacogenetics: UGT2B15 D85Y genotype and gender are major determinants of oxazepam glucuronidation by human liver." *J Pharmacol Exp Ther* 310 (2):656-65.
- Divakaran, K., R. N. Hines, and D. G. McCarver. 2014. "Human hepatic UGT2B15 developmental expression." *Toxicol Sci* 141 (1):292-9.
- Drabik, A., A. Bodzoń-Kułakowska, and J. Silberring. 2016. "Gel Electrophoresis." In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, edited by P. Ciborowski and J. Silberring, 115-143.
- DrugBank(a). 2019. "Vorinostat." Last Modified August 21, 2019, accessed June 13, 2019. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB02546>.
- DrugBank(b). 2019. "Exemestane." Last Modified August 21, 2019, accessed June 13, 2019. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00990>.
- DrugBank(c). 2019. "Testosterone." Last Modified August 21, 2019, accessed June 16, 2019. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00624>.
- Evans, W. E., and M. V. Relling. 1999. "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics." *Science* 286 (5439):487-91. doi: 10.1126/science.286.5439.487.
- Gregory, P. A., A. J. Hansen, and P. I. Mackenzie. 2000. "Tissue specific differences in the regulation of the UDP glucuronosyltransferase 2B17 gene promoter." *Pharmacogenetics* 200 (10):809-820.
- Gregory, P. A., and P. I. Mackenzie. 2002. "The homeodomain Pbx2-Prep1 complex modulates hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of the UDP-glucuronosyltransferase 2B17 gene." *Mol Pharmacol* 62 (1):154-61.

- Gsur, A., M. Preyer, G. Haidinger, G. Schatzl, S. Madersbacher, M. Marberger, C. Vutuc, and M. Micksche. 2002. "A polymorphism in the UDP-Glucuronosyltransferase 2B15 gene (D85Y) is not associated with prostate cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 (5):497-8.
- Hajdinjak, T., and B. Zagradisnik. 2004. "Prostate cancer and polymorphism D85Y in gene for dihydrotestosterone degrading enzyme UGT2B15: Frequency of DD homozygotes increases with Gleason Score." *Prostate* 59 (4):436-9.
- Handelsman, D.J. 2000. "Androgen Physiology, Pharmacology and Abuse." In *Endotext*, edited by K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, L. Perreault, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, D. L. Trencce, A. Vinik and D. P. Wilson. South Dartmouth (MA).
- HarvardHealthPublishing. 2018. "Is testosterone therapy safe? Take a breath before you take the plunge." Last Modified December 14, 2018, accessed June 17, 2019. <https://www.health.harvard.edu/mens-health/is-testosterone-therapy-safe-take-a-breath-before-you-take-the-plunge>.
- Hu, D.G., D. Gardner-Stephen, G. Severi, P.A. Gregory, J. Treloar, G.G. Giles, D.R. English, J.L. Hopper, W.D. Tilley, and P.I. Mackenzie. 2010. "A Novel Polymorphism in a Forkhead Box A1 (FOXA1) Binding Site of the Human UDP Glucuronosyltransferase 2B17 Gene Modulates Promoter Activity and Is Associated with Altered Levels of Circulating Androstane-3 ,17-diol Glucuronide." *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 78 (4):714-722.
- Jakobsson, J., L. Ekstrom, N. Inotsume, M. Garle, M. Lorentzon, C. Ohlsson, H. K. Roh, K. Carlstrom, and A. Rane. 2006. "Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism." *J Clin Endocrinol Metab* 91 (2):687-93.
- Jančová, P., and M. Šiller. 2012. "Phase II Drug Metabolism." In *Topics on Drug Metabolism* edited by In J. Paxton, 35-60.
- Karypidis, A. H., M. Olsson, S. O. Andersson, A. Rane, and L. Ekstrom. 2008. "Deletion polymorphism of the UGT2B17 gene is associated with increased risk for prostate cancer and correlated to gene expression in the prostate." *Pharmacogenomics J* 8 (2):147-51.

- Lampe, J. W., J. Bigler, A. C. Bush, and J. D. Potter. 2000. "Prevalence of polymorphisms in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B family: UGT2B4(D458E), UGT2B7(H268Y), and UGT2B15(D85Y)." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (3):329-33.
- Landry, K.K. , F.A. David, and D. Zeruesenay. 2014. "17-Hydroexemestane: A Potent Inhibitor of CYP19 (Aromatase) and Substrate of CYP3A." *Journal of Drug Metabolism and Toxicology* 5 (5):1-6.
- Levesque, E., M. Beaulieu, M. D. Green, T. R. Tephly, A. Belanger, and D. W. Hum. 1997. "Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene." *Pharmacogenetics* 7 (4):317-25.
- Luo, S., G. Chen, C. Truica, C. C. Baird, K. Leitzel, and P. Lazarus. 2018. "Role of the UGT2B17 deletion in exemestane pharmacogenetics." *Pharmacogenomics J* 18 (2):295-300.
- MacLeod, S. L., S. Nowell, J. Plaxco, and N. P. Lang. 2000. "An allele-specific polymerase chain reaction method for the determination of the D85Y polymorphism in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene in a case-control study of prostate cancer." *Ann Surg Oncol* 7 (10):777-82.
- Martin-Escudero, P., J. Munoz-Guerra, N. Del Prado, M. Galindo Canales, M. Fuentes Ferrer, S. Vargas, A. B. Soldevilla, E. Serrano-Garde, F. Miguel-Tobal, M. Maestro de Las Casas, and C. Fernandez-Perez. 2015. "Impact of UGT2B17 gene deletion on the steroid profile of an athlete." *Physiol Rep* 3 (12).
- Meech, R., D. G. Hu, R. A. McKinnon, S. N. Mubarakah, A. Z. Haines, P. C. Nair, A. Rowland, and P. I. Mackenzie. 2019. "The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms." *Physiol Rev* 99 (2):1153-1222. doi: 10.1152/physrev.00058.2017.
- Mouritsen, A., A. S. Busch, L. Aksglaede, E. Rajpert-De Meyts, and A. Juul. 2018. "Deletion in the uridine diphosphate glucuronyltransferase 2B17 gene is associated with delayed pubarche in healthy boys." *Endocr Connect* 7 (3):460-465.
- Murata, M., E. H. Warren, and S. R. Riddell. 2003. "A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion." *J Exp Med* 197 (10):1279-89.

- Packard, E., C. Campbell-Baird, K. Leitzel, S. M. Luo, G. Chen, and J. J. Zhu. 2018. "UGT2B17 deletion polymorphism and exemestane-induced toxicity." *Journal of Clinical Oncology* 36 (15).
- Park, J., L. Chen, L. Ratnashinge, T. A. Sellers, J. P. Tanner, J. H. Lee, N. Dossett, N. Lang, F. F. Kadlubar, C. B. Ambrosone, B. Zachariah, R. V. Heysek, S. Patterson, and J. Pow-Sang. 2006. "Deletion polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 and risk of prostate cancer in African American and Caucasian men." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 (8):1473-8.
- Park, J., L. Chen, K. Shade, P. Lazarus, J. Seigne, S. Patterson, M. Helal, and J. Pow-Sang. 2004. "Asp85tyr polymorphism in the udp-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 gene and the risk of prostate cancer." *J Urol* 171 (6 Pt 1):2484-8.
- Penner, N. , C. Woodward, and C. Prakash. 2012. *Drug metabolizing enzymes and biotransformation reactions*. 1 ed, *ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development*. John Wiley & Sons, Inc.: John Wiley & Sons, Inc.
- Rowland, A., J. O. Miners, and P. I. Mackenzie. 2013. "The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification." *Int J Biochem Cell Biol* 45 (6):1121-32.
- Russell, P.J. 2009. "DNA Mutation, DNA Repair, and Transposable Elements." In *iGenetics A Molecular Approach*, edited by B. Wilbur, 131-169.
- Srikanth, H.N. 2017. "Vertical Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)." accessed July 3, 2019. <https://www.slideshare.net/SrikanthSri89/vertical-gel-electrophoresis-sdspage>.
- Swanson, C., D. Mellstrom, M. Lorentzon, L. Vandenput, J. Jakobsson, A. Rane, M. Karlsson, O. Ljunggren, U. Smith, A. L. Eriksson, A. Belanger, F. Labrie, and C. Ohlsson. 2007. "The uridine diphosphate glucuronosyltransferase 2B15 D85Y and 2B17 deletion polymorphisms predict the glucuronidation pattern of androgens and fat mass in men." *J Clin Endocrinol Metab* 92 (12):4878-82.
- Thomas, K. 2013. "A Simple Method for Estimating the Rate of Transition vs. Transversion Mutations." Last Modified June 22, 2013, accessed July 1, 2019. <http://asserttrue.blogspot.com/2013/06/a-simple-method-for-estimating-rate-of.html>.

- Tomboc, M., and S. F. Witchel. 2003. "Frequencies of the D85 and Y85 variants of UGT2B15 in children and adolescent girls with hyperandrogenism." *J Pediatr Endocrinol Metab* 16 (5):719-26.
- Turgeon, D., J. S. Carrier, S. Chouinard, and A. Belanger. 2003. "Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics." *Drug Metab Dispos* 31 (5):670-6.
- Turgeon, D., J. S. Carrier, E. Levesque, B. G. Beatty, A. Belanger, and D. W. Hum. 2000. "Isolation and characterization of the human UGT2B15 gene, localized within a cluster of UGT2B genes and pseudogenes on chromosome 4." *J Mol Biol* 295 (3):489-504.
- UniProt. 1998. "UniProtKB - O75795 (UDB17_HUMAN)." Last Modified November 1, 1998, accessed June 10, 2019. <https://www.uniprot.org/uniprot/O75795>.
- UniProt. 2011. "UniProtKB - P54855 (UDB15_HUMAN)." Last Modified May 3, 2011, accessed June 6, 2019. <https://www.uniprot.org/uniprot/P54855>.
- Urashima, M., A. Nakashima, T. Hama, Y. Suzuki, H. Ohdaire, T. Akiba, M. Suzuki, M. Noya, Y. Tsumi, A. Mafune, K. Toda, K. Yokoyama, K. Wada, H. Kojima, and A. Okamoto. 2015. "UGT2B17 Deletion Polymorphism is a Risk Factor for Upper Aero digestive Tract Cancer in Japanese: A Case-Control Study." *Epidemiology (sunnyvale)* 5 (3).
- Williams, J. A., R. Hyland, B. C. Jones, D. A. Smith, S. Hurst, T. C. Goosen, V. Peterkin, J. R. Koup, and S. E. Ball. 2004. "Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios." *Drug Metab Dispos* 32 (11):1201-8.
- Wilson, W., 3rd, F. Pardo-Manuel de Villena, B. D. Lyn-Cook, P. K. Chatterjee, T. A. Bell, D. A. Detwiler, R. C. Gilmore, I. C. Valladeras, C. C. Wright, D. W. Threadgill, and D. J. Grant. 2004. "Characterization of a common deletion polymorphism of the UGT2B17 gene linked to UGT2B15." *Genomics* 84 (4):707-14.
- Wong, N. S., EZh Seah, L. Z. Wang, W. L. Yeo, H. L. Yap, B. Chuah, Y. W. Lim, P. C. Ang, B. C. Tai, R. Lim, B. C. Goh, and S. C. Lee. 2011. "Impact of UDP-gluconoryltransferase 2B17 genotype on vorinostat metabolism and clinical outcomes in Asian women with breast cancer." *Pharmacogenet Genomics* 21 (11):760-8.

- Yang, N., R. Sun, X. Liao, J. Aa, and G. Wang. 2017. "UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and their related metabolic cross-talk with internal homeostasis: A systematic review of UGT isoforms for precision medicine." *Pharmacol Res* 121:169-183.
- ZenInnovation. 2018. "การกลายพันธุ์ (mutation)." Last Modified February 1, 2018, accessed June 20, 2019. <https://zeninnovation.co.th/news-research/26859>.
- Zhang, H., A. Basit, D. Busch, K. Yabut, D. K. Bhatt, M. Drozdik, M. Ostrowski, A. Li, C. Collins, S. Oswald, and B. Prasad. 2018. "Quantitative characterization of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 in human liver and intestine and its role in testosterone first-pass metabolism." *Biochem Pharmacol* 156:32-42.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สำเนาหนังสือรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน
จากเวชระเบียนและสิ่งส่งตรวจจากร่างกายมนุษย์



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

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตำบลคลองส้ว อำเภอนาทวี
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 จันทร์तीयัง)

รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ภาคผนวก ข

การสุ่มเลือกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาโดยการใช้โปรแกรม Microsoft Office Excel

หมายเลขของตัวอย่างที่ทั้งบิดาและมารดานับถือศาสนาอิสลามมีทั้งหมด 138 ตัวอย่าง
ต้องการเลือกมาใช้ในการศึกษา 100 ตัวอย่าง

วิธีการ

1. ในเซลล์ A1 ใส่ชื่อคอลัมน์เป็น number จากนั้นใส่ number ของตัวอย่างตั้งแต่ A2: A139
และต้องการเลือกสุ่มตัวอย่างมา 100 ตัวอย่างไม่ซ้ำให้ผลลัพธ์อยู่ในเซลล์ D2: D101
2. เซลล์ B2 คีย์
=RAND() แล้วทำการ copy ลงไปถึง B139
3. เซลล์ C2 คีย์
=RANK(B2,\$B\$2:\$B\$139) แล้วทำการ copy ลงไปถึง B139
4. เซลล์ D2 คีย์
=INDEX(\$A\$2:\$A\$139,MATCH(ROWS(\$D\$2:D2),\$C\$2:\$C\$139,0)) กด Enter แล้ว
copy ลงไปถึง D101
5. กด F9 เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลง (ในการกด F9 แต่ละครั้ง ตัวอย่างจะมีการสุ่มไม่ซ้ำกัน)

ภาคผนวก ค

การคำนวณและวิธีการเตรียมสาร

1. การเตรียม 0.5M EDTA (pH 8.0)

- ส่วนผสม
 - EDTA (Ethylenedisminetetraacetic Acid, Disodium Salt, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) 186.12 กรัม
 - น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
- วิธีการเตรียม
 - ชั่ง EDTA 186.12 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH
 - นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการ autoclave จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารละลาย Tris acetate (TAE) buffer 50X

- ส่วนผสม
 - Trisma base 242 กรัม
 - Glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร
 - 0.5 M EDTA (pH 8) 100 มิลลิลิตร
- วิธีการเตรียม
 - นำ Trisma base 242 กรัม มาเติม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร เติม 0.5 M EDTA (pH 8) 100 มิลลิลิตร

สำหรับ working solution จะทำการเจือจางสารละลายให้ได้ 1X โดยการนำ Stock solution (50X) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 980 มิลลิลิตร

3. การเตรียม 1% Agarose Gel

- ส่วนผสม
 - Agarose gel 1.5 กรัม
 - TAE buffer 1X 100 มิลลิลิตร
- วิธีการเตรียม
 - ชั่งผง agarose gel 1.5 กรัม เติม TAE buffer 1X ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
 - นำเข้าไมโครเวฟเป็นเวลา 3 – 4 นาที จนผงเจลละลายหมด

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวสิริกัญญา อนันตเสนา	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	6010220063	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2560

ทุนการศึกษา

รับทุนผู้ช่วยสอนภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Anantasena, S. and Udomuksorn, W. 2019. The study of *UGT2B17* polymorphism in representative Thai Muslim population in Songkhla province. The 45th Congress on Science and Technology of Thailand. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand. October 7-9, 2019.