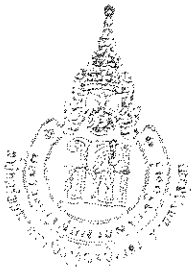


ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา

The Study of *UGT1A1* Polymorphism in Neonate at Songkhla Hospital

พีรพล สรยิง

Peerapon Sornying

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacology
Prince of Songkla University
2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วท.ม. QH461 พ64 2554 ฉ.2
Bib Key 351265
18 ต.ค. 2554

ชื่อวิทยานิพนธ์ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ใน
ทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา

ผู้เขียน นายพีรพล สรยิง

สาขาวิชา เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.วันดี อุดมอักษร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสเพ็ญ ชูนวล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองทอง ยุวถาวร)

.....กรรมการ

(ดร.วันดี อุดมอักษร)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสเพ็ญ ชูนวล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา
ผู้เขียน	นายพีรพล สรยิง
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) ซึ่งแปลรหัสจากยีน *UGT1A1* เป็นเอนไซม์ในเฟส 2 ที่ทำหน้าที่ควบจับยาหรือสารต่างๆ ทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ให้มีคุณสมบัติละลายน้ำได้มากขึ้น เพื่อกำจัดออกจากร่างกาย ปัจจุบันพบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT1A1* ที่ตำแหน่งต่างๆ ทั้งบริเวณ enhancer module, promoter, coding และ non-coding โดยพบมากกว่า 113 variants การกลายพันธุ์บางตำแหน่งอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ที่ทำให้การถอดรหัสของยีนและการทำงานของเอนไซม์ลดลง ส่งผลให้เกิดภาวะระดับบิลิรูบินสูงในทารกแรกเกิด เช่น โรค Crigler-Najjar ชนิด 1 และ 2 และโรค Gilbert และทำให้เกิดความเป็นพิษจากการใช้ยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ เช่น irinotecan indinavir เป็นต้น การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* พบความแตกต่างกันในคนเอเชีย ซึ่งพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G71R ซึ่งพบมากในญี่ปุ่น และ P229Q พบมากในคนจีน และ F83L, Y486D พบได้น้อย ส่วน $(TA)_7TAA$ พบมากในคนคอเคเซียน ยังไม่มีข้อมูลการรายงานในคนไทยภาคใต้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา 189 คน ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์และตำแหน่งควบคุมการแปลรหัสบนเอกซอน 1 โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) เพื่อตรวจสอบตำแหน่งการกลายพันธุ์ และเก็บข้อมูลทั่วไปของมารดา และทารกทั้งก่อนและหลังคลอดรวมทั้งประวัติครอบครัว

จากการศึกษาพบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* 4 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่บริเวณโปรโมเตอร์ 2 ตำแหน่ง คือ $(TA)_7TAA$ และ -64G>C และบริเวณควบคุมการแปลรหัส 2 ตำแหน่ง คือ 211G>A (G71R) และ 686C>A (P229Q) โดยมีความถี่แอลลีลคือ

$(TA)_7TAA$ (0.2037) [6/6= 0.6455, 6/7= 0.3016, 7/7= 0.0529], -64G>C (0.0291) [G/G= 0.9524, G/C= 0.037, C/C= 0.0106], 211G>A (0.0608) [G/G= 0.8889, G/A= 0.1005, A/A= 0.0106] และ 686C>A (0.0106) [C/C= 0.9788, C/A= 0.0212] และความถี่จีโนไทป์ที่กลายพันธุ์คือ $(TA)_7TAA$ (0.3545), 211G>A (0.1111), -64G>C (0.0476) และ 686C>A (0.0212) จากการวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กพบว่าการกลายพันธุ์ของยีนที่ตำแหน่ง $(TA)_7TAA$ และ 211G>A เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก และเมื่อวิเคราะห์ความไม่สมดุลจากการเชื่อมโยงยีนพบความเชื่อมโยงกันจำนวน 2 คู่ ($p < 0.05$) คือ $(TA)_7TAA$ & 211G>A และ $(TA)_7TAA$ & 686C>A และมีค่า AIC = 8.9 และ 3.6 ตามลำดับ สำหรับอาการตัวเหลืองหลังคลอดพบว่ามีทารกแรกเกิดที่มีอาการตัวเหลืองหลังคลอดจำนวน 100 คน (53%) เป็นชาย 55 คน และหญิง 45 คน เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการเกิดอาการตัวเหลืองกับตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 211G>A และ -64G>C มีความสัมพันธ์กับอาการตัวเหลืองมากที่สุด สามารถสรุปได้ว่า ความถี่แอลลีลที่มีการกลายพันธุ์ และเปอร์เซ็นต์ของการพบ SNPs ที่เกิดขึ้นบนยีน *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดในเขตพื้นที่ภาคใต้ ไม่เหมือนกับคนเอเชียในประเทศอื่นเช่น ญี่ปุ่น จีน เกาหลี แต่คล้ายกับคนในประเทศมาเลเซีย และอินโดนีเซีย โดย SNPs บางตำแหน่งอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิดได้ หรืออาการตัวเหลืองหลังคลอดสามารถบ่งบอกว่ายีน UGT1A1 มีการกลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจยีน UGT1A1 ก่อนให้การรักษาด้วยยาที่เป็นสับสเตรท เนื่องจากการสังเกตอาการตัวเหลืองด้วยสายตาอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ ทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาและเกิดประสิทธิภาพในการรักษาสูงสุด

Thesis Title	The Study of *UGT1A1* Polymorphism in Neonate at Songkhla Hospital
Author	Mr. Peerapon Sornying
Major Program	Pharmacology
Academic Year	2010

ABSTRACT

Bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1, encoded by *UGT1A1*, is an important enzyme responsible for endobiotic and xenobiotic such as drug and chemical metabolism (phase II) to be hydrophilic form in order to be excreted from the body. To date, *UGT1A1* polymorphism, more than 113 variants in an enhancer module, promoter, coding and non-coding regions have been reported. Some of them affect the enzyme activity, especially, the SNPs which cause reduction in the transcription activity and enzyme activity. The consequence is neonatal hyperbilirubinemia [Crigler-Najjar type 1 (CN1), CN2 and Gilbert's syndrome] and drug toxicity especially drugs which are substrates of UGT1A1 enzyme such as irinotecan, indinavir, etc. *UGT1A1* polymorphisms in Asian include G71R (mostly found in Japanese), P229Q (mostly found in Chinese), F83L, Y486D and $(TA)_7TAA$ (mostly found in Caucasians). For Southern Thai people, no information has been established. The purpose of this study was aimed to study the *UGT1A1* polymorphism in neonate at Songkhla hospital. The 189 cord blood samples were collected and genomic DNA was extracted, then *UGT1A1* exon1 and TATA box region were amplified by PCR. DNA sequencing was performed to detect the mutation. The medical history of mother, neonate and family were obtained before and after birth by questionnaires.

Among the neonate recruited in this studied, 4 known mutations were found: two in the promoter region [$(TA)_7TAA$ and -64G>C] and two in the coding region [211G>A (G71R) and 686C>A (P229Q)]. The orders of variant allele frequency were

$(TA)_7TAA$ (0.2037) [6/6= 0.6455, 6/7= 0.3016, 7/7= 0.0529], -64G>C (0.0291) [G/G= 0.9524, G/C= 0.037, C/C= 0.0106], 211G>A (0.0608) [G/G= 0.8889, G/A= 0.1005, A/A= 0.0106] and 686C>A (0.0106) [C/C= 0.9788, C/A= 0.0212], respectively. Only two SNPs [$(TA)_7TAA$ and 211G>A] were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). The strongest linkage disequilibrium was observed between $(TA)_7TAA$ & 211G>A (AIC= 8.9) and $(TA)_7TAA$ & 686C>A (AIC= 3.6), respectively. The genotype frequencies were $(TA)_7TAA$ (0.3545), 211G>A (0.1111), -64G>C (0.0476) and 686C>A (0.0212). We found 100 (53%) jaundice neonates (55 males and 45 females) and was found the association with -64G>C and 211G>A.

In summary, the allele frequency of the mutation and SNPs percentage on *UGT1A1* gene in Southern area neonates is different from that of Asian people in other countries such as Japan, China, Taiwan and Korea but similar to Malaysian and Indonesian. Some SNPs may be used as the marker of jaundice and the jaundice afterbirth may be used as a marker of *UGT1A1* mutation. Base on the finding, it is recommended that *UGT1A1* genotyping should be performed before UGT1A1's substrate treatment in the patients to maximize clinical benefit and avoid adverse effects.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้คงไม่สำเร็จลุล่วงได้หากไม่ได้รับความช่วยเหลือและความร่วมมือจากบุคคลและหน่วยงานต่างๆ ดังต่อไปนี้ ผู้เขียนกราบขอขอบพระคุณ ดร.วันดี อุดมอักษร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้โอกาส ให้คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำในการทำงานและส่งเสริมให้ผู้เขียนได้พัฒนาตนเองอย่างเต็มที่ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.โสเพ็ญ ชูนวล ที่ให้ความช่วยเหลือในการติดต่อบุคลากรและสถานที่ในการเก็บตัวอย่างเลือด และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์กับงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมือในงานวิจัย ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ประกอบด้วย รศ.ดร.กรองทอง ยุวถาวร ประธานฯ และผศ.ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์ กรรมการฯ สำหรับความอนุเคราะห์ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยาทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ทางเภสัชวิทยา และแนะนำประสบการณ์ต่างๆ ที่มีค่ายิ่งต่อการทำงาน รวมทั้งให้คำปรึกษา และแนะนำตลอดการศึกษาในหลักสูตรนี้

ขอขอบพระคุณพี่พยาบาลห้องคลอด และหอผู้ป่วยหลังคลอด ตึกสูติกรรม 1 และ 2 โรงพยาบาลสงขลา สำหรับความอนุเคราะห์ในการเก็บเลือดจากสายสะดือทารก เก็บข้อมูลแบบสอบถามทั้งก่อนคลอดและหลังคลอด และให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณที่ใช้ในการวิจัยจากทางบัณฑิตวิทยาลัย และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชวิทยา ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเป็นตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ๆ เพื่อน และน้องๆ ภาควิชาเภสัชวิทยาทุกท่าน และคุณเครือวัลย์ ห้วนก้ง ที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจให้คำปรึกษาตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมา

พีรพล สรยิง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการศึกษา	59
บทที่ 4 ผลการศึกษา	68
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	83
เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก	99
ภาคผนวก ข	100
ภาคผนวก ค	105
ประวัติผู้เขียน	107

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	*UGT1A1* allele nomenclature	29
2-2	ระดับของ total serum bilirubin กับน้ำหนักทารกที่คลอดก่อนกำหนด	39
2-3	ค่า total serum bilirubin โดยประมาณเมื่อเทียบกับระดับความเหลืองที่เห็นจากสายตา	40
2-4	สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อตัดเบสที่ตำแหน่งจำเพาะ	49
3-1	การศึกษาความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ในประชากรของไทย	62
3-2	ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน *UGT1A1* ที่เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งตำแหน่งของ TATA box และบริเวณที่มีการแปลรหัสในส่วนของเอกซอน1	65
3-3	Reaction mixture สำหรับการทำ PCR	66
4-1	ข้อมูลทั่วไปของทารกแรกเกิดโรงพยาบาลสงขลา (n = 189)	70
4-2	ความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ของทารกแรกเกิดโรงพยาบาลสงขลา (n = 189)	70
4-3	ความสัมพันธ์ระหว่างศาสนากับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ของทารกแรกเกิดโรงพยาบาลสงขลา (n = 189)	71
4-4	ความสัมพันธ์ระหว่างอาการเหลืองหลังคลอดกับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ของทารกแรกเกิดโรงพยาบาลสงขลา (n = 189)	71
4-5	ผลการวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา (n = 189)	75
4-6	ความถี่จีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* และความสัมพันธ์กับอาการตัวเหลืองหลังคลอด (n = 189)	76
4-7	การวิเคราะห์ความไม่สมดุลจากการเชื่อมโยงยีน (linkage disequilibrium) ของยีน *UGT1A1*	82

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
2-1	การจัดจำแนกเอนไซม์ของกระบวนการเมแทบอลิซึมในเฟส 1 และ 2	6
2-2	ปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน (glucuronidation)	6
2-3	กระบวนการคอนจูเกชันของสับสเตรทที่ละลายในไขมัน โดยเอนไซม์ UGTs ที่แขวนตัวอยู่ในผนังเซลล์เมมเบรนของ endoplasmic reticulum และมี UDPGA เป็นโคสับสเตรท	7
2-4	โครงสร้างทางเคมี และตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน	8
2-5	กลุ่มของเอกซอนในยีน *UGT1* และ *UGT2* families	11
2-6	Phylogenetic tree ของยีน *UGTs* ในคน	12
2-7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT1A1* บนตำแหน่งโปรโมเตอร์และบริเวณที่มีการแปลรหัสบนเอกซอน 1 ถึง 5	14
2-8	ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ UGT1A1	15
2-9	การสังเคราะห์บิลิรูบิน และปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันกับบิลิรูบิน	16
2-10	ขั้นตอนการแปรรูปและการกำจัดบิลิรูบินออกจากร่างกาย	19
2-11	ขั้นตอนการเมแทบอลิซึมยา irinotecan และการขนส่งสารเมแทบอไลต์ของยา irinotecan ออกจากร่างกาย	23
2-12	โครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่ม HIV protease inhibitors	24
2-13	กลไกการต้านการเกิดการกลายพันธุ์ของสาร estradiol และสารเมแทบอไลต์โดยอาศัยเอนไซม์ SULT1A1 และ UGT1A1	24
2-14	กลไกการรักษาด้วยวิธีการส่องไฟ	41
2-15	องค์ประกอบของเลือดหลังจากการปั่นแยก	42
2-16	ขั้นตอนการทำ Polymerase Chain Reaction	45
3-1	PCR cycle ของการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR	66
4-1	1% agarose gel electrophoresis ของชิ้นดีเอ็นเอของยีน *UGT1A1*	72
4-2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT1A1* บนบริเวณตำแหน่งโปรโมเตอร์และบริเวณที่มีการแปลรหัสของเอกซอน 1 ถึง 5	73

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4-3	Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง TATA box ของยีน *UGT1A1*: *UGT1A1*28* (homozygous)	77
4-4	Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง TATA box ของยีน *UGT1A1*: *UGT1A1*28* (heterozygous)	78
4-5	Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ -64 ของยีน *UGT1A1*: *UGT1A1*81*	79
4-6	Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณที่มีการแปลรหัสบนเอกซอน 1 ของยีน *UGT1A1* ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 211 G>A: *UGT1A1*6*	80
4-7	Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณที่มีการแปลรหัสบนเอกซอน 1 ของยีน *UGT1A1* ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 686 C>A: *UGT1A1*27*	81

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

%	=	percentage
1NP glucuronidation	=	1-naphthol glucuronidation
4MU	=	4-methylumbelliferone
AhR	=	aryl hydrocarbon receptor
AIC	=	Akaike's information criterion
APC	=	7-ethyl-10-[4-*N*-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecine
bp	=	base pairs
BSP	=	bromsulfophthalein
CAR	=	constitutive androstane receptor
cDNA	=	complementary DNA
CN	=	Crigler-Najar syndrome
Co.,ltd	=	Company Limited
CYP	=	cytochrome P450
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytidine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxynucleoside triphosphate
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
et al.	=	et alli (and others)
etc.	=	Et Cetera
Fe^{2+}	=	ferrous ion
gDNA	=	genomic DNA
HIV	=	Human immunodeficiency virus

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

Inc.	=	Incorporate
kb	=	kilo base pair
kDa	=	kilodaltons
Mg^{+}	=	magnesium ion
NaCl	=	sodium chloride
NPC	=	7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino) - Carbonyloxycamptothecine
°C	=	degree Celsius
p	=	*p*- value
PBREM	=	phenobarbital-responsive enhancer glement module
PCR	=	polymerase chain reaction
PCR	=	polymerase chain reaction
pH	=	potential of Hydrogen ion
PXR	=	the pregnane X receptor
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	revolution per minute
S.E.	=	standard error of mean
SN-38	=	7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin
SN-38G	=	10-O-glucuronyl-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin
SNP	=	single nucleotide polymorphism
Taq polymerase	=	*Termus aquaticus* polymerase
UDPGA	=	uridine diphosphate glucuronic acid
UGT	=	uridine diphosphat glucuronosyltransferase

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

Nucletides

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

Amino acid codes

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

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ระยะ 2 เป็นกระบวนการการกำจัดสารพิษ (detoxification) โดยทำให้ได้ผลผลิตเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ดี (hydrophilic compound) และพร้อมที่จะถูกกำจัดออกจากร่างกาย (excretion) ซึ่งปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน (glucuronidation) เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมระยะ 2 โดยมีเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยา ทำหน้าที่ควบจับสารที่ถูกสร้างภายในร่างกาย (endogenous compounds) และสารจากภายนอกร่างกาย (xenobiotics) โดยมีโคสับสเตรท คือ UDP-glucuronic acid (UDPGA) ได้เป็นกลูคิวโรไนด์เมแทบอไลต์ที่ละลายน้ำได้ดี ปัจจุบันมีเอนไซม์ UGTs ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 4 กลุ่ม คือ UGT1A, UGT2, UGT3 และ UGT8 (Mackenzie *et al.*, 2005) ซึ่งแต่ละกลุ่มจำแนกตามความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์

สำหรับเอนไซม์ UGT1A1 เป็นเอนไซม์สำคัญที่มีความจำเพาะในการแปรรูปของ บิลิรูบิน (bilirubin) (Babaoglu *et al.*, 2006) โดยมีสับสเตรท (substrate) ที่เป็นยาหรือสารเคมี เช่นยา irinotecan, indinavir, lamotrigine, flutamide, 17-α-ethinylestradiol เป็นต้น ดังนั้นหากมีความผิดปกติของการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ จะทำให้การกำจัดออกของบิลิรูบินออกจากร่างกายช้าลง และเกิดการคั่งของบิลิรูบินในร่างกายทำให้เกิดภาวะบิลิรูบินสูงในเลือด (hyperbilirubinemia) [ระดับบิลิรูบินในเลือดเท่ากับ 17-18 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร] มักพบได้บ่อยในเด็กทารกแรกเกิด โดยการทำงานของเอนไซม์ในตับของทารกยังไม่สมบูรณ์ทำให้มีการกำจัดสารบิลิรูบินออกช้า ความผิดปกตินี้มีสาเหตุจากการคั่งของ unconjugated bilirubin ในร่างกาย ทำให้มีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง (jaundice) บางรายอาจถึงขั้นเกิดอาการ kernicterus คือมีการทำลายของสมองได้ เอนไซม์ UGT1A1 ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากยีน *UGT1A1* ปัจจุบันมีรายงานการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* มากกว่า 113 variant (http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm) ส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติของเอนไซม์ และทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรค แบ่งเป็น 3 ชนิดตามความรุนแรงของอาการ คือ 1) โรค Crigler–Najjar ชนิด 1 เป็นชนิดที่มีความรุนแรงมากที่สุด มีระดับบิลิรูบินในเลือดสูงมากอยู่ในช่วง 18-45 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยมีการสูญเสียทั้งปริมาณและประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ส่วนใหญ่มีอาการเหลืองหลัง

คลอดทันที มีการทำลายของสมองจากการตั้งของบิลิรูบินในสมอง และมักเสียชีวิตหลังคลอด 2) โรค Crigler–Najjar ชนิด 2 เป็นชนิดที่มีความรุนแรงปานกลาง มีระดับบิลิรูบินในเลือดอยู่ในช่วง 6-25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยที่เอนไซม์สามารถทำงานได้เพียง 10% ของภาวะปกติ และ 3) Gilbert's syndrome เป็นชนิดที่มีความรุนแรงน้อย มีระดับบิลิรูบินในเลือดน้อยกว่า 4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โดยเอนไซม์ทำงานเพียง 30% ของภาวะปกติ มีอุบัติการณ์ในการเกิดมากกว่า 2 ชนิดแรก โดยผู้ป่วยจะไม่แสดงอาการ (Sugatani *et al.*, 2001) แต่จะแสดงอาการเมื่อเกิดภาวะเครียด อดอาหาร การได้รับยาบางชนิดที่เป็นสับสเตรท เช่น ยารักษามะเร็ง ยาต้านไวรัส ยาคุมกำเนิด เป็นต้น

สำหรับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่พบบ่อยในคน Caucasian พบ *UGT1A1*28* ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ในส่วนของ TATA box โดยมีการแทรก (insertion) ของ thymine และ adenine (TA) มากกว่า 6 ชุด คือ $(TA)_7TAA$ และมีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 35-40% (Monaghan *et al.*, 1996) การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้มีผลทำให้การถอดรหัส (transcription) ของยีนลดลง 70% (Bosma *et al.*, 1995) ส่วนในคนแถบเอเชียเช่น ญี่ปุ่น ไต้หวัน เกาหลี จะพบ *UGT1A1*6* (G71R) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบริเวณเอกซอน 1 เกิดจากการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 211 จาก guanine (G) เป็น cytosine (C) โดยทำให้กรดอะมิโนโคดอนที่ 71 เปลี่ยนจาก glycine (G) เป็น argenine (R) และมีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 13-23% (Huang *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบ *UGT1A1*27* (P229Q) เกิดจากการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 686 จาก cytosine (C) เป็น adenine (A) โดยทำให้กรดอะมิโนโคดอนที่ 229 เปลี่ยนจาก proline (P) เป็น glutamine (Q) โดยมีความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 3% (Akaba *et al.*,1998; Huang *et al.*, 2000) การกลายพันธุ์ทั้งสองตำแหน่งนี้ ซึ่งอยู่ในบริเวณที่มีการแปลรหัสโปรตีน (coding region) มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง 34-74% ขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท (Udomuksorn *et al.*, 2007) ในคนไทยได้มีการศึกษารายงานทั้งในคนปกติ ทารกแรกเกิด ผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมีย และผู้ป่วยโรคเอดส์ พบว่าการกลายพันธุ์ชนิด *UGT1A1*28* มีความถี่สูงกว่า *UGT1A1*6* (Boyd *et al.*, 2006; Udomuksorn *et al.*, 2007; Prachukthum *et al.*, 2009) แต่การศึกษาดังกล่าวใช้จำนวนตัวอย่างน้อยและไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับถิ่นกำเนิดว่าอยู่ในภูมิภาคใด

การทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ที่ผิดปกติจากการกลายพันธุ์ดังกล่าว จึงมีความสำคัญในแง่ของการเกิดโรคทางพันธุกรรมที่มีระดับบิลิรูบินสูงในทารกแรกเกิด และมีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา รวมทั้งอาการไม่พึงประสงค์ของยาอีกหลายชนิดที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ UGT1A1 โดยยังไม่มีผู้ศึกษาและรายงานความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* (*UGT1A1* polymorphism) ของประชากรในพื้นที่ภาคใต้ ดังนั้นการรายงานความถี่ของ *UGT1A1* polymorphism จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการทำวิจัย เมื่อทราบความถี่ของการ

เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับประชากรในเขตอำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ที่อาศัยอยู่โดยรอบของโรงพยาบาลสงขลา หากมีความถี่ในการเกิดสูงและการกลายพันธุ์นั้นทำให้การทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ลดลง จะทำให้แพทย์หันมาสนใจ และให้ความสำคัญก่อนการรักษาด้วยยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ชนิดนี้ โดยเฉพาะยาที่มีอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรง เช่น irinotecan indinavir เป็นต้น เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาได้

การศึกษานี้ทำการตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดชาวไทยที่เกิดในโรงพยาบาลสงขลา โดยใช้วิธีเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *UGT1A1* กับ ไพรเมอร์ที่ครอบคลุมส่วนของโปรโมเตอร์ และบริเวณที่มีการแปลรหัสในส่วนของเอกซอน 1 และตรวจหาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์โดยวิธีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

บทที่ 2

บทตรวจเอกสาร

1. กระบวนการแปรรูป (biotransformation) ของสารต่าง ๆ

โดยส่วนใหญ่แล้วยาหรือสารที่ได้รับมาจากภายนอกร่างกายจะถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบไหลเวียนของร่างกายในรูปของสารที่ละลายในไขมัน (lipophilic substances) สารดังกล่าวนี้ไม่สามารถขับออกจากร่างกายได้ โดยจะถูกดูดซึมกลับได้ทางไต หรือจาก gastrointestinal tract ตัวอย่างสาร เช่น ฮอร์โมน สารสื่อประสาท จำเป็นต้องถูกแปรรูปก่อนที่จะกำจัดออกจากร่างกาย โดยอาศัยปฏิกิริยาจากเอนไซม์ในร่างกาย กระบวนการแปรรูปสารทั้งสารจากภายนอกร่างกาย และสารภายในร่างกายจะมีกระบวนการที่คล้ายกันคือ เปลี่ยนจากสารที่ละลายในไขมันไปเป็นสารที่ละลายน้ำได้ และขับออกจากร่างกายในรูปสารเมแทบอไลต์ โดยทั่วไปแล้วกระบวนการแปรรูปสารจะแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ 1) กระบวนการเมแทบอลิซึมเฟสที่ 1 (หรือ functionalization reactions) เป็นการเติมหมู่ฟังก์ชันไปในโครงสร้าง เพื่อให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น ได้แก่ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ออกซิเดชัน (oxidation) รีดักชัน (reduction) เป็นต้น 2) กระบวนการเมแทบอลิซึมเฟสที่ 2 (conjugation reactions) เป็นการควบจับกับโค-สับเตรท เพื่อให้สารละลายน้ำและพร้อมที่จะขับออกจากร่างกาย ได้แก่ glucuronidation, sulfation, methylation, acetylation, amino acid conjugation และ glutathione conjugation เป็นต้น กระบวนการกำจัดสารออกจากร่างกายจะรวมถึงตัวขนส่งสาร (transporters) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการนำสารเข้าและออกจากเซลล์

2. เอนไซม์ในกระบวนการแปรรูปยา (drug metabolizing enzymes)

เอนไซม์ทำหน้าที่แปรรูปสารต่างๆ เช่น ยา สารที่ถูกสร้างในร่างกาย สารเคมี สารพิษ เป็นต้น ทำให้สามารถกำจัดออกจากร่างกายได้ โดยกลไกเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมเฟสที่ 1 เป็นกระบวนการที่อาศัยเอนไซม์ในกลุ่มของ cytochrome P450 (CYPs), alcohol dehydrogenase (ADH), aldehyde dehydrogenase (ALDH) เป็นต้น (รูปที่ 2-1) โดยมีเอนไซม์ CYPs เป็นเอนไซม์กลุ่มสำคัญในการแปรรูปยาในระยะนี้ สารบางชนิดที่ไม่ผ่านการเมแทบอลิซึมในเฟสที่ 1 หรือถูกแปรรูปเพียงเล็กน้อย หรือร่างกายไม่สามารถกำจัดออกได้ ร่างกายจะมีกลไกนำสารเหล่านั้นเข้าสู่ในเฟสที่ 2 ต่อไป โดยจะเกิดการควบจับกันของสารในกระบวนการคอนจูเกชัน (conjugation) โดย

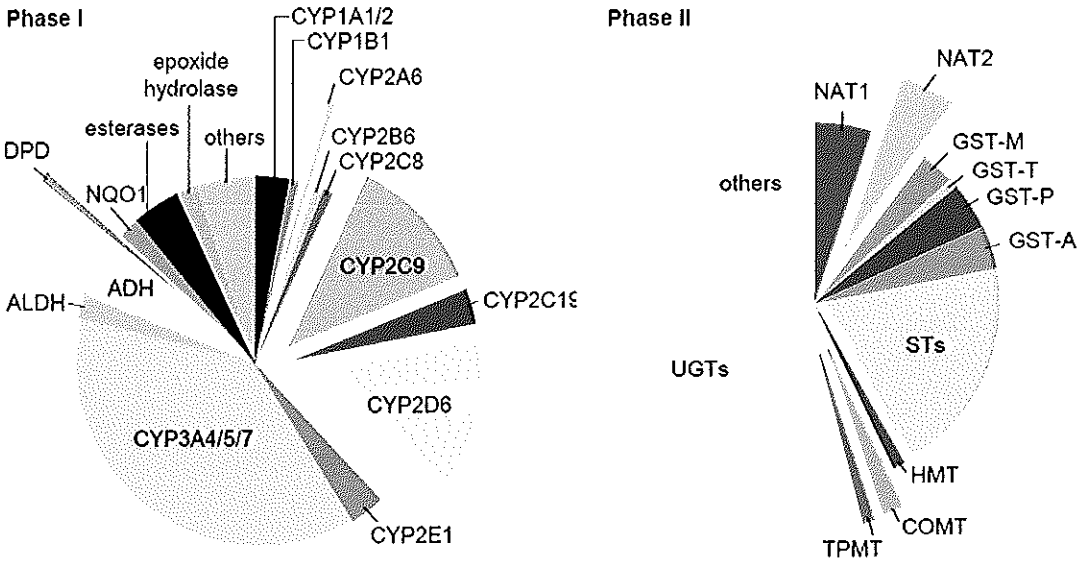
เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน (glucuronidation reaction) เป็นต้น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสำคัญในเฟสที่ 2 อาศัยเอนไซม์ uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferases (UGTs), N-acetyltransferase (NAT), sulfonyltransferases (STs) เป็นต้น (รูปที่ 2-1) ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันที่อาศัยเอนไซม์ UGTs และ UDPGA เป็นโคสับสเตรทในการเกิดปฏิกิริยา (รูปที่ 2-2) ปฏิกิริยาดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการแปรรูปและกำจัดออกของสารพิษ ทำให้สารสามารถละลายน้ำได้ดี ซึ่งจะช่วยในการขนส่งออกนอกเซลล์ และกำจัดออกจากร่างกายทางน้ำดี และปัสสาวะได้ (Tukey and Strassburg, 2000) โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีกระบวนการดังกล่าวที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยความแตกต่างทางเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) เภสัชพลศาสตร์ (pharmacodynamics) การเจริญเติบโต (growth) และพันธุกรรม (genetic)

2.1 ปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน (glucuronidation)

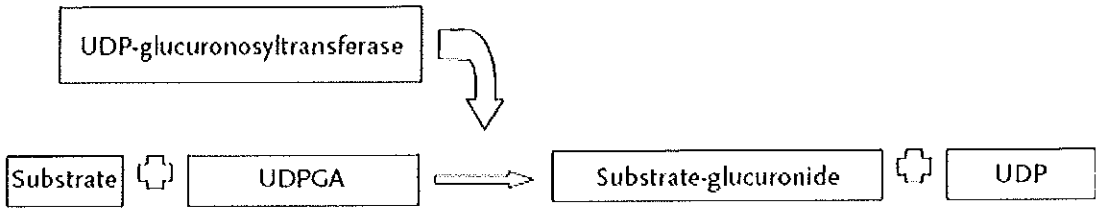
กระบวนการแปรรูปของสารหรือปฏิกิริยาการควบจับโดยการสร้างพันธะโควาเลนต์(covalent linkage) กับสับสเตรทและโคสับสเตรทได้เป็นโมเลกุลของสารที่มีขั้วและละลายน้ำได้ดี โดยอาศัยเอนไซม์ transferase เปลี่ยนเป็นสารที่กำจัดออกจากร่างกายได้ ซึ่งปฏิกิริยากลูคิวโรนิเด-ชันในเฟสที่ 2 จะถูกแคตาไลซ์ โดยอาศัยเอนไซม์กลุ่ม UGTs โดยการเติมของหมู่ไกลโคซิล (glycosyl group) จาก nucleotide sugar ได้เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่ละลายน้ำได้ ปฏิกิริยาการคอนจูเกชันเกิดขึ้นที่ nucleophilic functional centers ของสับสเตรท ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา สารประกอบที่ได้นี้เป็นสารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน โดยมี UDPGA เป็นสารโคสับสเตรทในการเกิดปฏิกิริยา ได้ผลผลิตเป็นกลูคิวโรไนด์ของสับสเตรทที่ละลายน้ำได้ดี (de Wildt *et al.*, 1999; King *et al.*, 2000) (รูปที่ 2-3)

ตำแหน่งที่เกิดการควบจับของสารตั้งต้นในปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันมี 4 ชนิด แบ่งตามตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันกับการจับกับโคสับสเตรท คือ (รูปที่ 2-4)

1) O-glucuronides: ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันคือ หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group: OH) ของสารตั้งต้น ตัวอย่างเช่น naphthol, acetaminophen, codeine, morphine, naloxone, oxazepam เป็นต้น และหมู่คาร์บอกซิล (carboxylic acid group: COOH) ของสารตั้งต้น เช่นบิลิรูบิน, diflunisal, diclofenac, vaproic acid เป็นต้น

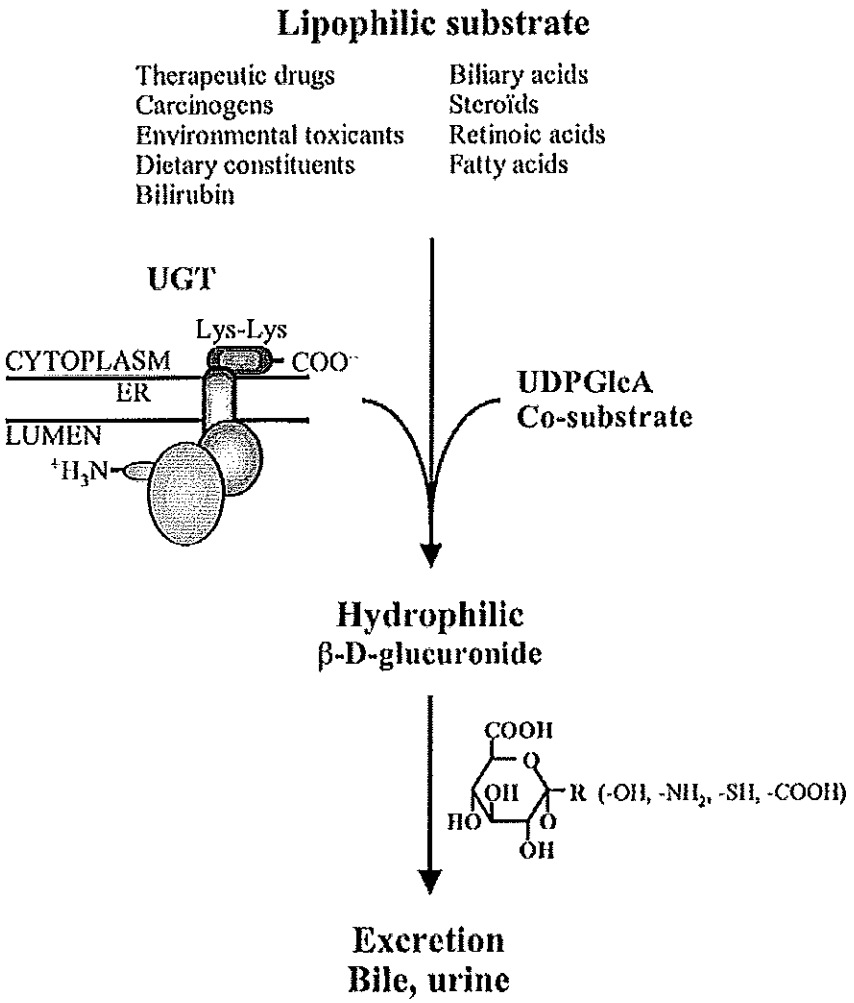


รูปที่ 2-1 การจัดจำแนกเอนไซม์ของกระบวนการเมแทบอลิซึมในเฟส 1 (phase I) และเฟส 2 (phase 2) (Phase I: ADH = alcohol dehydrogenase, ALDH = aldehyde dehydrogenase, CYP = cytochrome P450, DPD = dihydropyrimidine dehydrogenase, NQO1 = NADPH: qinone oxidoreductase, Phase II: COMT = catechol *O*-methyltransferase, GST = glutathione S-transferase, HMT = histamine methyltransferase, NAT = N-acetyltransferase, STs = sulfotransferases, TPMT = thiopurine methyltransferase, UGTs = uridine 5'-triphosphate glucuronosyltransferases) (Evans and Relling, 1999)

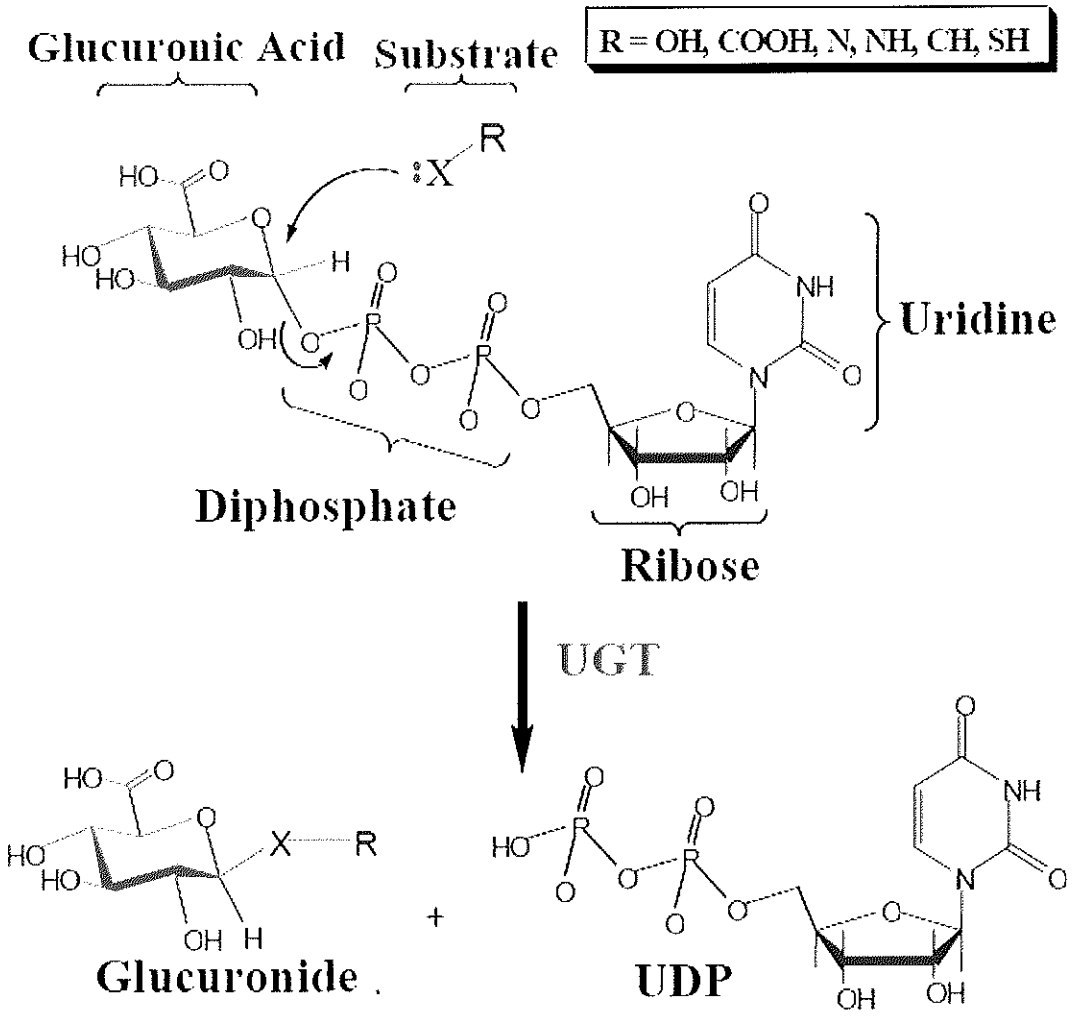


Abbreviations: UDP = uridine 5'- diphosphate; UDPGA = uridine 5'diphosphoglucuronic acid

รูปที่ 2-2 ปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน (glucuronidation) (de Wildt *et al*, 1999)



รูปที่ 2-3 กระบวนการคอนจูเกชันของสับสเตรทที่ละลายในไขมัน โดยเอนไซม์ UGTs ที่แขวนตัวอยู่ในผนังเซลล์เมมเบรนของ endoplasmic reticulum และมี UDPGA เป็นโคสับสเตรท และได้สารเมแทบอไลต์ที่ละลายน้ำได้ดี สามารถขับออกทางน้ำดี และปัสสาวะได้ (Guillemette, 2003)



รูปที่ 2-4 โครงสร้างทางเคมีและตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน (UGT= เอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase, UDPGA= UDP-glucuronic acid เป็นโคสับสเตรท และ UDP= uridine diphosphate) (Udomuksorn, 2006)

2) N-glucuronides: ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันคือ หมู่อะมิโน (amino group: NH_2) ของสารตั้งต้น ตัวอย่างเช่น aniline, benzidine, lamotrigine เป็นต้น

3) S-glucuronides: ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันคือหมู่ thiol (thiol group: SH) ของสารตั้งต้น ตัวอย่างเช่น diethyldithiocarbamate, thiophenol เป็นต้น

4) C-glucuronides: ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันคืออะตอมของคาร์บอน (carbon atom) ที่ตำแหน่ง nucleophilic ของสารตั้งต้น ตัวอย่างเช่น phenylbutazone เป็นต้น

ตัวอย่างสารที่ต้องอาศัยเอนไซม์ UGTs ในปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันในการแปรรูป เช่น สารที่สร้างจากภายในร่างกาย คือ บิลิรูบิน กรดน้ำดี ไทรอกซีน (thyroxine) สเตียรอยด์ (steroids) และเอสโตรเจน (estrogen) (Burchell *et al.*, 1995) และยารักษาโรคบางชนิด เช่น มอร์ฟีน อะเซตามิโนเฟน (acetaminophen), oxazepam, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) และ 17-α-ethinylestradiol เป็นต้น เอนไซม์ UGTs มีความสำคัญในการกำจัดสารพิษของยาในกลุ่มของยาต้านไวรัส ยารักษาโรคมะเร็ง หรือสารที่ทำให้เกิดการก่อรูปวิรูป ซึ่งสารกลุ่มนี้อาจได้รับมาจากอาหาร หรือเป็นสารพิษที่มีการปนเปื้อนในอากาศ (de Wildt *et al.*, 1999; King *et al.*, 2000)

2.2 เอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferases (UGTs)

เอนไซม์ UGTs เป็นเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมเฟสที่ 2 ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง nucleophilic functional centers เช่นตำแหน่งของคาร์บอน ซัลเฟอร์ ไนโตรเจน และออกซิเจน (ที่หมู่ hydroxyl group หรือ carboxylic acids) ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา สารประกอบที่ได้นี้เป็นสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการกลูคิวโรนิเดชัน โดยมี UDPGA เป็นสารโคสับสเตรทในการเกิดปฏิกิริยา ได้ผลผลิตเป็นกลูคิวโรไนด์ของสารตั้งต้นที่ละลายน้ำได้ดี และสามารถกำจัดออกจากร่างกายได้

2.3 Nomenclature of UGTs

ปัจจุบันได้มีการศึกษาพบว่า ยีนของเอนไซม์ UGTs ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ *UGT1, UGT2, UGT3* และ *UGT8* ซึ่งเอนไซม์ UGT1 และ UGT2 เป็นเอนไซม์ที่บทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึมสารต่างๆ ทั้งภายนอกและภายในร่างกายในเฟสที่ 2 (Gong *et al.* 2001; Mackenzie *et al.*, 2005)

1) *UGT1* family

ยีน *UGT1* ของคนอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 ตำแหน่ง q37 มีขนาดประมาณ 200 kb และประกอบด้วย 13 individual promoter และเอกซอน 1 (*UGT1A1, UGT1A2P, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A9, UGT1A13P UGT1A10, UGT1A8, UGT1A11P* และ *UGT1A12P*) โดยมีการใช้เอกซอน 2-5 ร่วมกันใน *UGT1* family (รูปที่ 2-5ก) สายโพลีเพปไทด์ของเอกซอน *1A1* และ *1A6* มีความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 50% ซึ่งถูกแยกจากเอกซอนกลุ่มอื่นๆ และแยกเอกซอน *1A* เป็น 2 กลุ่มคือ *1A2P-1A5* และ *1A7-1A13P* ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 75-92% แต่ละเอกซอนมีโปรโมเตอร์ที่ต่างกัน ซึ่งคอยควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ให้แตกต่างกัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันกับบิลิรูบิน เอสโตรเจน และยาบางชนิด เป็นต้น ในการแปรรูปและกำจัดออกจากร่างกาย

2) *UGT2* family

ยีน *UGT2* ของคนอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 ตำแหน่ง q13 แบ่งออกเป็น 2 subfamilies คือ *UGT2A* 3 ชนิด คือ *UGT2A1, UGT2A2* และ *UGT2A3* และ *UGT2B* 12 ชนิด (7 ยีน และ 5 ซูโดยีน) คือ *UGT2B4, UGT2B24P, UGT2B25P, UGT2B28, UGT2B11, UGT2B7, UGT2B26P, UGT2B27P, UGT2B10, UGT2B15, UGT2B17* และ *UGT2B29P* (รูปที่ 2-5ข) ข้อแตกต่างกับกลุ่ม *UGT1* คือ UGT2 ประกอบด้วย 6 เอกซอน ซึ่งไม่มีการใช้ exon ร่วมกันในกลุ่ม UGT2 ยกเว้น *UGT2A1* และ *UGT2A2* โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันกับกรดน้ำดี สเตียรอยด์ ฮอร์โมน และยารักษาโรคบางชนิด

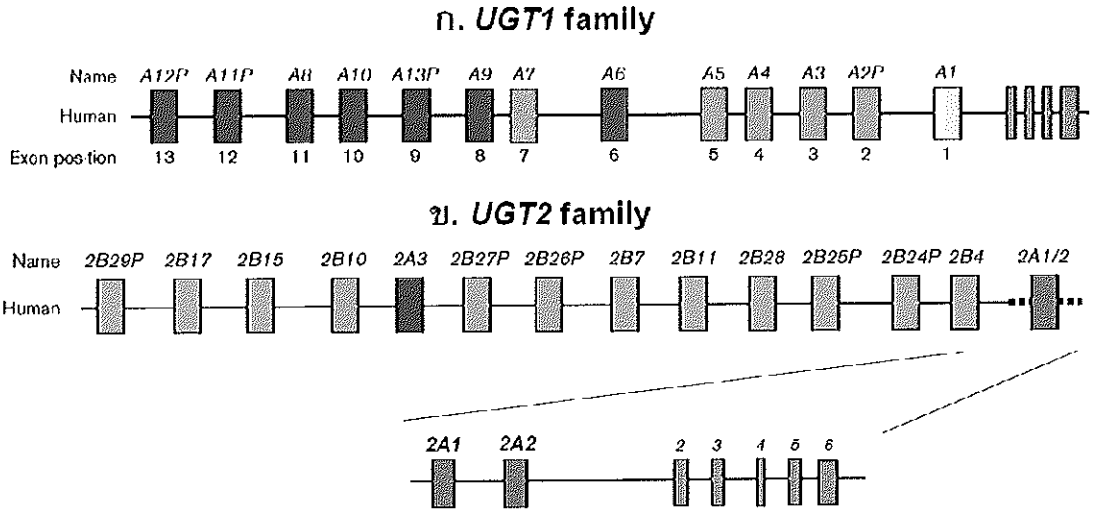
3) *UGT3* family

ยีน *UGT3* ของคนอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 5 ตำแหน่ง p13.2 ซึ่งประกอบด้วย 7 เอกซอน มีขนาดประมาณ 76 kb เมื่อถอดรหัสและแปลรหัสยีนได้โปรตีน 523 ตัว โดยยีน *UGT3* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนในกลุ่ม *UGT1, UGT2* และ *UGT8* ประมาณ 30% โดยมีอยู่ 2 ชนิดคือ *UGT3A1* และ *UGT3A2*

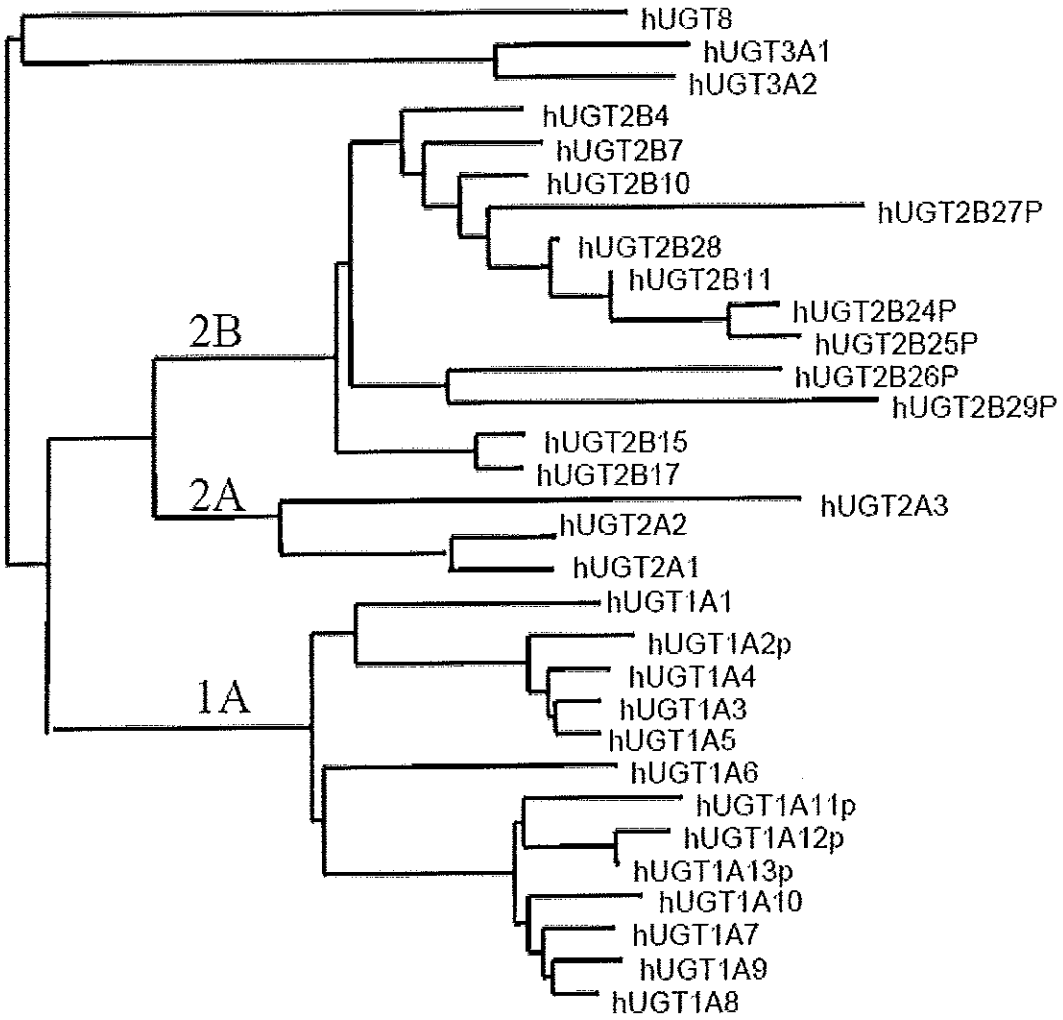
4) *UGT8* family

ยีน *UGT8* ในคนประกอบด้วย 6 เอกซอน เข้ารหัสได้เอนไซม์ UDP galactose-ceramide galactosyltransferase โดยมี 5 เอกซอน อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 ตำแหน่ง q26

Phylogenetic tree ของยีน *UGTs* ในคน 4 family แสดงในรูปที่ 2-6



รูปที่ 2-5 กลุ่มของเอกซอนในยีน *UGT1* และ *UGT2 families* โดยแสดงสีแตกต่างกัน (ก) แสดงยีน *UGT1* families ซึ่งมี 2 unique ในเอกซอน 1 คือ *1A1* (สีเหลือง), *1A6* (สีแดง) และมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A (*1A2P-1A5*; สีเขียว) กลุ่ม B (*1A7-1A13P*; สีม่วง) และเอกซอน 2-5 (สีเทา) (ข) แสดงยีน *UGT2* families ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ *2A1-2A3* (สีม่วง) และ *2B4-2B29P* (สีเขียว) อยู่ในเอกซอน 1 โดยใช้เอกซอน 2-6 (สีเทา) ร่วมกันใน *UGT2* family (ดัดแปลงจาก Mackenzie *et al.*, 2005)



รูปที่ 2-6 Phylogenetic tree ของยีน *UGTs* ในคน (ที่มา: Prof.Peter Mackenzie, Department of Clinical Pharmacology, Flinders University, Adelaide, Australia)

2.4 Bilirubin-UDP glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) enzyme

เอนไซม์ UGT1A1 ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1991 (Ritter *et al.*, 1991) เอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่ควบจับบิลิรูบินกับ UDP-glucuronic acid ได้ผลผลิตเป็นบิลิรูบินมอนอกลูคิวโรไนด์ (bilirubin monoglucuronide) และบิลิรูบินไดกลูคิวโรไนด์ (bilirubin diglucuronide) ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี และพร้อมที่จะขับออกทางน้ำดี ปัสสาวะ และอุจจาระต่อไป (Kadakol *et al.*, 2000) นอกจากนั้นยังมีสับสเตรทอื่นๆ เช่น estriol, 17-β-estradiol, phenolic compounds, acetaminophen, ethinylestradiol, buprenorphine, naltrexone, SN-38 (irinotecan active metabolite) เป็นต้น

1) โครงสร้างและลักษณะของยีน *UGT1A1*

- ลักษณะยีน *UGT1A1*

ยีน *UGT1A1* ประกอบด้วย 5 เอกซอน ที่มีการแปลรหัสโปรตีนมีจำนวน 1602 bp; เอกซอน 1A (864 bp) encode โปรตีนด้าน amino terminal (5'-end) ในขณะที่เอกซอน 2 (132 bp) เอกซอน 3 (88 bp) เอกซอน 4 (220 bp) และเอกซอน 5 (298 bp) เป็นเอกซอนที่ใช้ร่วมกันของ *UGT1A* ทั้งหมด โดย encode โปรตีนด้าน caboxyl terminal (3'-end) ยีนนี้มี TATA box [$A(TA)_6TAA$] เป็นโปรโมเตอร์ สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT1A1* (รูปที่ 2-7)

- ลักษณะโปรตีนหรือเอนไซม์ UGT1A1

เอนไซม์ UGT1A1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 533 ตัว (accession number: P22309 มวลโมเลกุล 59,591 Da) ซึ่งสายโปรตีนทางด้านไม่ชอบน้ำ (hydrophobic domain) จับอยู่กับเมมเบรนของ endoplasmic reticulum และสายของกรดอะมิโน ซึ่งมีกรดอะมิโน 17 ตัว ติดกับทางด้าน carboxyl terminal อยู่ติดกับเมมเบรน endoplasmic reticulum (รูปที่ 2-8)

2) การควบคุมการแสดงออกของยีน *UGT1A1*

บริเวณ upstream หรือ Phenobarbital-responsive enhancer glement module (PBREM) ขนาด 290 bp ตั้งแต่ -3483 ถึง -3194 ประกอบด้วย 5 องค์ประกอบ คือ DR4, PXR, CAR, AhR และ DR3 (รูปที่ 2-7) บางองค์ประกอบอาจมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น (induction) การแสดงออกของยีน โดยเฉพาะ the pregnane X recepter (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) และ aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Sugatani *et al.*, 2001; Sugatani *et al.*, 2004; Okey *et al.*, 2005; Sugatani *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005)

- **Enhancer module**

DR4 PXR
tacactagtaaaggtcactcaattccaagggggaaaatgattaaccaaagaacattctaacggttcataaagggtattaggtgtaatga
CAR Ah-recepter
ggatgtgttatctcaccagaacaaacttctgagttatataacctctagttacataacctgaaacccggacttggcactggtaagcacgc
DR3
aatgaacagtcatagtaagctggccaagggtagagttcagtttgaacaaagcaatttgagaacatcaaaggaagtttggggaacag
caagggatccagaatggctagagggtaagaggcagagggaggggcaagcagaagggctagagaggaggaatgagcttgga
caggtgggctggg

- **Promoter region**

-64 TATA box [(TA)nTAA] ← -1
attaacttggtgtatcgattggttttgccatatatatatatataagtaggagagggcgaacctctggcaggagcaaaggcgcc

- **Coding region**

Exon 1: 864 bp (1-864)

ATGgctgtggagtcccagggcggacgcccacttgtcctgggcctgctgctgtgtgctgggcccagtggtgtcccatgctgggaag
atactgttgatcccagtggatggcagccactggctgagcatgcttggggccatccagcagctgcagcagaggggacatgaaatagtt
211
gtcctagcacctgacgcctcgttgtacatcagagacggagcatttacaccttgaagacgtaccctgtgccattccaaagggaggatgt
gaaagagtcttttgttagtctcgggcataatgtttttgagaatgattctttcctgcagcgtgtgatcaaaacatacaagaaaataaaaaag
gactctgctatgcttttgtctggctgttcccacttactgcacaacaaggagctcatggcctccctggcagaaagcagctttgatgtcatgct
gacggaccctttccttccttgcagccccatcgtggcccagtacctgtctctgcccactgtattcttcttgcatgcactgccatgcagcctgg
aatttgaggctacccagtgccccaacccattctcctacgtgcccaggcctctctcctctcattcagatcacatgaccttcctgcagcgggt
686
gaagaacatgctcattgccttttcacagaactttctgtgcgacgtggtttattcccccgtatgcaacccttgcctcagaattccttcagagag
aggtgactgtccaggacctattgagctctgcatctgtctggctgtttagaagtgactttgtgaaggattaccctaggcccatcatgcccaat
atggtttttgttggtggaatcaactgccttcaccaaaatccactatcccag

Exon 2: 132 bp (865-996)

gaatttgaagcctacattaatgcttctggagaacatggaattgtggttttctctttgggatcaatggtctcagaaattccagagaagaaag
ctatggcaattgctgatgctttgggcaaaatccctcagaca

Exon 3: 88 bp (997-1084)

gtcctgtggcggtacactggaacccgaccatcgaatcttgcgaacaacacgatacttgttaagtggctaccccaaaacgatctgcttg

Exon 4: 220 bp (1085-1304)

gtcacccgatgacccgtgcctttatcacccatgctggttcccatggtgtttatgaaagcatatgcaatggcgttcccatggtgatgatgcc
cttgtttggtgatcagatggacaatgcaaagcgcatggagactaagggagctggagtgaccctgaatgttctggaaatgacttctgaa
gatttagaaaatgctctaaaagcagtcatcaatgacaaaag

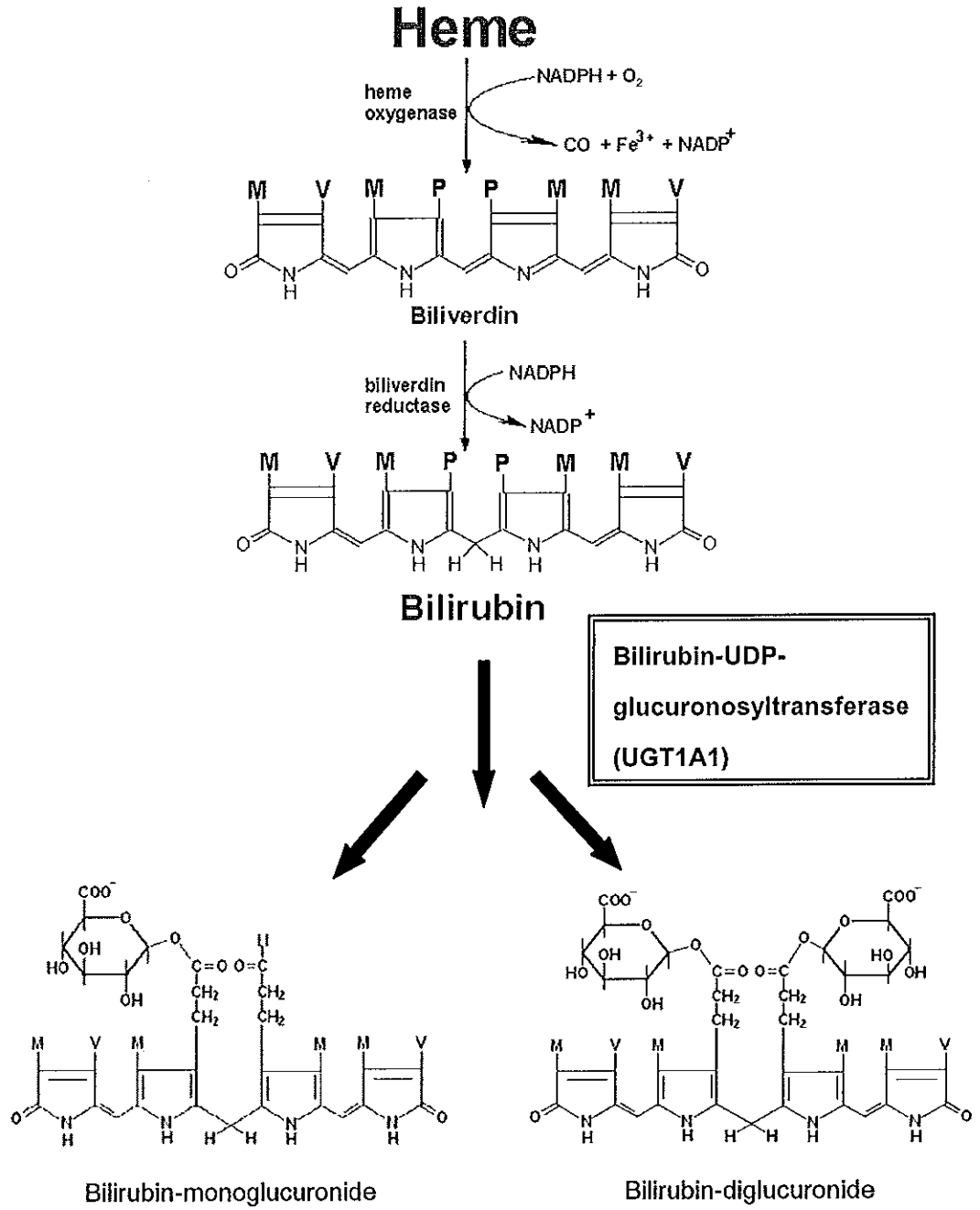
Exon 5: 298 bp (1305-1602)

ttacaaggagaacatcatgcgcctctccagccttcacaaggaccgcccggtggagccgctggacctggccgtgttctgggtggagttt
gtgatgaggcacaagggcgcgccacacctgcgccccgcagcccacgacctcacctggtaccagtaccattccttggacgtgattgg
tttcctcttggccgtcgtgctgacagtggccttcatcacctttaaatgttgtgcttatggctaccggaaatgcttggggaaaaaagggcga
gttaagaaagcccacaaatccaagacccat**TGA**

รูปที่ 2-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT1A1* บนตำแหน่งโปรโมเตอร์และบริเวณที่มีการแปลรหัสของเอกซอน 1 ถึง 5 (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Genbank; accession number: AF297093)

MAVESQGGRP LVLGLLLCVL GPVVSHAGKI LLIPVDGSHW LSMLGAIQQL
QQRGHEIVVL APDASLYIRD GAFYTLKTYP VPFQREDVKE SFVSLGHNVF
ENDSFLQRVI KTYKKIKKDS AMLLSGCSHL LHNKELMASL AESSFDVMLT
DPFLPCSPIV AQYLSLPTVF FLHALPCSLE FEATQCPNPF SYVPRPLSSH
SDHMTFLQRV KNMLIAFSQN FLCDVVYSPY ATLASEFLQR EVTVQDLLSS
ASVWLFRSDF VKDYPRPIMP NMVFVGGINC LHQNPLSQEF EAYINASGEH
GIVVFSLGSM VSEIPEKKAM AIADALGKIP QTVLWRYTGT RPSNLANNTI
LVKWLPQNDL LGHPMTRAFI THAGSHGVYE SICNGVPMVM MPLFGDQMDN
AKRMETKGAG VTLNVLEMTS EDLENALKAV INDKSYKENI MRLSSLHKDR
PVEPLDLAVF WVEFVMRHKG APHLRPAAHD LTWYQYHSLD VIGFLLAVVL
TVAFITFKCC AYGYRKCLGK KGRVKKAHKS KTH

รูปที่ 2-8 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ UGT1A1 (จาก accession number: P22309)



รูปที่ 2.9 การสังเคราะห์บิลิรูบิน และปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันกับบิลิรูบิน ให้ผลผลิตเป็นบิลิรูบินโมโนกลูคิวโรไนด์ (bilirubin monoglucuronide) และบิลิรูบินไดกลูคิวโรไนด์ (bilirubin diglucuronide)

3) การสังเคราะห์บิลิรูบินและปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันของบิลิรูบิน

เอนไซม์ UGT1A1 เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมเฟสที่ 2 ในขั้นตอนของปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชัน โดยการจับกับโมเลกุลขนาดเล็กที่ละลายในไขมัน รวมทั้งสารพวกบิลิรูบิน สเตียรอยด์ ฮอร์โมน (hormones) และยา ทำให้สารนั้นมีความสามารถในการละลายน้ำมากขึ้น และถูกขับออกจากร่างกายได้ เอนไซม์ UGT1A1 เป็นไอโซฟอร์มที่จับแบบจำเพาะกับบิลิรูบิน โดยเอนไซม์ชนิดนี้พบได้ที่ตับ ทางเดินน้ำดี ลำไส้ใหญ่ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยเอนไซม์จะแขวนตัวอยู่ที่เมมเบรนของ hepatic endoplasmic reticulum

บิลิรูบินเป็นของเสียที่เกิดจากการสลายตัวของฮีมในร่างกายของคนปกติ ร่างกายมีการสังเคราะห์บิลิรูบินประมาณวันละ 250-400 มิลลิกรัม ประมาณ 70-80% มาจากฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ที่ได้จากการทำลายหรือการแตกของเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุแล้วอยู่ใน reticuroendothelial system ของร่างกาย และอีก 20-30% ได้จากเม็ดเลือดแดงที่มีการเจริญไม่สมบูรณ์ในไขกระดูก และการสลายฮีโมโปรตีน (hemoprotein) อื่นๆ เช่น myoglobin, catalase, peroxidase และ cytochromes ต่างๆ ภายในเซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อทั่วไป ขั้นตอนในการสลายฮีมจนได้เป็นบิลิรูบินเกิดขึ้นภายในเซลล์ของ reticuloendothelial system และควบจับกับ glucuronic acid โดยเอนไซม์ UGT1A1 ได้เป็นบิลิรูบินโมโนกลูคิวโรไนด์ และบิลิรูบินไดกลูคิวโรไนด์ ดังแสดงในรูปที่ 2-9

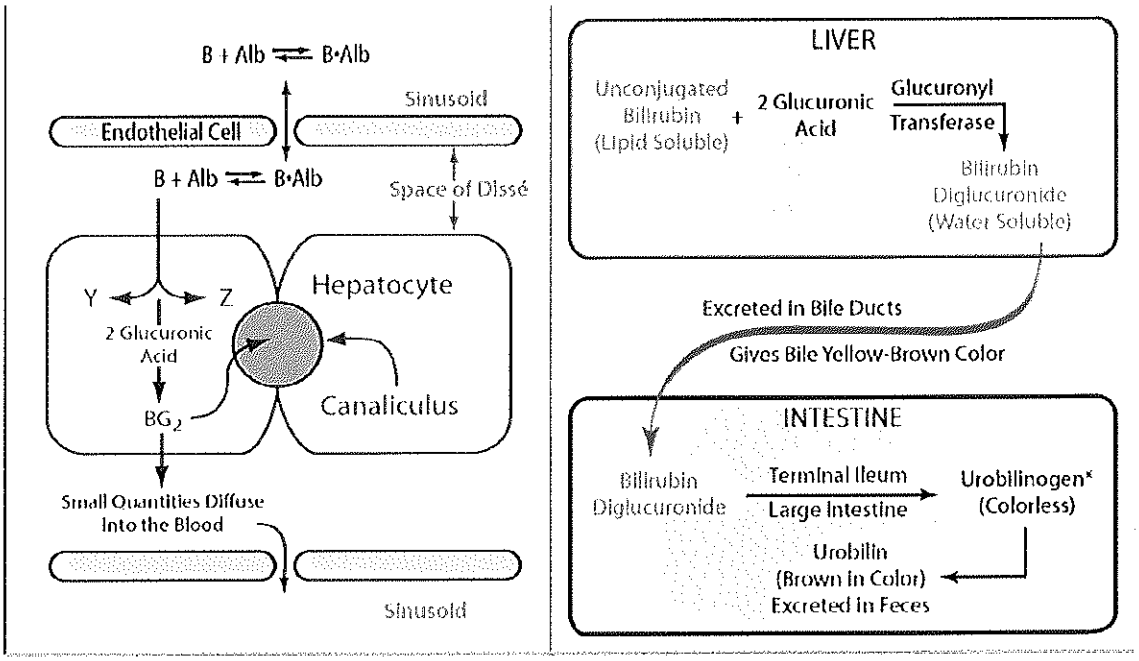
กระบวนการเริ่มจากเปิดวงแหวน protoporphyrin โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันตรงตำแหน่ง α-methene bridge ที่เชื่อมระหว่างวงแหวน โดยเอนไซม์ microsomal hemeoxygenase ควบคุม rate-limiting step ของการสังเคราะห์บิลิรูบิน ซึ่งปฏิกิริยาจะใช้โมเลกุลของออกซิเจนและ NADPH เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ผลที่ได้คือ Fe^{2+} หลุดออกมา ในขณะที่ส่วนที่เป็นวงแหวน protoporphyrin เดิมนั้น จะคลี่ออกได้เป็นวงแหวนรูป 5 เหลี่ยม หรือ parole 4 อัน เรียงต่อกันเป็นแถวยาวเรียกว่าบิลิเวอร์ดิน (biliverdin) ซึ่งมีสีเขียว ต่อมา methene bridge ที่อยู่ตรงกลางของโมเลกุลบิลิเวอร์ดิน จะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ biliverdin reductase ในไซโตพลาซึมได้เป็นบิลิรูบิน ซึ่งมีสีเหลืองหรือสีส้ม มีสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ บิลิรูบินจะถูกขนส่งไปตามกระแสเลือดไปยังตับ โดยจับกับอัลบูมิน (albumin) (อัลบูมิน 4 กรัม ในเลือดสามารถจับกับบิลิรูบินได้ประมาณ 85 มิลลิกรัม) แต่มีสารเคมีหรือยาบางชนิดที่จับกับอัลบูมินที่ตำแหน่งที่จับ (binding site) เดียวกันกับบิลิรูบิน เช่น safonamide, salicylate และ bromsulfophthalein (BSP) สามารถเข้าจับกับอัลบูมินได้ ดังนั้นถ้าหากมีสารดังกล่าวในกระแสเลือดในปริมาณที่สูงอาจไปแย่งจับกับอัลบูมินทำให้เกิดบิลิรูบินในรูปอิสระ (unbound หรือ unconjugated bilirubin) ในเลือดปริมาณมาก ซึ่งก่อให้เกิดพิษต่อร่างกายได้

บิลิรูบินถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ตับทาง sinusoid โดยเกิดการแยกออกของ อัลบูมิน และบิลิรูบินก่อนเข้าสู่เซลล์ตับโดยอาศัยเมมเบรนโปรตีน ซึ่งทำหน้าที่เป็น organic anion transporter (OAT) ส่งผ่านเนื้อเยื่อเซลล์ หลังจากเข้าไปในเซลล์บิลิรูบินจะถูกจับโดยโปรตีนในไซโตซอล 2 ชนิด คือ Y protein (ligandin) และ Z protein ทำให้ระดับของบิลิรูบินในเลือดน้อยกว่า 1 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

Y protein มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่ชอบจับ lipophilic organic anion และมีฤทธิ์เป็น glutathione S-transferase โดย Y protein สามารถจับกับบิลิรูบินที่มีความเข้มข้นต่ำได้ดี ส่วน Z protein เป็น lipid binding protein สามารถจับบิลิรูบินที่ความเข้มข้นสูงได้ดี Y และ Z protein ทำหน้าที่ช่วยจับบิลิรูบินไว้ในเซลล์ตับ ทำให้ไม่สามารถกลับสู่พลาสมาได้ ทารกแรกเกิดจะมีระดับของ Y protein ต่ำทำให้ตับไม่สามารถจับบิลิรูบินจากเลือดได้หมด สารเคมีและยาบางชนิด เช่น phenobarbital สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ Y protein ได้

บิลิรูบินในรูปอิสระถูก Y และ Z protein พามาที่ smooth endoplasmic reticulum เพื่อเปลี่ยนเป็น conjugated bilirubin โดยจะรวมตัวกับหมู่กลูคิวโรนิล (glucuronyl group) ที่มาจาก UDPGA ได้เป็นบิลิรูบินไดกลูคิวโรไนด์ (ประมาณ 80 %) และบิลิรูบินโมโนกลูคิวโรไนด์ (ประมาณ 20 %) ผลผลิตทั้ง 2 ชนิดจะละลายน้ำได้ดี เพราะเป็นสารประกอบที่มีหมู่ประจุลบ (carboxy; COO^-) นอกจากนี้มีการจับร่วมกับกลูโคส (glucose) และไซโลส (xylose) ได้อีกด้วย ปฏิกิริยาของเอนไซม์ UGTs ในเด็กแรกเกิดจะน้อยกว่าผู้ใหญ่

Conjugated bilirubin จาก endoplasmic reticulum ถูกขับออกทางท่อน้ำดี (bile canaliculi) โดยมีโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งออกจากตับเข้าสู่ทางเดินน้ำดีมีชื่อว่า canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) และอาศัยพลังงาน ATP เมื่อส่งเข้าสู่ทางเดินอาหารถูกแยกเอาหมู่กลูคิวโรไนด์ออกเหลือแต่บิลิรูบินอิสระโดยเอนไซม์ β-glucuronidase จากแบคทีเรียในบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (terminal ilium) และลำไส้ใหญ่ บิลิรูบินอิสระที่ได้ถูกรีดิวซ์ต่อโดยเอนไซม์ในกลุ่ม reductase ของแบคทีเรียได้เป็นยูโรบิลิโนเจน (urobilinogen) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสี ในสภาวะปกติสารนี้จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นสเตอโคบิลิโนเจน (stercobilinogen) และ สเตอโคบิลิน (stercobilin) ตามลำดับ มีสีเหลืองน้ำตาลถูกขับออกทางอุจจาระทำให้มีสีปกติ ในขณะที่ 10% ของยูโรบิลิโนเจนจะถูกดูดซึมกลับเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อส่งไปยังตับเกิด enterohepatic circulation ส่วนใหญ่ถูกออกซิไดซ์กลับไปเป็นบิลิรูบินได้ใหม่ มีส่วนน้อยถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะในรูปยูโรบิลิน (urobilin) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง ดังนั้นจึงทำให้ปัสสาวะมีสีเหลืองอ่อนๆ เกิดขึ้น (Kaplowitz, 1996) (รูปที่ 2-10)



รูปที่ 2-10 ขั้นตอนการแปรรูปและการกำจัดบิลิรูบินออกจากร่างกาย โดยบิลิรูบินถูกขนส่งมาทางกระแสเลือดโดยจับกับอัลบูมิน เมื่อเข้าสู่เซลล์ตับมีการเติมหมู่กลูคิวโรนิวได้เป็นกลูคิวโร-ไนด์เมแทบอไลต์ ถูกขับออกผ่านทางเดินน้ำดีเข้าสู่ทางเดินอาหาร และถูกเปลี่ยนรูปโดยเอนไซม์จากแบคทีเรียก่อนกำจัดออกจากร่างร่างกายทางอุจจาระ

4) ผลที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1*

การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* มีผลทำให้การกำจัดบิลิรูบินออกจากร่างกายช้าลง ซึ่งทำให้เกิดการคั่งของบิลิรูบินในกระแสเลือดมาก เกิดภาวะ hyperbilirubinemia โดยมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง ซึ่งพบได้บ่อยในทารกแรกเกิด โดยทารกแรกเกิดมีการทำงานของตับยังไม่สมบูรณ์ทำให้มีการกำจัดออกช้า (มีระดับบิลิรูบินในเลือดเท่ากับ 17-18 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร) (Babaoglu *et al.*, 2006) การกลายพันธุ์ของยีน UGT1A1 เป็นสาเหตุให้เกิดการคั่งของบิลิรูบินอิสระในร่างกายทำให้มีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง (jaundice) และบางรายหากมีปริมาณของบิลิรูบินอิสระมากเกินไป มีผลให้เกิดการทำลายของสมองได้ เรียกอาการนี้ว่า kernicterus ปัจจุบันมีรายงานการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* แล้ว 113 variant alleles (ตารางที่ 2-1) (ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm) ซึ่งการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น มีผลทำให้ของการทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ในปฏิกิริยาคอนจูเกชันผิดปกติไป โดยสามารถแบ่งเป็นโรคได้ 3 ชนิดตามความรุนแรงของอาการ ได้แก่ (Pratt *et al.*, 2001)

สำนักหอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- โรค Crigler-Najjar ชนิด 1 เป็นชนิดที่มีความรุนแรงของอาการมาก มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive มีระดับของบิลิรูบินในกระแสเลือดสูงมาก คือ 18-45 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร สาเหตุจากการสูญเสียประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ในตับ หรือไม่มีการสร้างเอนไซม์เลย ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ผู้ป่วยจะแสดงอาการเหลืองหลังคลอดทันทีจากการคั่งของบิลิรูบิน บางรายอาจมีการทำลายของสมองและมักจะเสียชีวิตหลังคลอด ไม่สามารถให้การรักษาด้วยยา phenobarbital ได้

- โรค Crigler-Najjar ชนิด 2 เป็นชนิดที่มีความรุนแรงของอาการปานกลาง มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive มีระดับของบิลิรูบินในกระแสเลือดมาก คือ 6-25 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งจะพบน้อยกว่าในผู้ป่วยที่เป็น Crigler-Najjar ชนิด 1 มีอาการตัวเหลือง ตาเหลืองหลังคลอด สามารถรักษาด้วยยา phenobarbital ได้ เอนไซม์ UGT1A1 มีการทำงานเพียง 10% เมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนบิลิรูบินในรูปอิสระไปเป็น conjugated bilirubin ได้หมด จึงทำให้มีการแสดงอาการเหลือง

- โรค Gilbert เป็นชนิดที่มีความรุนแรงของอาการน้อย มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ทั้งแบบ autosomal dominant และ autosomal recessive มีระดับของบิลิรูบินในกระแสเลือดน้อยกว่า 4 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร โรคนี้มีอุบัติการณ์ในการเกิดมากกว่า 2 ชนิดแรก สาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์ ด้วยการเพิ่มขึ้นของเบสไทมีนและอะดีนีน (TA) ในลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ TATA box เป็น 7 คู่ ซึ่งจะไปลดการถอดรหัสของยีน 70% (Bosma *et al.*, 1995) ส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดน้อยลง ผู้ป่วยส่วนใหญ่อาจจะมีอาการหลังคลอด แล้วหายไปเองเหมือนคนปกติ หรือบางรายไม่มีการแสดงอาการ แต่หากเมื่อได้รับยาหรือสารใดๆ ที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ UGT1A1 ในการควบจับจะทำให้มีอาการตัวเหลืองตาเหลือง และอาการจะมีในช่วงอดอาหาร ความเครียด หรือเจ็บป่วย ซึ่งจะมีการทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ลดลง นอกจากนี้ยังทำให้ระดับของยาที่ต้องอาศัยเอนไซม์ UGT1A1 ในการเมแทบอลิซึมมีระดับสูงจนทำให้เกิดความพิษจากยาได้ โดยเฉพาะในกลุ่มยารักษามะเร็ง ยาต้านไวรัส ที่มีอาการไม่พึงประสงค์รุนแรง

ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของยีน *UGT1A1* จะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการชักนำให้เกิดความเป็นพิษของยา เช่นยา irinotecan, indinavir, lamotrigine, flutamide, 17-α ethinylestradiol, acetaminophen, tobutamide และ lorazepam เป็นต้น ตัวอย่างความสัมพันธ์ของเอนไซม์ UGT1A1 กับปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันของสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ (active metabolite) ของยาและสารเคมีต่างๆ เช่น

- ยา Irinotecan (CPT-11)

Irinotecan เป็น prodrug ที่สามารถละลายน้ำได้ และมีการแปรรูปไปเป็นสารเมแทบอไลต์ (SN-38) ซึ่งมีความแรงในการเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I จึงนำมาใช้

เป็นยาต้านมะเร็ง การใช้ยา irinotecan ในทางคลินิก ปัจจุบันจะใช้เป็นยาเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับยารักษาโรคมะเร็ง (chemotherapeutic agents) อื่นๆ เช่น 5-fluorouracil และ cisplatin โดยใช้ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ (colorectal cancer) มะเร็งปอด (lung cancer) มะเร็งหลอดอาหาร (esophageal cancer) มะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric cancer) มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) และมะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) (Rothenberg, 2001)

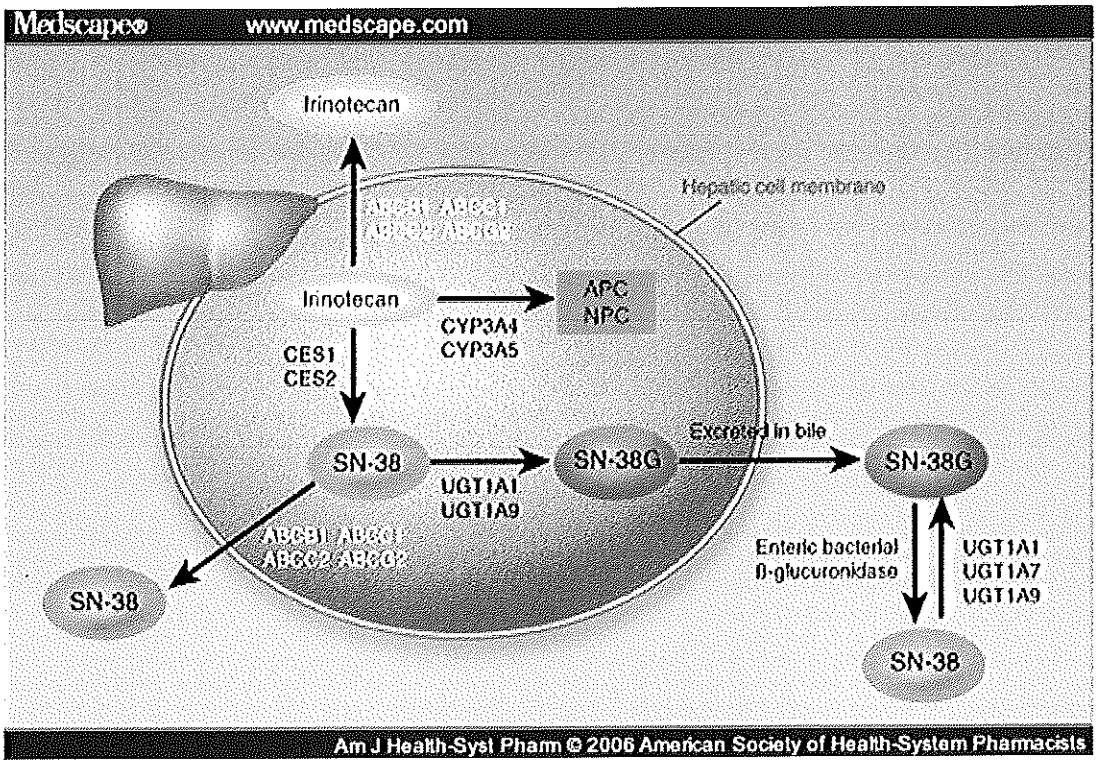
โครงสร้างทางเคมีของยา irinotecan และสารเมแทบอไลต์ที่สำคัญที่พบในเลือดแสดงในรูปที่ 2-11 ยา irinotecan เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกไฮโดรไลส์ได้เป็น SN-38 โดยเอนไซม์ carboxylesterases ในตับ ที่ชั้น mucosa ของลำไส้ และในเลือดของคน (Rivory *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 1999; Kehrer *et al.*, 2000) กลไกการเมแทบอลิซึมอื่นๆ ของยา irinotecan คือ bipiperidine side chain oxidation ได้เป็น APC (7-ethyl-10-[4-*N*-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecine) และ NPC (7-ethyl-10-(4-amino-1-piperidino) carbonyloxycamptothecine) ซึ่งกระตุ้นการเกิดโดยเอนไซม์ CYP3A4 เฉพาะ NPC ที่เปลี่ยนไปเป็น SN-38 โดยเอนไซม์ carboxylesterases ในตับและเลือดของคนในโมเดลการทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) (Dodds *et al.*, 1998; Haaz *et al.*, 1998; Kehrer *et al.*, 2000) SN-38 จะเกิดการควบจับโดยอาศัยเอนไซม์ UGT1A1 ได้เป็น β-glucuronide derivative (SN- 38G) ซึ่งไม่มีฤทธิ์ (Iyer *et al.*, 1998)

SN-38 เป็นสาเหตุที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรง ซึ่งเป็นหนึ่งในอาการข้างเคียงของ ยา irinotecan เป็นผลโดยตรงของการเกิด enteric injury มีสาเหตุจาก SN-38 (Araki *et al.*, 1993) ดังนั้นเอนไซม์ UGT1A1 ซึ่งเป็นตัวช่วยในกระบวนการขับสารพิษ หรือทำให้เกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันของ SN-38 ไปเป็น SN-38G ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นบทบาทที่สำคัญในการป้องกันการเกิดผลข้างเคียงของยา irinotecan การเกิดการกลายพันธุ์ของยีนบนส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *UGT1A1* โดยมีการเพิ่มของเบส 2 ตัวคือไทมีนและอะดีนีน (TA) ที่ตำแหน่ง TATA box ซึ่งปกติมีจำนวน 6 คู่ แต่สำหรับการกลายพันธุ์จะมี 7 คู่ เป็นต้น ทำให้ลดการแสดงออกของโปรตีน UGT1A1 ได้ 30-80 % ส่งผลให้ปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันของ SN-38 ลดน้อยลง (Bosma *et al.*, 1995; Ando *et al.*, 1998; Beutler *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 1999) อัตราการเมแทบอลิซึมของ SN-38 ต่อ SN-38G ในผู้ป่วยที่มีแอลลีลเป็น homozygous $(TA)_7/(TA)_7$ และ heterozygous $(TA)_6/(TA)_7$ จะสูงกว่าในผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ปกติ (wild-type genotype: $(TA)_6/(TA)_6$) ในการศึกษาทางเภสัชพันธุศาสตร์ของ Ando และคณะ (2000) และ Iyer และคณะ (2002) พบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของการกลายพันธุ์บนส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *UGT1A1* กับความเป็นพิษที่รุนแรงของยา irinotecan คือผู้ป่วยที่ได้รับยาเข้าไป และมีการกลายพันธุ์ของยีนร่วมอยู่ด้วยจะอาการข้างเคียงที่รุนแรง เช่นอาการท้องเสีย (diarrhea) และภาวะเม็ดเลือดขาวลดลง (leucopenia) เป็นต้น

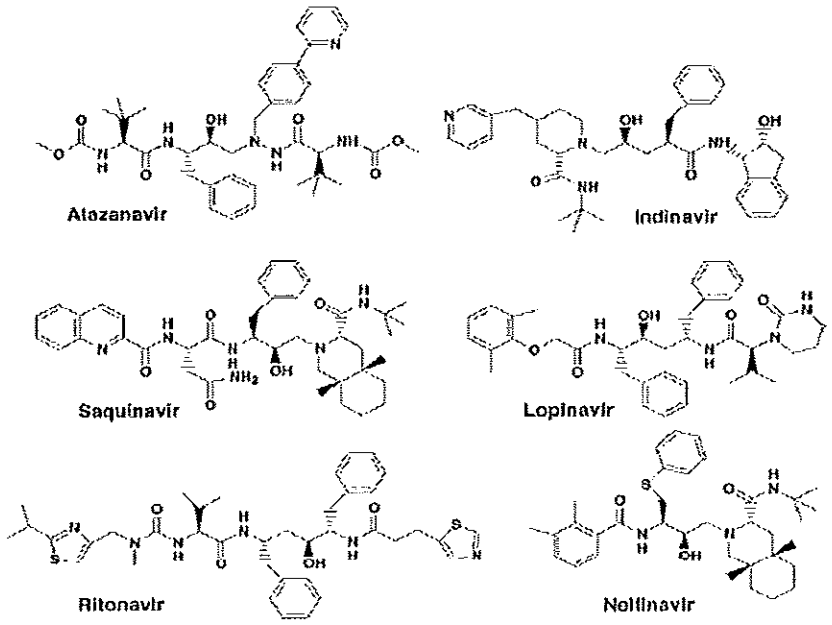
- ยา Indinavir

Indinavir เป็นยาต้านไวรัสเอดส์ (HIV) ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ protease ของไวรัส (HIV protease inhibitor) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อ viral replication และการเจริญเติบโตเป็นไวรัสที่สมบูรณ์ ซึ่งพร้อมที่จะบุกรุกเซลล์อื่นได้ เอนไซม์ HIV protease เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม aspartic protease เช่นเดียวกับเอนไซม์ rennin, pepsin, gastricin, cathepsin D และ E ออกฤทธิ์โดยการตัด gag-pol polyprotein ของไวรัสได้เป็น functional subunits โดยเอนไซม์ protease ของไวรัสมีความแตกต่างจากเอนไซม์ aspartic protease ของคน ตัวอื่นๆ ที่กล่าวมาข้างต้น โดยที่เอนไซม์ protease ของไวรัสจะทำงานได้ต้องประกอบด้วยโปรตีนสองสายเข้าคู่กันในลักษณะสมมาตร ในขณะที่เอนไซม์ aspartic protease ของคนเป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่พร้อมทำงานได้ทันที ลักษณะที่แตกต่างอีกประการหนึ่งคือเอนไซม์ protease ของไวรัสสามารถตัดพันธะเปปไทด์ทางปลายด้านอะมิโนเหนือกรดอะมิโน proline ซึ่งเอนไซม์ protease ที่พบในคนไม่สามารถทำได้ ดังนั้นยาที่ยับยั้งเอนไซม์ HIV protease ซึ่งเป็น peptide-like substrate analog จึงมีความจำเพาะเจาะจงสูง และไม่พบการยับยั้งเอนไซม์ aspartic protease ตัวอื่นๆ ในร่างกายในขนาดของยาที่ใช้ในการรักษา ยาในกลุ่มเดียวกัน เช่น atazanavir, saquinavir, lopinavir, ritonavir, และ nelfinavir (รูปที่ 2-12) ยา indinavir ถูกเมแทบอไลซ์โดยเอนไซม์ CYP3A และยังออกฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP3A ยากลุ่ม HIV protease inhibitors มีความสามารถในการจับกับโปรตีนสูง (98 %) ยกเว้นยา indinavir และ atazanavir ซึ่งจะมีการจับกับโปรตีนเท่ากับ 60 และ 86% ตามลำดับ และ HIV protease inhibitors ส่วนมากจะมีการจับกับ α1-acid glycoprotein (Zhang *et al.*, 2005)

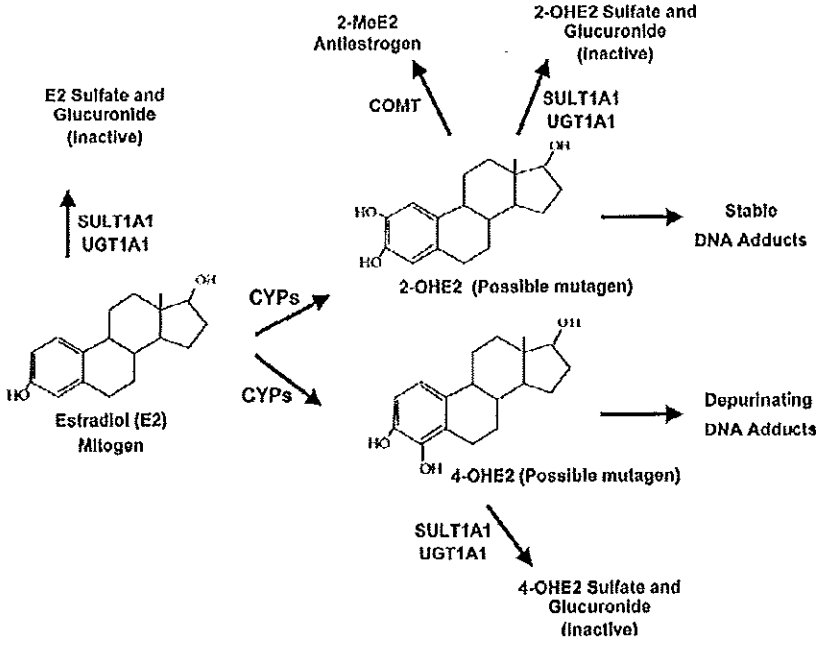
อาการข้างเคียงที่พบมากได้แก่ อาการอ่อนเพลีย ท้องเสีย คลื่นไส้ ปวดหัว ที่พบรองลงมาได้แก่ อาการปวดเมื่อยตามตัว อาเจียน นอนไม่หลับ และภาวะ hyperbilirubinemia



รูปที่ 2-11 ขั้นตอนการเมแทบอลิซึมยา irinotecan และการขนส่งสารเมแทบอไลต์ของยา irinotecan ออกจากร่างกาย โดย SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) ซึ่งเป็น active metabolite ของยา irinotecan ที่ถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ carboxyesterase (CES) 1 และ 2 และ SN-38 ถูกเปลี่ยนเป็นกลูคิวโรไนด์โดยเอนไซม์ UGT1A1 และ UGT1A9 และถูกขับออกทางท่อน้ำดีจากนั้น SN-38G ถูกเปลี่ยนกลับไปเป็น SN-38 โดยเอนไซม์ UGT1A1, UGT1A7 และ UGT1A9 และยา irinotecan ถูกแปรรูปไปเป็น inactive metabolite คือ APC: (7-ethyl-10-[4-*N*-(5- aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecine) และ NPC: (7-ethyl-10-(4- amino-1-piperidino) carbonyloxycamptothecine) โดยเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP3A5 (Kristine *et al.*, 2006)



รูปที่ 2-12 โครงสร้างทางเคมีของยาในกลุ่ม HIV protease inhibitors (Zhang *et al.*, 2005)



รูปที่ 2-13 กลไกการต้านการเกิดการกลายพันธุ์ของสาร estradiol และเมแทบอไลต์ โดยอาศัยเอนไซม์ SULT1A1 และ UGT1A1 ทำหน้าที่เปลี่ยนจากสารที่ออกฤทธิ์ให้เป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ (Shatalova *et al.*, 2005)

มีรายงานพบว่า 6-25% ของผู้ที่ได้รับยา indinavir จะมีอาการของภาวะ "hyperbilirubinemia" โดยทั่วไปอาการเหล่านี้มักจะไม่แสดงอาการ แต่มีบางรายที่มีอาการเปลี่ยนแปลงเป็นอาการดีซ่าน ในผู้ป่วยชาว Caucasian ที่มีจีโนไทป์ $(TA)_7TAA$ (*UGT1A1*28*) จะมีการแสดงออกของภาวะ hyperbilirubinemia เมื่อได้รับยา indinavir นอกจากนี้ได้มีการทดลองพบว่ายา indinavir จะยับยั้งปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันของบิลิรูบินได้ในตับของหนูขาวใหญ่ ในประเทศไทยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับยา indinavir และจีโนไทป์การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* พบว่าปริมาณบิลิรูบินในเลือดของผู้ป่วยเอดส์เพิ่มขึ้น หลังจากได้รับยา indinavir ในการรักษา 24 สัปดาห์ โดยระดับของบิลิรูบินเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่มีแอลลีล UGT1A1 *6/*28>*6>*28 นอกจากนี้ยา indinavir ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ UGT อื่นๆ ด้วย เช่น UGT1A3 UGT1A7 (Boyd *et al.*, 2006)

- เอสโตรเจน (estrogen)

เอสโตรเจนเป็นสารที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของมะเร็งเต้านม โดยผู้หญิงที่ได้รับสารนี้มากจากฮอร์โมนหรือยา จากการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม และรวมทั้งสารต่างๆ ภายในร่างกาย มีรายงานพบว่ามีผลต่อการเกิดมะเร็งเต้านมได้ กลไกของเอสโตรเจนที่เป็นตัวชักนำให้เกิดมะเร็ง โดยเอสโตรเจนเป็นสารที่กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ผ่านทางตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) กระตุ้นให้เซลล์เจริญเติบโต แพร่ขยายออก และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ตัวรับเอสโตรเจนมีการทำงานที่เป็นอิสระจากเอสโตรเจน เอสโตรเจนถูกเมแทบอไลส์ผ่านการกระตุ้นโดยเอนไซม์ CYPs ได้เป็น catecholestrogens semiquinones และ quinines ซึ่งมีส่วนในการทำลายดีเอ็นเอโดยตรง และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยได้มีการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเซลล์มีการแสดงความเป็นพิษจากการได้รับสารก่อกลายพันธุ์

การเกิดปฏิกิริยากลูคิวโรนิเดชันของเอสโตรเจน และสารเมแทบอไลต์กับหมู่ methyl, sulfate หรือกลูคิวโรไนด์ ส่งผลให้โมเลกุลของสารไม่ออกฤทธิ์ ช่วยในการป้องกันเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากพิษ และการทำลายดีเอ็นเอ (DNA-damaging activity) ของ estradiol และ catecholestrogens (รูปที่ 2-13)

เอนไซม์ UGT1A1 เป็นเอนไซม์ที่ช่วยแปรรูปเอสโตรเจนให้อยู่ในรูปที่ไม่ออกฤทธิ์ เช่น 17 ß-estradiol (E2), 2-hydroxyestrone, 2-hydroxyestradiol (2-OHE2), 2-methoxyestradiol (2-MeE2) และ ethinylestradiol การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่พบบ่อยที่สุดคือการซ้ำของนิวคลีโอไทด์ (TA repeat) บนโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง TATA box (*UGT1A1*28*, *UGT1A1*33* และ *UGT1A1*34* มีการซ้ำของ TA เป็น 7, 5 และ 8 คู่ตามลำดับ) พบว่าการกลายพันธุ์มีผลต่อการถอดรหัสของโปรตีน UGT1A1 ซึ่งมีผลต่อปริมาณและระดับการแสดงออกของเอนไซม์ เช่นคนที่มีจีโนไทป์ *UGT1A1*33* การทำงานของเอนไซม์สูงกว่าในคน

ปกติ และคนที่มีจีโนไทป์ *UGT1A1*28* และ *UGT1A1*34* การทำงานของเอนไซม์ลดลงต่ำกว่าในคนปกติ (Shatalova *et al.*, 2005) เป็นต้น

5) รายงานการเกิด *UGT1A1* polymorphism ของคนเอเชีย

- Maruo และคณะ (2000) ศึกษาในผู้ป่วยที่มีระดับบิลิรูบินสูง 17 คน พบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1*6* (homozygous และ heterozygous) 14 คน ตำแหน่ง *UGT1A1*7* (heterozygous) 1 คน และ 1 คน ที่เป็น heterozygous ทั้งตำแหน่ง *UGT1A1*6* และ *UGT1A1*28* และ 1 คน มีการกลายพันธุ์แบบ heterozygous ใน enhancer region (*UGT1A1*112*: C> A at -1353)

- Huang และคณะ (2000) ศึกษาความถี่การกลายพันธุ์ *UGT1A1*27* ในคนไต้หวันมีความถี่ 2.8% ผลจากการกลายพันธุ์ *UGT1A1*6, UGT1A1*7, UGT1A1*27* ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัด SN-38 ของยา irinotecan ลดลง 47, 52 และ 5% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบยีนปกติ

- Adegoke และคณะ (2004) ศึกษาในผู้หญิงชาวจีนวัย 40 ปีขึ้นไป พบว่าหากมีการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1*28* เพิ่มปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมได้

- Sutomo และคณะ (2004) ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1*6* ในชาวอินโดนีเซีย และมาเลเซีย พบความถี่การกลายพันธุ์ของยีนตำแหน่งนี้เท่ากับ 1.5 และ 1.4% ตามลำดับ และการศึกษาผลการทำงานของเอนไซม์พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1*6* ทั้งแบบ heterozygous และ homozygous ทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง 32.2 และ 60.2% ของคนปกติ

- จากการศึกษาของ Zhou และคณะ (2005) ทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งชาวสิงคโปร์ พบความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* คือ *UGT1A1*60* (-3279T>G) พบ 36% และ *UGT1A1*28* พบ 7% การกลายพันธุ์ของยีนที่ตำแหน่ง *UGT1A1*28* พบว่ามีความแตกต่างกันในคนเอเชีย โดยพบมากในคนอินเดียแต่พบน้อยในคนจีนและมาเลเซีย

- Yusoff และคณะ (2006) การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ในทารกมาเลเซียทั้งหมด 105 คน เป็นทารกที่มีอาการเหลือง 55 คน และทารกปกติ 50 คน พบว่ามีการกลายพันธุ์ *UGT1A1*6, UGT1A1*28* และ *UGT1A1*113* (พบในเพศหญิง) โดยพบความถี่ของการกลายพันธุ์ *UGT1A1*28* มากกว่า *UGT1A1*6* ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในชาวญี่ปุ่นและไต้หวันที่พบ *UGT1A1*6* มากกว่า

- Boyd และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ในผู้ป่วยชาวไทยที่ได้รับเชื้อ HIV 96 คน พบว่าความถี่ของการกลายพันธุ์ที่ *UGT1A1*6* และ *UGT1A1*28* ในผู้ป่วยคนไทยคือ 10.4 และ 15.6% ตามลำดับ โดยระดับของ

conjugated (direct) และ unconjugated (indirect) bilirubin ในเลือดเพิ่มขึ้น หลังจากที่รักษาด้วยยา indinavir เป็นระยะเวลา 24 สัปดาห์ โดยระดับบิลิรูบินที่เพิ่มขึ้นจากมากไปน้อยสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ คือ *6/*28>*6>*28

- Sun และคณะ (2007) ทำการศึกษาในทารกแรกเกิดชาวจีน พบการกลายพันธุ์ *UGT1A1*6* และการกลายพันธุ์ *UGT1A1*27*, 845A⟶T, 231G⟶A แบบ heterozygous ซึ่งพบว่าในทารกที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1*6* มีระดับบิลิรูบินสูงกว่าในทารกกลุ่มปกติ สรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ *UGT1A1*6* เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดภาวะ hyperbilirubinemia

- วันดี และคณะ (2007) ศึกษาการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง G71R (*UGT1A1*6*), Y486D (*UGT1A1*7*), P229Q (*UGT1A1*27*) และ F83L (*UGT1A1*62*) โดย *UGT1A1*27* และ *UGT1A1*62* เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Gilbert ในประชากรคนเอเชีย และ *UGT1A1*7* เกิดโรค Crigler-Najjar ชนิด 2 โดยเปรียบเทียบกับยีน *UGT1A1* ของคนปกติในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นการศึกษาการกำจัดบิลิรูบิน [beta]-estradiol, 4MU และ 1NP glucuronidation โดย *UGT1A1*6* และ *UGT1A1*27* มีปฏิกิริยาการควบจับลดลง 34-74% และที่ *UGT1A1*7* และ *UGT1A1*62* ปฏิกิริยาคอนจูเกชัน ลดลงมากกว่า 95% ซึ่งในแต่ละตำแหน่งมีความผันแปรในการเกิดมาก การกลายพันธุ์ของยีนตำแหน่ง Y486D ซึ่งเป็นตำแหน่ง common exon ร่วมกันของ UGT1A ทำให้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ UGT1A3 ลดลง 60-90% และมีผลทำให้เอนไซม์ UGT1A6 และ UGT1A10 ไม่สามารถทำงานได้ (Udomuksorn *et al.*, 2007)

- การกลายพันธุ์ของยีนแบบ *UGT1A1*28* พบความถี่ของการเกิด ในคน Caucasians พบ 32 - 39% คนแอฟริกัน-อเมริกัน 23% คนอินเดีย 12% คนมาเลเซีย 19% คนจีน 16% และคนญี่ปุ่น 2% และการกลายพันธุ์ *UGT1A1*36* [$(TA)_5TAA$] มีผลให้เพิ่มการถอดรหัสเอนไซม์ UGT1A1 และการกลายพันธุ์ *UGT1A1*37* [$(TA)_8TAA$] มีผลให้ลดการถอดรหัส ส่งผลทำให้เกิดโรค Crigler-Najjar ชนิด 2 ซึ่งในคนแอฟริกันเราพบการเกิดการกลายพันธุ์ทั้งสองแบบนี้ 3.5 และ 6.9% ตามลำดับ (Strassburg and Lankisch, 2008)

- การศึกษาความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* การกลายพันธุ์แบบ *UGT1A1*6* ในคนเอเชียพบความถี่ 13-23% (Akaba *et al.*,1998; Huang *et al.*, 2000) การกลายพันธุ์แบบ *UGT1A1*27* ในคนไต้หวันมีความถี่ 2.8% (Huang *et al.*, 2000) ซึ่งการกลายพันธุ์ทั้ง 2 ตำแหน่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค Gilbert ส่วนการกลายพันธุ์แบบ *UGT1A1*7* พบได้น้อยมากในชาวญี่ปุ่นและไต้หวัน และเป็นสาเหตุให้เกิดโรค Crigler-Najjar ชนิด 2 (Aono *et al.*,1993; Huang *et al.*, 2000) และผลจากการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* แบบ *UGT1A1*6*, *UGT1A1*7*, *UGT1A1*27* ทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัด SN-38 ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ที่

ออกฤทธิ์ของยา irinotecan (V_{max}/K_m) ลดลง 47, 5 และ 52% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบยีนปกติ (Jinno *et al.*, 2003) และการกลายพันธุ์ *UGt1A1*62* ซึ่งพบในผู้ป่วยที่เป็นโรค Gilbert ในประเทศไทย และพบในคนญี่ปุ่น 1.4% (Sutomo *et al.*, 2002)

ตารางที่ 2-1 แสดง *UGT1A1* allele nomenclature

(ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm)

Allele naming	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Exon	Effect	Phenotype[1]	Enzyme activity		Notes
						In vivo	*In vitro*	
UGT1A1*1				Wild-type				
UGT1A1*2	877(T>A)/878-890del	Frameshift/Del	2	Frameshift	CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*3	1124(C>T)	S375F	4		CN1	Inactive	Inactive	
UGT1A1*4	1069(C>T)	Q357X	3		CN1	Inactive	Inactive	
UGT1A1*5	991(C>T)	Q331X	2	Exon 2 deletion	CN1	Absent	Inactive	
UGT1A1*6	211(G>A)	G71R	1		-	Reduced	Reduced	
UGT1A1*7	1456(T>G)	Y486D	5		CN2	Reduced	Reduced	
UGT1A1*8	625(C>T)	R209W	1		CN2	4.4%	Reduced	
UGT1A1*9	992(A>G)	Q331R	2		CN2	Reduced	Reduced	
UGT1A1*10	1021(C>T)	R341X	3		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*11	923(G>A)	G308E	2		CN1	Inactive	Absent	
UGT1A1*12	524(T>A)	L175Q	1		CN2	38.4%	Reduced	
UGT1A1*13	508-510del	F170del	1		CN1	Inactive	Inactive	
UGT1A1*14	826(G>C)	G276R	1		CN1	Inactive	Inactive	

ตารางที่ 2-1 แสดง *UGT1A1* allele nomenclature (ต่อ)

(ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm)

Allele naming	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Exon	Effect	Phenotype[1]	Enzyme activity		Notes
						In vivo	*In vitro*	
UGT1A1*15	529(T>C)	C177R	1		CN1	Inactive	Inactive	
UGT1A1*16	1070(A>G)	Q357R	3		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*17	1143(C>G)	S381R	4		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*18	1201(G>C)	A401P	4		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*19	1005(G>A)	W335X	3		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*20	1102(G>A)	A368T	4		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*21	1223insG	Frameshift	4	Frameshift	CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*22	872(C>T)	A291V	2		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*23	1282(A>G)	K426E	4		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*24	1309 A>T	K437X	5		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*25	840(C>A)	C280X	1		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*26	973delG	Frameshift	2	Frameshift	CN2	Absent	Absent	
UGT1A1*27	686(C>A)	P229Q	1		Gilbert	Reduced	Reduced	
UGT1A1*28	A(TA)$_6$TAA to A(TA)$_7$TAA		Promoter		Gilbert	Reduced	Reduced	UGT1A1 TATA box

ตารางที่ 2-1 แสดง *UGT1A1* allele nomenclature (ต่อ)

(ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm)

Allele naming	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Exon	Effect	Phenotype[1]	Enzyme activity		Notes
						In vivo	*In vitro*	
UGT1A1*29	1099(C>G)	R367G	4		Gilbert	Reduced	Reduced	
UGT1A1*30	44(T>G)	L15R	1		CN2	Reduced	Reduced	
UGT1A1*31	1160(CC>GT)	P387R	4		CN1	Absent	Absent	
UGT1A1*32	1006(C>T)	R336W	3		CN1	0-10%	Absent	
UGT1A1*33	881(T>C)	I294T	2		CN2	40-55%		
UGT1A1*34	928(A>G)	M310V	2		CN2	26%-51%		
UGT1A1*35[1]	1292(T>C)	I431T	4		CN2	61%-81%		
UGT1A1*36	$A(TA)_6TAA$ to $A(TA)_5TAA$		Promoter			Increased	Increased	
UGT1A1*37	$A(TA)_6TAA$ to $A(TA)_8TAA$		Promoter		CN2	Reduced	Reduced	
UGT1A1*38	1213(A>G)/ $A(TA)_6TAA$ to $A(TA)_8TAA$	N400D	4		CN2			Originally designated UGT1A1*64
UGT1A1*39	1201(G>C)/1309(A>T)	A401P/K437X	4; 5		CN1			
UGT1A1*40	872(C>T)/1282(A>G)	A291V/K426E	2; 4		CN1			
UGT1A1*41	120-121delCT	Frameshift	1	Frameshift	CN1			
UGT1A1*42	1388(A>C)/N $A(TA)_7TAA$	E463A	5		CN2			

ตารางที่ 2-1 แสดง *UGT1A1* allele nomenclature (ต่อ)

(ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm)

Allele naming	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Exon	Effect	Phenotype[1]	Enzyme activity		Notes
						In vivo	*In vitro*	
UGT1A1*43[1]	698(T>G)	L233R	1		-			Originally designated UGT1A1*35
UGT1A1*44	115(C>G)	H39D	1		CN1			
UGT1A1*45	222(C>A)	Y74X	1		CN1			
UGT1A1*46	517delC	Frameshift	1	Frameshift	CN1			
UGT1A1*47	722-723delAG	Frameshift	1	Frameshift	CN1			
UGT1A1*48	674(T>G)/722-723delAG	V225G/Frameshift	1	Frameshift	CN2			
UGT1A1*49	1043delA	Frameshift	3	Frameshift	CN1			
UGT1A1*50	1220delA/N	Frameshift/N	4	Frameshift	CN1			
UGT1A1*51	1127(A>G)/N	H376R/N	4		CN2			
UGT1A1*52	1130(G>T)	G377V	4		CN2			
UGT1A1*53	1448(G>A)	W483X	5		CN1			
UGT1A1*54	1449(G>A)	W483X	5		CN1			
UGT1A1*55	1487(T>A)/N	L496X/N	5		CN1			
UGT1A1*56	Splice acceptor site	Intron 1	Intron 1		CN1			

ตารางที่ 2-1 แสดง *UGT1A1* allele nomenclature (ต่อ)

(ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm)

Allele naming	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Exon	Effect	Phenotype[1]	Enzyme activity		Notes
						In vivo	*In vitro*	
UGT1A1*57	Splice donor site	Intron 3	Intron 3		CN1			
UGT1A1*58	145(C>T)	Q49X	1		CN1			
UGT1A1*59	1186delG	Frameshift	4	Frameshift	CN2			
UGT1A1*60	-3279(T>G)		Promoter		Gilbert			Referred to -3263(T>G)
UGT1A1*61	Splice donor site (G>A)	Intron 3	Intron 3		CN1			
UGT1A1*62	247(T>C)	F83L	1		Gilbert			
UGT1A1*63	1091(C>T)	P364L	4		-	Reduced	-	
UGT1A1*64	488-491dupACCT	Frameshift	1	Frameshift	Gilbert	Reduced	-	
UGT1A1*65	-1126(C>T)		Promoter		Gilbert	-	-	
UGT1A1*66	997-82(T>C)		Intron 2		Gilbert	-	-	
UGT1A1*67	-85 to -83 ins CAT		Promoter		Gilbert	Reduced	Reduced	
UGT1A1*68	-63(G>C)		Promoter		Gilbert	Normal	-	
UGT1A1*69	476(T>C)	I159T	1		Gilbert	Normal	-	
UGT1A1*70	962(C>G)	A321G	2		Gilbert	Normal	-	

ตารางที่ 2-1 แสดง *UGT1A1* allele nomenclature (ต่อ)

(ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm)

Allele naming	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Exon	Effect	Phenotype[1]	Enzyme activity		Notes
						In vivo	*In vitro*	
UGT1A1*71	964(A>G)	I322V	2		-	Normal	-	
UGT1A1*72	1075(G>A)	D359N	3		Gilbert	Normal	-	
UGT1A1*73	1091(C>T)	P364L	4		Gilbert	Normal	-	
UGT1A1*74	-3345 delC		Promoter		-	-	-	
UGT1A1*75	1598(A>C)	H533P	5		-	-	-	
UGT1A1*76	1813(C>T)		3'UTR		-	-	-	
UGT1A1*77	2021(T>C)		3'UTR		-	-	-	
UGT1A1*78	1941(C>G)		3'UTR		-	-	-	
UGT1A1*79	2042 (C>G)		3'UTR		-	-	-	
UGT1A1*80	-364(C>T)		Promoter		-	-	-	
UGT1A1*81	-64(G>C)		Promoter		-	-	-	
UGT1A1*82	IVS1-72 (T>G)		Intron 1		-	-	-	
UGT1A1*83	IVS1-52 (T>C)		Intron 1		-	-	-	
UGT1A1*84	IVS2+18 (C>T)		Intron 2		-	-	-	

ตารางที่ 2-1 แสดง *UGT1A1* allele nomenclature (ต่อ)

(ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm)

Allele naming	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Exon	Effect	Phenotype[1]	Enzyme activity		Notes
						In vivo	*In vitro*	
UGT1A1*85	IVS4-229 (A>C)		Intron 4		-	-	-	
UGT1A1*86	IVS1-157 (C>A)		Intron 1		-	-	-	
UGT1A1*87	IVS2+15 (T>C)		Intron 2		-	-	-	
UGT1A1*88	IVS2-82 (T>C)		Intron 2		-	-	-	
UGT1A1*89	-3440 (C>A)		Promoter		-	-	-	
UGT1A1*90	-3401 (T>C)		Promoter		-	-	-	
UGT1A1*91	-3177 (C>G)		Promoter		-	-	-	
UGT1A1*92	-3175 (A>G)		Promoter		-	-	-	
UGT1A1*93	-3156 (G>A)		Promoter		-	-	-	
UGT1A1*94	1381 (T>C)	W461R	5		CN1	-	No detectable activity	
UGT1A1*95	1007(G>A)	R336Q	3		CN1	-	-	
UGT1A1*96	1007(G>T)	R336L	3		CN1	-	-	
UGT1A1*97	1184(G>T)	G395V	4		CN1	-	-	
UGT1A1*98	1159(C>T)	P387S	4		CN1	-	-	

ตารางที่ 2-1 แสดง *UGT1A1* allele nomenclature (ต่อ)

(ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm)

Allele naming	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Exon	Effect	Phenotype[1]	Enzyme activity		Notes
						In vivo	*In vitro*	
UGT1A1*99	801delC	Frameshift	1	Frameshift	CN1	-	-	
UGT1A1*100	576(C>G)	Y192X	1		CN1	-	-	
UGT1A1*101	1060(T>C)	W354R	3		CN2	-	-	
UGT1A1*102	111(C>A)	P34Q	1		CN2	-	-	Referred to 101
UGT1A1*103	1207(C>T)	R403C	4		CN2	-	-	
UGT1A1*104	IVS1-1 (G>A)		Intron 1		CN2	-	-	Referred to 865(-1G>A)
UGT1A1*105	IVS4+1 (G>T)		Intron 4		CN2	-	-	Referred to 1304(+1G>T)
UGT1A1*106	1433(C>A)	A478D	5		CN2	-	-	
UGT1A1*107	118(T>C)	W40R	1		CN2	-	-	
UGT1A1*108	396-401del CAACAA	H132Q ; N133_K134del	1		CN2	-	-	Referred to 397-402 del CAACAA
UGT1A1*109	554(A>C)	Q185P	1		CN2	-	-	
UGT1A1*110	1(A>G)		1		CN2	-	-	
UGT1A1*111	470insT	Frameshift	1	Frameshift	CN2	Inactive	-	

ตารางที่ 2-1 แสดง *UGT1A1* allele nomenclature (ต่อ)

(ที่มา: http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm)

Allele naming	Nucleotide Change	Amino Acid Change	Exon	Effect	Phenotype[1]	Enzyme activity		Notes
						In vivo	*In vitro*	
UGT1A1*112	-1353(C>A)		Promoter		-	-	Reduced	
UGT1A1*113	1477(G>C)	G493R	5		CN2	-	-	

[1]ฟีโนไทป์ (phenotypes):

CN1 = โรค Crigler-Najar ชนิด 1,

CN2 = โรค Crigler-Najar ชนิด 2,

Gilbert = โรค Gilbert syndrome

3. ภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิด (neonatal jaundice)

3.1 ภาวะตัวเหลืองเป็นภาวะที่พบได้ในทารกแรกเกิดถึงร้อยละ 60 (Meredith and Bethl, 2002) แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1) Physiological jaundice เป็นภาวะตัวเหลืองที่พบในวันที่ 2-3 หลังคลอด และอาการลดลงภายในวันที่ 5-7 ซึ่งในเด็กคลอดครบกำหนดจะมีค่าบิลิรูบินสูงสุดไม่เกิน 12 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และในทารกคลอดก่อนกำหนดมีค่าบิลิรูบินไม่เกิน 15 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ซึ่งเชื่อว่าเกิดจาก 3 สาเหตุดังนี้ คือ

- ทารกแรกเกิดมีการสร้างบิลิรูบินมากกว่าผู้ใหญ่หรือเด็กโตถึง 2 เท่า เนื่องจากอายุเม็ดเลือดแดงของทารกสั้นกว่าผู้ใหญ่ (อายุของเม็ดเลือดแดงของทารกและผู้ใหญ่เท่ากับ 90 และ 120 วัน ตามลำดับ) การแตกของเม็ดเลือดแดงจึงมากกว่า และถ้า ductus venosus ยังเปิดอยู่เลือดจาก portal vein จะลัดเข้า inferior venacava ทำให้เลือดไปเลี้ยงตับลดลง บิลิรูบินจึงถูกควบจับได้น้อยลงด้วย

- ทารกแรกเกิดมีการเจริญของตับยังไม่สมบูรณ์ ทำให้มีการสร้าง Y และ Z protein และเอนไซม์ UDP-glucuronyl transferase น้อย

- Enterohepatic circulation ของบิลิรูบินมีส่วนช่วยให้เด็กตัวเหลืองมากขึ้น

2) Pathological juandice เป็นภาวะตัวเหลืองที่พบได้เร็วภายใน 24 ชั่วโมง หลังคลอด ซึ่งอาจมีค่าบิลิรูบินสูงถึง 20 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และทำให้ทารกถึงตายได้ ภาวะตัวเหลืองชนิดนี้มีสาเหตุดังนี้

- มีการสร้างบิลิรูบินมากผิดปกติ เนื่องจาก 1) เม็ดเลือดแดงแตกมาก เนื่องจากกรุ๊ปเลือดของแม่และลูกไม่ตรงกัน โดยแม่มีเลือดกรุ๊ป O และลูกมีเลือดกรุ๊ป A หรือ B (AO หรือ BO incompatibility) หรือเด็กมีเลือด Rh^{+} แต่มารดามีเลือด Rh^{-} (Rh incompatibility) 2) รูปร่างเม็ดเลือดแดงผิดปกติแต่กำเนิด เช่น hereditary spherocytosis หรือ elliptocytosis 3) ภาวะเลือดข้น (polycythemia) 4) เอ็นไซม์ในเม็ดเลือดแดงพร่อง เช่น พร่อง G6PD หรือ pyruvate hinase ทำให้มีเลือดคั่ง เช่น cephalhematoma, skin ecchymoses หรือเลือดออกในทางเดินอาหาร (GI hemorrhage) 5) ผลจากการใช้ยา oxytocin ช่วยเร่งการคลอดในมารดาทำให้เม็ดเลือดแดงของเด็กแตกง่ายขึ้น เป็นต้น

- ตับมีการทำงานในการควบจับกับบิลิรูบินได้ไม่ดี เช่น 1) โรค Crigler-Najjar ชนิด 1 และ 2 (เนื่องจากขาดเอ็นไซม์ UDP-glucuronyl transferase) 2) Galactosemia 3) Hypothyroidsm 4) ได้รับยาหรือฮอร์โมนบางอย่างที่ขัดขวางปฏิกิริยาการควบจับ เป็นต้น

- การขับถ่ายบิลิรูบินไม่เป็นไปตามปกติ เช่น 1) ท่อน้ำดีอุดตันภายในหรือภายนอกตับ (เกิด biliary atresia หรือตับอักเสบ) 2) ลำไส้อุดตัน

- ภาวะที่มีการสร้างบิลิรูบินมาก แต่ขับออกได้น้อย เช่น 1) ภาวะติดเชื้อ 2) โรคติดเชื้อในครรภ์ (intrauterine infection) 3) Idiopathic respiratory distress syndrome

นอกจากนี้มีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลทำให้เกิดภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิด เช่น

- ทารกแรกเกิดมีน้ำหนักตัวน้อย (low birth weight) หมายถึง มีน้ำหนักตัวน้อยกว่า 2,500 กรัม ทารกแรกที่มีน้ำหนักตัวน้อยส่วนใหญ่เป็นทารกที่มีการคลอดก่อนกำหนด ซึ่งจะมีระดับของบิลิรูบิน ดังแสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ระดับของ total serum bilirubin กับน้ำหนักทารกที่คลอดก่อนกำหนด

น้ำหนักทารกที่คลอดก่อนกำหนด (กรัม)	ระดับ TSB (มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)
<1,000	5 – 7
1,001 – 1,500	7 – 10
1,501 – 2,000	10 – 12
2,001 – 2,501	12 – 15

TSB คือ total serum bilirubin

- ทารกคลอดก่อนกำหนด (prematurity) หมายถึง ทารกที่คลอดก่อนอายุครรภ์ 37 สัปดาห์ (น้อยกว่า 259 วัน) สำหรับทารกที่มีค่า total serum bilirubin (TSB) ที่สูงมากจะพิจารณาให้ทำ exchange transfusion เมื่อค่า TSB สูงเกินเกณฑ์ตามกลุ่มเสี่ยงของทารก โดยมีการจัดแบ่งกลุ่มทารกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1) กลุ่ม low risk ทารกที่มีอายุครรภ์ > 38 สัปดาห์

2) กลุ่ม medium risk ทารกที่มีอายุครรภ์ > 38 สัปดาห์และมีปัจจัยเสี่ยง หรือทารกที่มีอายุครรภ์ 35 - 37 สัปดาห์

3) กลุ่ม higher risk ที่มีอายุครรภ์ 35 - 37 สัปดาห์ และมีปัจจัยเสี่ยง

ซึ่งปัจจัยทั้งสองมีผลทำให้ระดับของเอนไซม์ ในการเกิดปฏิกิริยาควบจับกับบิลิรูบินน้อยกว่าในทารกที่มีน้ำหนักตัวปกติ และทารกที่คลอดครบกำหนด ส่งผลให้มีปริมาณของ บิลิรูบินอิสระในร่างกายมาก มีการขับออกได้ช้า ทารกจึงแสดงอาการตัวเหลือง ในรายที่มีอาการตัวเหลืองมาก มีระดับบิลิรูบินสูงผิดปกติ อาจทำให้เกิดอาการ kernicterus ได้

Kernicterus คือความเป็นพิษของบิลิรูบินต่อเนื้อสมอง โดยมีบิลิรูบินอิสระหรือ unconjugated bilirubin กระแสเลือดมากเกินกว่าที่อัลบูมินจะจับด้วย ทำให้บิลิรูบินนี้อยู่อย่างอิสระในกระแสเลือด มีการผ่านเข้าสมอง โดยเข้าไปย้อมเนื้อสมองทำให้เซลล์สมองส่วนนั้นๆ เสียไปอย่างถาวร ซึ่งมักจะเป็นที่บริเวณก้านสมอง cerebellum, basal ganglion และ

hippocampus เกิดอาการผิดปกติทางสมอง อาการที่เกิดขึ้น ได้แก่ ซึม ไม่ดูดนม อาเจียน ร้องเสียงแหลม ไม่มีแรง ไม่มี moro reflex มักจะมีอาการกระสับกระส่าย กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง หลังแอ่น และชัก เด็กบางรายอาจไม่แสดงอาการเหล่านี้ในระยะหลังคลอด แต่เมื่อโตขึ้นอาจมีความผิดปกติทางสมอง และจิตใจหรือพัฒนาการช้า หรือหูหนวก

3.2 การวินิจฉัยอาการตัวเหลือง

1) การสังเกตุสีผิว เด็กทารกจะเริ่มมีอาการเหลืองที่บริเวณใบหน้าก่อน แล้วค่อยๆ ไล่ลงมาที่ลำตัว ไปขาและเท้า ถ้ามีอาการเหลืองเฉพาะใบหน้าและลำตัว ถือว่าเหลืองไม่มาก แต่ถ้าลงมาขาและเท้าถือว่าเหลืองมาก ซึ่งอาการเหลืองที่เกิดขึ้นในบริเวณต่างๆ ของร่างกาย ก็จะมีระดับของบิลิรูบินที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2-3 การสังเกตอาการตัวเหลืองในเด็กทารกจะต้องกดผิวหนังลงสังเกตส่วนที่กดจะเห็นเป็นสีเหลือง เหตุที่ต้องกดผิวหนังลงเพราะเด็กตัวแดงทำให้ดูยาก ถ้าดูแล้วเห็นว่าเหลืองไม่มากไม่จำเป็นต้องตรวจเลือด แต่ถ้าเหลืองมากต้องเจาะเลือดตรวจ

ตารางที่ 2-3 ค่า total serum bilirubin โดยประมาณเมื่อเทียบกับระดับความเหลืองที่เห็นจากสายตา (Kramer, 1969)

ระดับความเหลืองที่เห็นจากสายตา	ค่า TSB (มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)
ศีรษะและหน้า	6
บริเวณหน้าอก ถึง สะดือ	9
ขาหนีบ จนไปถึงขาส่วนบน	12
ขาส่วนล่าง หรือแขนท่อนล่าง	15
มือ และเท้า	>15

TSB คือ ค่า total serum bilirubin

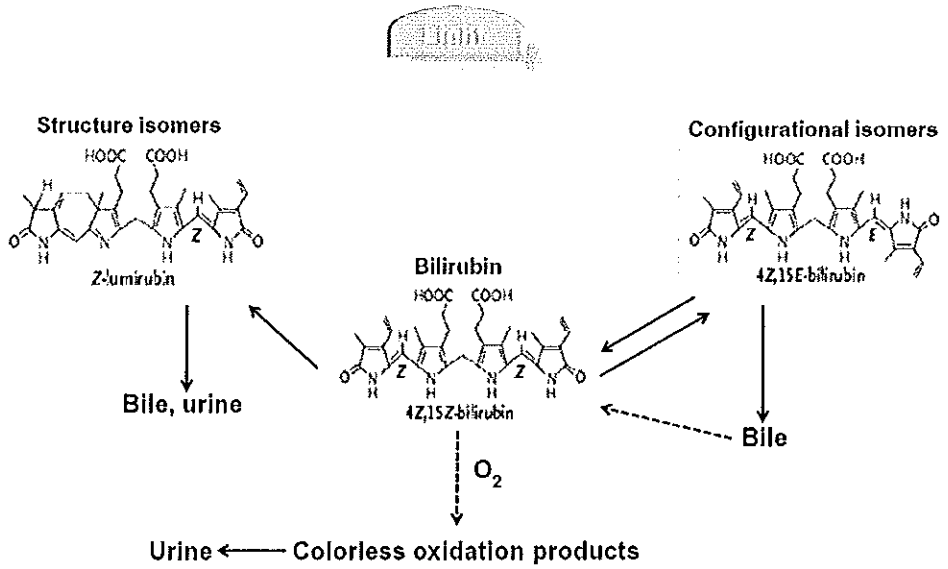
2) การเจาะเลือดตรวจหาระดับบิลิรูบิน การเจาะเลือดสามารถเจาะจากส้นเท้าหรือเจาะจากเส้นเลือดโดยตรง

3) การใช้เครื่องตรวจระดับบิลิรูบินที่เรียกว่า bilirubinometer โดยการตรวจจะใช้เครื่องแนบกับผิวหนังบริเวณกลางหน้าอก หรือกลางหน้าผาก แล้วปล่อยแสงคล้ายแฟลชกล้องถ่ายรูป 1-3 ครั้ง แล้วเครื่องก็จะอ่านค่าบิลิรูบินที่วัดได้ จากแสงที่สะท้อนจากผิวหนังทารกกลับเข้ามายังเครื่องวัดในทันที

อย่างไรก็ตามการเจาะเลือดยังเป็นวิธีที่ใช้ยืนยันค่าบิลิรูบินที่แม่นยำที่สุด โดยเฉพาะ เมื่อเด็กมีตัวเหลืองมากจนถึงขั้นผิดปกติ ในขณะที่การสังเกตสีผิว หรือการใช้เครื่อง bilirubinometer เป็นวิธีการตรวจเบื้องต้นในรายที่สงสัยว่าทารกเหลืองมากเกินไปหรือไม่

3.3 วิธีรักษาภาวะตัวเหลืองของทารก

1) การส่องไฟด้วยแสงสีขาวหรือฟ้า โดยทำให้ผิวหนังของทารกสัมผัสกับแสงให้มากที่สุด ยกเว้นบริเวณตา และอวัยวะเพศ วิธีนี้จะช่วยทำให้บิลิรูบินเปลี่ยนเป็นฟอร์มที่ละลายน้ำได้โดยผ่านทางผิวหนัง และทำให้มีการขับบิลิรูบินออกทางปัสสาวะเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2-14) การส่องไฟต้องใช้เวลาอย่างน้อย 4-6 ชั่วโมง จึงจะเริ่มเห็นผล โดยทั่วไปแพทย์จะให้ทารกส่องไฟประมาณ 1-2 วัน



รูปที่ 2-14 กลไกการรักษาด้วยวิธีการส่องไฟ (mechanism of phototherapy) เมื่อมีการรักษาด้วยวิธีการส่องไฟ บิลิรูบิน (4Z, 15Z-bilirubin) จะเปลี่ยนรูปไปเป็น Z-lumirubin และ 4Z, 15E-bilirubin ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สามารถขับออกจากร่างได้ทางน้ำดีและปัสสาวะ (ดัดแปลงจาก Maisels and McDonagh, 2008)

2) การเปลี่ยนถ่ายเลือดให้ทารก โดยใช้เลือดจากคลังเลือดที่มีการตรวจแล้วว่าปราศจากเชื้อโรค และไม่เป็นอันตรายต่อทารก วิธีนี้จะเห็นผลชัดเจนเมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนการเปลี่ยนถ่ายเลือด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง จึงใช้ในกรณีเร่งด่วนฉุกเฉินเป็นหลัก หลังเปลี่ยนถ่ายเลือดเสร็จแล้ว แพทย์จะให้ทารกส่องไฟต่อจนหายดี

3) การใช้ยากระตุ้นการขับสารบิลิรูบินออกจากร่างกาย นิยมใช้ยา phenobarbital ขนาดต่ำๆ ซึ่งถือว่าปลอดภัยมาก และมีราคาไม่แพง ป้อนทารก วันละ 1 ครั้ง ก็ได้ผลดีพอๆ กับการรักษาด้วยวิธีการส่องไฟ แต่มีข้อเสียคือ วิธีนี้ได้ผลช้าต้องใช้เวลากว่า 2 วัน จึงจะเริ่มเห็นผล

4. การสกัด DNA จากเลือด

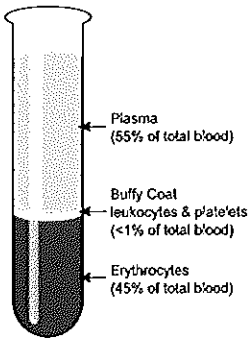
เลือดของสัตว์แต่ละชนิดจะมีกระบวนการสำหรับการสกัด DNA ที่ไม่เหมือนกัน เนื่องจากลักษณะทางจุลกายวิภาคของเลือดไม่เหมือนกัน คือ ในสัตว์ปีก หรือสัตว์เลื้อยคลาน การสกัดดีเอ็นเอ สามารถทำได้โดยตรงกับเม็ดเลือดทุกชนิดของสัตว์เหล่านี้ เพราะมีนิวเคลียส (nucleus) แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีเฉพาะเม็ดเลือดขาวเท่านั้นที่มีนิวเคลียส การสกัด DNA จึงต้องทำการแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นเม็ดเลือดขาว (white blood cells) ออกมาใช้สำหรับการสกัด (กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์, 2551)

หลักการและขั้นตอนการเก็บเลือดและสกัดแยกดีเอ็นเอจากเลือด

นำเลือดที่ได้มาทำการเก็บแบบ unclot

1) นำเลือดไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,100 rpm เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกชั้นของเลือด

2) เมื่อการปั่นสมบูรณ์ จะเห็นเลือดแบ่งออกเป็น 3 ชั้น (รูปที่ 2-15) ชั้นบนสุดเป็นของเหลวใสสีเหลืองคือส่วนที่เรียกว่าน้ำเลือด (serum) ถัดลงมาเป็นชั้นบางๆ สีขาว (buffy coat layer) เป็นชั้นของเม็ดเลือดขาว ถัดมาจะเป็นชั้นของเม็ดเลือดแดงที่อัดตัวกันอยู่แน่น ใช้หลอดแก้วชนิดปลายแหลมเล็ก (pasture pipette) ดูดเอาเฉพาะส่วนของเม็ดเลือดขาวมาใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ระวังอย่าให้มีการปนเปื้อนของเม็ดเลือดแดงหรือมีการปนเปื้อนน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้



รูปที่ 2-15 องค์ประกอบของเลือดหลังจากการนำไปหมุนเหวี่ยง ซึ่งเลือดมีการแยกออกเป็น 3 ส่วนคือ 1) พลาสมา 2) buffy coat และ 3) erythrocytes (ที่มา: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/Blood-centrifugation-scheme.png)

3) เติมน้ำ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากับเม็ดเลือดขาวโดยการพลิกหลอดไปมาประมาณ 20 วินาที จากนั้นเติม 9% NaCl ลงไป 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาเช่นกัน

4) ทำการปั่นตกด้วยความเร็ว 1,100 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เพื่อแยกเอาส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แตกออก รวมทั้งส่วนของเม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนมา ส่วนของตะกอนที่ได้จะเป็นดีเอ็นเอ

5) ทำขั้นตอนที่ 3 และ 4 ซ้ำถ้ายังพบว่ามีเม็ดเลือดแดงปนอยู่ในดีเอ็นเอที่ก้นหลอด

6) เติม lysis buffer 700 ไมโครลิตร และ proteinase K 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

7) นำไป incubate ในเครื่อง shaking incubator ที่ 50°C ความเร็ว 100 rpm ทิ้งไว้ข้ามคืน

8) เติม phenol: chloroform (1:1) ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณสารละลายในหลอด (ประมาณ 750 ไมโครลิตร) เขย่าให้เข้ากันหรืออาจใช้เครื่องเขย่า จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,100 rpm เป็นเวลา 10 นาที

9) หลังจากการปั่นจะได้สารแยกกันเป็นสองชั้นโดยชั้นล่างจะเป็นส่วนของ phenol: chloroform สำหรับดีเอ็นเอ จะปนอยู่กับสารที่อยู่ชั้นบน ให้เอาเฉพาะสารที่อยู่ชั้นบนไปใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร

10) หากพบว่าสารละลายที่ได้มีชิ้นส่วนของเซลล์ปนอยู่มาก คือสารละลายที่ได้ไม่ใส ให้ทำตามขั้นตอนที่ 8 และ 9 ซ้ำ

11) เติม chloroform ในปริมาณที่เท่ากับสารละลายในหลอด เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

12) หลังจากการปั่นจะได้สารแยกกันเป็นสองชั้นเช่นกัน โดยชั้นล่างเป็นส่วนของ chloroform ส่วนดีเอ็นเอ จะปนอยู่กับสารที่อยู่ชั้นบน ให้เอาเฉพาะสารชั้นบนไปใส่ในหลอดใหม่ ขนาด 2 มิลลิลิตร

13) ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยการเติม 3 M sodium acetate pH 5.8 ในปริมาณที่เท่ากับสารที่มีอยู่แล้วในหลอด จากนั้นเติม isopropanol 1 มิลลิลิตรหรือ 100% ethanol 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นตกที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที (บางห้องปฏิบัติการจะแนะนำให้ตกตะกอนดีเอ็นเอใน sodium acetate และ isopropanol ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 คืน)

14) จะเห็นดีเอ็นเอจับเป็นก้อนใสที่ก้นหลอด เอาส่วนที่เป็นสารละลายใสทิ้ง เติม 75 % ethanol 1 มิลลิลิตร ปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที

15) จะเห็นดีเอ็นเอจับเป็นก้อนใสที่ก้นหลอดเช่นเดิม เอาส่วนที่เป็นสารละลายใสทิ้งปล่อยให้ ethanol ที่อยู่ในดีเอ็นเอระเหยจนแห้ง จากนั้นจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 300-500 ไมโครลิตร

16) เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

*** การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเลือดสามารถทำตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้นหรืออาจใช้ Kit reagents ตามโปรโตคอลในคู่มือ kits แต่ละยี่ห้อ

5. Polymerase chain reaction (วสันต์ จันทราทิตย์ และคณะ, 2539; จริยา ชมวารินทร์ และคณะ, 2540; พจน์ ศรบุญลือ และคณะ, 2540; มนตรี จุพาวัฒนทล และคณะ, 2542)

5.1 ทฤษฎีและหลักการของเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

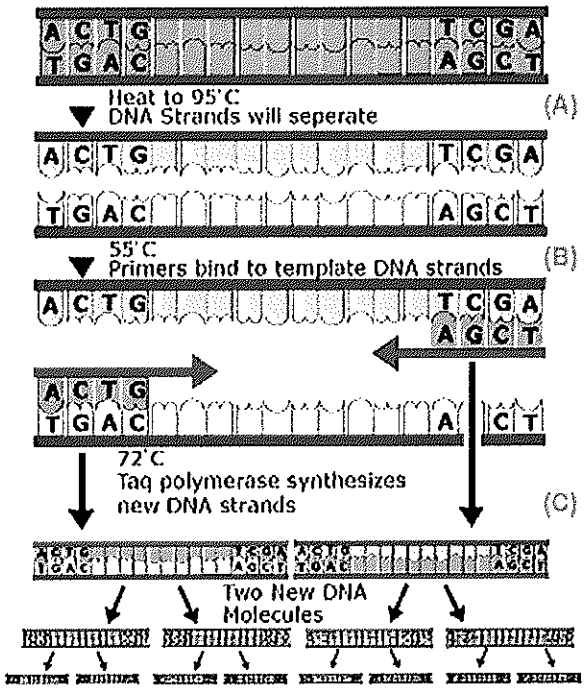
เทคนิคการทำ PCR โดยทั่วไปมักมีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มจำนวนตำแหน่งของยีนที่ต้องการ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายเท่า โดยทำในหลอดทดลอง ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *In vitro* enzymatic gene amplification วิธีนี้มีประโยชน์ในการตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1983 โดย Kary Mullis และคณะ ทำให้ได้รับรางวัลโนเบลสาขาเคมี (Nobel Prize in Chemistry) ในปี ค.ศ.1993 (http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html) โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติ ซึ่งอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์ DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไป โดยจะเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวหนึ่งใน 4 ชนิดคือ dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (template) ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ไพร์เมอร์ 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ (รูปที่ 2-16)

- Denaturation: เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95°C

- Primer annealing: เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60°C เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเข้าเกาะติดกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม

- Primer extension: เป็นขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอ โดยการต่อนิวคลิโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' โดย

อาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75°C



รูปที่ 2-16 ขั้นตอนการทำ polymerase Chain Reaction (PCR)
(A= ขั้นตอน denaturation, B= ขั้นตอน primer annealing, C= ขั้นตอน primer extension)
(ที่มา: http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04etta/background/dna/media/dna_1.html)

เมื่อพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลายๆ รอบของ PCR ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกๆ รอบ ลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า

5.2 การเตรียมองค์ประกอบในการทำ PCR

1) การเก็บสิ่งส่งตรวจหรือตัวอย่างเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ส่งตรวจอาจเป็นเนื้อเยื่อจากพืช สัตว์ หรือสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย เช่น เลือด สารน้ำต่างๆ ชิ้นเนื้อ อาจเป็น fixed paraffin-embedded tissue สามารถเอามาสกัดสารพันธุกรรมที่เป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ก็ได้ โดยใช้วิธีง่ายๆ และรวดเร็ว ซึ่งมีหลาย

วิธีสามารถสกัดเอาดีเอ็นเอปริมาณน้อยๆ ได้เนื่องจากเทคนิค PCR มีความไวสูง และใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อยๆ ได้ และสามารถเลือกเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในช่วงสั้นๆ ได้ดี จึงสามารถใช้กับสิ่งตรวจที่เป็นตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นระยะเวลานาน ทำให้มีประโยชน์นำไปใช้กับงานนิติเวชได้

2) ดีเอ็นเอต้นแบบ

ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลำดับเบสเป้าหมายหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) สามารถที่จะใช้ในปฏิกิริยาของ PCR ในลักษณะดีเอ็นเอสายเดี่ยวหรือสายคู่ก็ได้ แม้ว่าขนาดของดีเอ็นเอไม่ใช่ปัญหามากนัก แต่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอมีขนาดสั้นๆ อยู่ในรูปปลายเปิดจะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าเพราะไพรเมอร์จะเข้าไปจับ ซึ่งช่วยให้ง่ายต่อการเพิ่มจำนวนและลดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะลง โดยทั่วไปควรทดสอบปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณที่ต้องการเพียงพอและมีความไวที่เหมาะสม

3) การออกแบบนิวคลีโอไทด์ตั้งต้น

การเลือกออกแบบไพรเมอร์ที่จะใช้ต้องเลือกให้เหมาะสมกับแต่ละงานโดยอาศัยหลักการจับคู่กันแบบจำเพาะของดีเอ็นเอ ที่ต้องการตรวจหากับไพรเมอร์โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับเบสที่นำมาสังเคราะห์ไพรเมอร์ ข้อแนะนำในการเลือกและออกแบบไพรเมอร์ ได้แก่

- ความยาวของไพรเมอร์: ควรมีความยาวประมาณ 18 ถึง 30 นิวคลีโอไทด์ขึ้นอยู่กับงานที่ใช้

- ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีการกระจายของเบสอย่างสม่ำเสมอ

- ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี GC-content อยู่ระหว่าง 40-50% ไม่ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีปริมาณ GC-content ที่สูงเกินไป

- ไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมาย ในดีเอ็นเอต้นแบบนั่นคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ

- หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง

- ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ไม่ให้เป็นคู่สมกันเอง

- ค่า T_m (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง 55-80°C

- ไพรเมอร์ควรมีลำดับเบสคู่สมกับปลายด้าน 3 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ

4) Thermostable DNA polymerase

Thermostable DNA polymerase ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ *Taq* polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนที่มีชื่อ *Themus aquaticuse* (*Taq*) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denature และสามารถ

ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอได้ที่อุณหภูมิสูงคือ 70-85°C และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 72°C

Taq DNA polymerase เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 94 kDa ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase อยู่ในช่วง 1.0-2.5 ยูนิต (U) ความเข้มข้นที่ใช้ขึ้นกับปริมาณและลักษณะของดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ ด้วยการใช้เอนไซม์ที่มากเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้น ทำให้เกิด nonspecific background มาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นน้อยเกินไปก็จะทำให้ได้ผลผลิตน้อย

5) Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200 ไมโครโมลาร์ (μM) ของแต่ละ dNTP แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัว จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 ไมโครโมลาร์ ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไป จะเกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาด การเตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น primary stock solution ที่เจือจาง 10 ไมโครโมลาร์ แล้วแบ่งออกเป็น aliquot เก็บที่ -20°C

6) บัฟเฟอร์

ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCL, KCL, $MgCl_2$ และ Glycerol ความเข้มข้นและภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบต่างๆ ในบัฟเฟอร์มีดังนี้

- ความเข้มข้นของ Magnesium ion (Mg^{2+})

Taq DNA polymerase ต้องการ Mg^{2+} เพื่อช่วยส่งเสริมให้ปฏิกิริยาการขยายสายดีเอ็นเอ โดย Mg^{2+} จะทำหน้าที่เป็นโคเฟคเตอร์ (co-factor) นอกจากนั้น Mg^{2+} ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และมีผลต่อการเข้าจับของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ต้องปรับเปลี่ยนให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs โดยทั่วไปความเข้มข้นที่พอเหมาะ Mg^{2+} คือต้องเหลือแมกนีเซียมในรูปอิสระประมาณ 0.5-1.0 มิลลิโมลาร์ (mM) โดยทั่วไปมักใช้แมกนีเซียมความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่มากเกินไป ทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และพบว่าการปรับค่า Mg^{2+} ก็จะช่วยให้ไพรเมอร์มีการเข้าจับที่มีความจำเพาะขึ้น เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

- pH

pH ที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ *Taq* DNA polymerase คือที่ pH 7-7.5 ที่อุณหภูมิ 72°C แต่ปกติ *Taq* DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH 8.5-9.0 ที่ 25°C เนื่องจาก pH ของ Tris buffer จะลดลงประมาณ 0.03 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72°C จะได้ pH 7.3

เทคนิคนี้อาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase สรุปขั้นตอนอย่างง่ายได้ดังนี้

- นำชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจมาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายที่เหมาะสมแก่การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ แยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากกันจนเป็นเส้นเดี่ยวด้วยความร้อน

- ใส่ oligonucleotide primer สองชนิดลงไปในสารละลายดีเอ็นเอนั้น แล้วค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลง ไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายสองตำแหน่งคร่อมบริเวณ variable number tandem repeats (VNTRs) ที่เราสนใจ

- DNA polymerase จะใช้สายดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวนั้นเป็นดีเอ็นเอต้นแบบแล้วสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ที่เติมเอาไว้

- ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปแล้วจึงหยุด จากนั้นแยกสายดีเอ็นเอ เติมไพรเมอร์เป็นรอบๆ จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มี VNTRs และมีขนาดเท่า ๆ กันในปริมาณที่มากจนพอแก่การใช้งานต่อไป

5.3 ข้อควรระวังในการทำ PCR

การปนเปื้อน เทคนิค PCR เป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มาก แต่ก็สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสิ่งที่ปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยได้เช่นกัน การปนเปื้อนอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุเช่น การสกัดแยกดีเอ็นเอ หรือจากการปนเปื้อนของผลการทำ PCR ครั้งก่อน (carry over contamination) ซึ่งมักจะอยู่ในรูปของละอองลอยขณะเปิดหรือปิดฝาหลอด และการปั่นตกตะกอน ละอองนี้สามารถปนเปื้อนกับสิ่งต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ เช่น อุปกรณ์ เครื่องมือและวัสดุต่างๆ รวมทั้งผิวหนัง ผม และมือของผู้ปฏิบัติการเอง ดังนั้นจึงควรมีการระมัดระวังการปนเปื้อนให้มาก

5.4 ข้อจำกัดทางด้านเทคนิคของวิธี PCR

1) ข้อผิดพลาดในการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase มีความผิดพลาดในการนำเบสที่ไม่ใช่คู่สมมาต่อกับดีเอ็นเอที่กำลังสร้างขึ้นมาเท่ากับ 10-5 error/base เมื่อทำ PCR ไป 30 รอบ โอกาสที่จะผิดพลาดจะพบ 1 ใน 3,000 bp ของผลผลิต PCR

2) ความยาวของขนาด PCR ถึงแม้ว่า PCR จะสามารถทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาดยาว 10 kb ได้ แต่ส่วนใหญ่จะได้ผลดีที่สุด เมื่อขนาดของ PCR ไม่มากกว่า 2 kb เพราะถ้ายาวกว่านี้ความผิดพลาดจะมากขึ้น เนื่องจากไพรเมอร์และ *Taq* DNA polymerase ทำงานไม่สมบูรณ์ โดยการจับ dNTPs ที่ไม่ถูกต้องมาต่อเข้าภายในสายดีเอ็นเอมากขึ้น

6. การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

เทคนิคการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้หาลำดับเบสบนโมเลกุลอาร์เอ็นเอ ซึ่งหลักการทำ DNA sequencing คือ ทำให้เกิดชิ้นดีเอนเอที่มีขนาดต่างกัน

เพียงหนึ่งเบส โดยใช้ปฏิกิริยาทำให้ชิ้นดีเอ็นเอถูกตัดตำแหน่งที่มีเบสจำเพาะ หรือสังเคราะห์ให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสจำเพาะทั้ง 4 ชนิด

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอมี 2 วิธีการคือ

1) วิธีการทางเคมี หลักการคือ การนำดีเอ็นเอไปทำปฏิกิริยากับสารจำเพาะที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เบสใดเบสหนึ่งหรือสองเบส หลังจากนั้นกำจัดเบสนั้นออกจากสายพอลินิวคลีโอไทด์ และทำการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตรงตำแหน่งที่ไม่มีเบสออก วิธีการศึกษาลำดับเบสทางเคมี

- ติดฉลากดีเอ็นเอที่สนใจศึกษาลำดับเบสที่ปลายด้านใดด้าน
- แยกชิ้นดีเอ็นเอมาหนึ่งสายเพื่อศึกษาลำดับเบส
- นำไปทำปฏิกิริยากับสารเคมีจำเพาะ เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เบสใดเบสหนึ่งหรือสองเบส (G, G+A, T+C, C)
- กำจัดเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงนี้ออกจากสายนิวคลีโอไทด์
- ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ตรงตำแหน่งที่ไม่มีเบสออก
- ทำ 1% agarose gel electrophoresis เพื่อแยกขนาดของดีเอ็นเอ
- ติดตามลำดับเบสโดยเทคนิค autoradiography

ตารางที่ 2-4 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อตัดเบสที่ตำแหน่งจำเพาะ

ชนิดของเบส	สารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับเบส	สารที่ใช้กำจัดเบส	สารที่ใช้ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์
G	Dimethyl sulfate	Piperidine	Piperidine
G + A	Acid	Acid	Piperidine
T + C	Hydrazine	Piperidine	Piperidine
C	Hydrazine + NaCl	Piperidine	Piperidine

ประโยชน์ของการศึกษาลำดับเบสทางเคมี

- ศึกษาลำดับเบสของโมเลกุลดีเอ็นเอ หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสังเคราะห์
- ใช้ศึกษา DNA modification เช่นการเกิด DNA methylation
- ใช้ศึกษาโครงสร้าง secondary structure ของดีเอ็นเอ และโครงสร้างระหว่าง DNA-protein interaction

ข้อเสียของการศึกษาลำดับเบสทางเคมี

- การเตรียมดีเอ็นเอยุ่งยาก และใช้เวลานาน
- ในขั้นตอนการติดฉลากดีเอ็นเอที่ปลายด้านใดด้านหนึ่ง มีผลทำให้เกิดการสูญเสียดีเอ็นเอออกไป ทำให้การอ่านลำดับเบสที่ได้ไม่ดี

2) การหาลำดับเบสโดยใช้เอนไซม์ หลักการคือ อาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase I ในการเติมเบสเข้าที่ปลาย 3' (ที่เป็นหมู่ hydroxy) ของไพรเมอร์เพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสม และการเติมเบสนี้จะหยุดที่ตำแหน่งเบสจำเพาะแต่ละเบส โดยวิธีการเติมสาร 2',3'-dideoxyribonucleotide ลงไป ซึ่งสารที่เติมลงไปจะทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสิ้นสุดลง เนื่องจากไม่มีหมู่ hydroxyl ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์จึงทำให้เรียกวิธีการนี้ว่า dideoxy chain terminating method วิธีการศึกษาลำดับเบสโดยวิธีใช้เอนไซม์

- เตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาลำดับเบสให้อยู่ในรูปดีเอ็นเอสายเดี่ยว
- เตรียมโอลิโกนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้เป็นไพรเมอร์ เช่น สังเคราะห์จากส่วนของดีเอ็นเอพาหะ สังเคราะห์จากส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาลำดับเบส
- ติดฉลากไพรเมอร์หรือนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตชนิดใดชนิดหนึ่งก็ได้
- แบ่ง DNA ออกเป็นสี่ส่วนเพื่อนำไปทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ในสี่หลอดที่มี deoxynucleotide ทั้งสี่ชนิด (คือ dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) อยู่ และมี dideoxynucleotide (ddNTPs) ชนิดใดชนิดหนึ่งอยู่ด้วย
- ทำให้เกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสม โดยอาศัยการเติมนิวคลีโอไทด์เข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase
- ทำ 1% agarose gel electrophoresis เพื่อแยกขนาดของดีเอ็นเอ
- ติดตามลำดับเบสโดยเทคนิค autoradiography

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

- วิธีการทางเคมี
    1) ดีเอ็นเอต้นแบบ
    2) สารที่ใช้ติดฉลาก
- วิธีการใช้เอนไซม์
    1) ดีเอ็นเอต้นแบบ
    2) สารที่ใช้ติดฉลาก
    3) ไพรเมอร์
    4) เอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอ
    5) สารอะนาล็อก

7. Electrophoresis

Electrophoresis คือวิธีการวิเคราะห์ประเภทของสารโดยการวัดอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละสารประกอบในคอลลอยด์ขณะที่อยู่ในสนามไฟฟ้า (ทั้งสารละลายและอนุภาค) ในตัวกลางภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า (รัชดา เครสซี่, 2552)

7.1 ส่วนประกอบและสารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา

1) ชนิดของ support media

- Agarose

Agar คือ acidic polysaccharide ที่ประกอบไปด้วย monomer ของ sulfated galactose ส่วน agarose คือส่วนของ agar ที่ไม่มีหมู่ sulfate แต่ agarose ยังมีส่วนประกอบเป็น agaropectin ปนเปื้อนอยู่ด้วย ซึ่งจะมีมากหรือน้อยก็ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของ agarose ส่วนของ agaropectin ใน agarose จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของของเหลว หรือที่เรียกว่า "endoosmosis" เนื่องจากการที่ agaropectin มีหมู่ sulfate และ carboxylic นั่นเอง นอกจากนี้หมู่เหล่านี้ยังทำให้เกิดสี background เวลาที่ย้อมเจลด้วย การใช้ agarose ที่ไม่มีหมู่เหล่านี้จะทำให้ปัญหาเกิดขึ้นน้อยมาก ส่วนใหญ่จะใช้ agarose ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.5-1.0 กรัมต่อเดซิลิตรของบัฟเฟอร์ ซึ่งความเข้มข้นนี้สามารถใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 0.5-20 kb ได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่านี้จะต้องใช้ agarose ชนิด low-melting-temperature grade

ขนาดช่องว่างของ agarose gel นั้นใหญ่เกินกว่าขนาดของโปรตีน ทำให้เกิดการแยกตามขนาดของโปรตีนได้ และได้โซนของโปรตีน คือหนึ่งโซนจะมีโปรตีนมากกว่า 1 ชนิด และโซนจะมีลักษณะที่หนา เนื่องจากมีการแพร่กระจายของโปรตีนออกด้านข้าง ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการใช้ agarose gel และ cellulose acetate ในการแยกโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับสารที่มีความสามารถในการแยกสูงอย่าง polyacrylamide แต่ข้อดีของ agarose ก็คือจะไม่จับกับโปรตีน และมีลักษณะใสเมื่อทำให้แห้ง ทำให้สามารถหาปริมาณของแบนที่แยกได้ ด้วยเครื่อง densitometer

ดีเอ็นเอเป็นโมเลกุลที่มีอัตราส่วนของประจุต่อขนาด (charge to mass ratios) ที่เท่าๆ กัน ดังนั้นการแยกดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล ซึ่งถ้าขนาดเล็กก็จะทำให้วิ่งในสนามไฟฟ้าผ่าน agarose gel ได้เร็วกว่า ดีเอ็นเอขนาดใหญ่ นอกจากนี้ความเร็วของการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับรูปร่างของดีเอ็นเอด้วย เช่น รูปร่างกลม จะวิ่งได้เร็วกว่าเส้นตรง อย่างไรก็ตามพบว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 50-100 kb จะเคลื่อนที่เท่ากัน ทำให้แยกออกจากกันไม่ได้ ต้องอาศัยเทคนิคที่เรียกว่า pulsed-field electrophoresis ข้อเสียหนึ่งที่อาจเกิดขึ้นได้ในการ agarose gel แยกดีเอ็นเอก็คือใน agarose อาจมีตัวที่ไปยับยั้งเอนไซม์ที่จำเป็นในการใช้ตัดดีเอ็นเอเมื่อแยกดีเอ็นเอได้แล้ว

- Cellulose acetate

เป็นสารที่เตรียมจากการทำปฏิกิริยากันระหว่างเซลลูโลส (cellulose) และ acetic anhydride ซึ่งมีการทำออกมาจำหน่ายในลักษณะแผ่นแห้งที่เคลือบด้วยผงสีขาวที่แตกหลุดออกมาได้ง่าย โดยที่เวลาจะใช้ต้องแช่ลงในบัฟเฟอร์ แผ่น cellulose acetate นิยมใช้แยกโปรตีนในซีรั่ม โดยจะหยอดซีรั่มปริมาณ 0.3-2 ไมโครลิตร แผ่น cellulose acetate จะโปร่งแสงเมื่อถูกแช่ในตัวทำละลายที่มี 95% methanol และ 5% glacial acetic acid ซึ่งคุณสมบัติการโปร่งแสงนี้ทำให้สามารถหาความเข้มของ band โดยใช้เครื่อง densitometer ได้

- Polyacrylamide

Polyacrylamide คือ polymer ของ acrylamide ตัวเจลของ polyacrylamide มีคุณสมบัติทนความร้อน (thermostable) โปร่งแสง แข็งแรงและค่อนข้างที่จะเฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยา เจลชนิดนี้ไม่มีขั้ว จึงไม่ทำให้เกิด "eletroendosmosis" และสามารถเตรียมให้มีรูพรุนขนาดต่างๆ ได้ polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้น 7.5% จะมีขนาดของรูพรุน พอๆ กับของ agarose gel คือประมาณ 5 นาโนเมตร ซึ่งใหญ่พอที่จะให้โปรตีนเกือบทั้งหมดในซีรั่มผ่านได้โดยไม่ถูกขัดขวาง อย่างไรก็ตามโปรตีนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง หรือความยาวเกินกว่านี้จะถูกต้านไว้ ตัวอย่างเช่น β_1-lipoprotein, α_2-macroglobulin และ γ-globulin ดังนั้นโปรตีนจะถูกแยกโดยอาศัยทั้งขนาดและประจุต่อมวล (charge to mass ratio) เรียกลักษณะแบบนี้ว่า "molecular sieving" นอกจากนี้ acrylamide เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งจึงควรระมัดระวังเป็นพิเศษขณะทำการเตรียมเจล

Polyacrylamide สามารถใช้ในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันได้น้อยที่สุดถึง 0.2% ของความยาว (1 bp ใน 500 bp) นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกด้วย polyacrylamide gel ยังมีความบริสุทธิ์ไม่มีส่วนของตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และการปนเปื้อนด้วย จึงนิยมใช้เจลชนิดนี้ในการแยกดีเอ็นเอ

2) เครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้า (power supplies)

หน้าที่ของเครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้าคือจ่ายกำลังไฟฟ้า มีทั้งแบบที่จ่ายกำลังไฟฟ้าโดยมีความต่างศักย์คงที่ (constant voltage) หรือกระแสคงที่ (constant current) การเคลื่อนที่ของกระแสไฟฟ้าผ่านไปยังตัวกลางที่มีความต้านทานจะเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดความร้อนโดยหลักการของ "Joule heat"

$$\text{Heat} = E \times I \times t$$

เมื่อ E = EMF มีหน่วยเป็นโวลต์ (volt: V)

I = กระแสไฟเป็นแอมแปร์ (amperes: H)

t = ระยะเวลามีหน่วยเป็นวินาที (s)

ความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการทำ electrophoresis จะมีผลไปเพิ่มคุณสมบัติการนำไฟฟ้าของระบบ (ลดความต้านทาน) ดังนั้นเมื่อใช้เครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้าแบบ constant-voltage จะมีผลให้ค่ากระแสไฟฟ้าสูงขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจะไปกระตุ้นไอออนที่มีอยู่ในบัฟเฟอร์ ผลทำให้โปรตีนเคลื่อนที่เร็วขึ้น และน้ำระเหยจากตัวเจลเร็วขึ้นด้วย ซึ่งการสูญเสียน้ำนี้จะทำให้ไอออนมีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งจะยิ่งไปลดความต้านทานลงไปอีก เพื่อลดผลที่อาจเกิดขึ้นนี้ต่ออัตราการเคลื่อนที่ จึงควรที่จะใช้ constant-current power supply ตามหลักการของ Ohm's law

$$E = I \times R$$

นั่นคือเมื่อ R ลดลง แรงขับเคลื่อนสาร (electromotive force) ก็จะลดลงด้วย (ในขณะที่กระแสไฟฟ้ายังคงที่) ซึ่งจากผลตรงนี้ก็กลับไปช่วยลดความร้อนลงด้วย ทำให้อัตราการเคลื่อนที่คงที่

ในการทำ isoelectric focusing (IEF) จำเป็นอย่างยิ่งที่ควรจะใช้เครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้าที่มีกำลังคงที่ ถ้าใช้เครื่องแบบ constant-voltage จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องคอยปรับค่าความต่างศักย์ตลอดเวลา เนื่องจากค่ากระแสไฟฟ้าจะลดลง เมื่อค่า conductivity ลด โดยจะเกิดขึ้นเมื่อ ampholytes เคลื่อนที่เข้าใกล้ isoelectric point ดังนั้นถ้าจะทำ IEF ควรจะใช้เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแบบ constant-current จึงจะเหมาะสม

มีการทำ electrophoresis อีกแบบหนึ่งเรียกว่า pulsed-field techniques คือการ run electrophoresis โดยใช้เครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้าที่สามารถสลับทิศทางของการเคลื่อนที่โดยการเปลี่ยนทิศทางของสนามไฟฟ้า (เปลี่ยนคู่ของ electrode) ดังนั้นในแต่ละรอบโมเลกุลของสารต้องปรับตัวใหม่ให้เข้ากับทิศทางของสนามไฟฟ้าพร้อมๆ ไปกับการเคลื่อนที่ตามรูของเจลด้วย ทำให้เทคนิคนี้สามารถใช้แยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ๆ ออกจากกันได้ พวกที่ไม่สามารถใช้ agarose หรือ polyacrylamide ธรรมดาแยกได้

3) บัฟเฟอร์ (buffers)

หน้าที่ของบัฟเฟอร์ในการทำ electrophoresis คือ (1) มีความสามารถในการนำกระแสไฟฟ้า (2) ช่วยรักษา pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับ electrophoresis (3) เป็นตัวกำหนดค่าความเป็นประจุของโมเลกุลที่ต้องแยก นอกจากนี้ค่าความแรงของไอออน (ionic strength) ของบัฟเฟอร์จะเป็นตัวกำหนดความมาก-น้อยของไอออนรอบๆ โมเลกุล ความเร็วในการเคลื่อนที่ และความคมชัดของ band ที่แยกของโมเลกุลที่ต้องการแยก เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของไอออนเพิ่มขึ้น จะทำให้โมเลกุลที่ต้องการแยกเคลื่อนที่ช้าลง ผลก็คือจะได้ band ที่มีความคมชัดขึ้น แต่ผลเสียคือจะทำให้เกิดความร้อนมากขึ้น เนื่องจากค่ากระแสไฟฟ้าที่สูงนั่นเอง ซึ่งอาจจะทำให้โปรตีนเสียสภาพได้ ถึงแม้ว่าจะมีบัฟเฟอร์มากมายหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้คือ barbital buffer และ tris-boric-EDTA buffer ที่ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอ มักจะต้องมี EDTA ที่นิยม

ใช้ได้แก่ tris-acetate, tris-borate หรือ tris-phosphate ที่ความเข้มข้นประมาณ 50 มิลลิโมลต่อลิตร และช่วง pH 7.5-7.8

4) สีย้อม (stains)

สีย้อมที่ช่วยทำให้เห็นและทราบตำแหน่งของโปรตีน และกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ที่แยกได้ การติดสีนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่นชนิดของโปรตีนและการเสียสภาพเนื่องจาก fixing agent สีย้อมบางชนิดไม่เหมาะที่จะใช้กับ polyacrylamide gel isoelectric focusing (PAGE-IEF) เนื่องจาก จะไปทำปฏิกิริยากับ ampholyte แต่พบว่า coomassie brilliant blue (CBB) สามารถที่จะใช้ได้กับ PAGE-IEFสี silver nitrate และ silver diamine สามารถใช้ย้อมโปรตีน และ polypeptide ด้วยความไวที่สูงกว่าสีย้อมชนิดอื่นๆ ถึง 100 เท่า ethidium bromide เป็นสีที่ใช้มากที่สุดสำหรับกรดนิวคลีอิก

7.2 ชนิดของ electrophoresis

1) Zone electrophoresis คือเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนออกเป็นโซน โดยแต่ละโซนอาจมีโปรตีนมากกว่า 1 ชนิด แต่ถูกแยกโดยคุณสมบัติทางกายภาพให้อยู่ใน band เดียวกัน โดย electrophoresis ชนิดนี้ยังสามารถแบ่งย่อยได้อีก ตามชนิดของ supporting media ที่ใช้ เช่น

- Agarose gel electrophoresis (AGE) ใช้ในการตรวจหา serum protein, nucleic acid, hemoglobin variants, lactate dehydrogenase, creatine kinase isoenzyme, lipoprotein fraction และสารอื่นๆ อย่างประสบความสำเร็จ

- Cellulose acetate electrophoresis (CAE) ข้อดีของ CAE คือใช้เวลาในการทำ electrophoresis สั้น (20 นาที - 1 ชั่วโมง) และแผ่นเมมเบรนใสซึ่งได้จากการทำ CAE สามารถเก็บไว้ได้นาน

- Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) เป็นการทำ electrophoresis ในเจลที่เตรียมโดยใช้แผ่นแก้ว 2 แผ่นประกบกัน เจลชนิดนี้สามารถแยกซีรั่มออกได้ถึง 20 ชิ้นส่วน การทำ electrophoresis ประเภทนี้บ่อยครั้งจะมีการเติมสาร detergent ที่มีชื่อว่า sodium dodecyl sulfate (SDS) ลงไป ซึ่งว่า SDS-PAGE โดย SDS จะเข้าไปบดบังประจุเดิมที่มีอยู่บนโปรตีนทำให้การแยกแบบนี้เป็นการแยกโปรตีนตามขนาดเท่านั้น ไม่ขึ้นอยู่กับประจุ

2) Isoelectric Focusing (IEF) electrophoresis เป็นการแยกสารที่มีประจุ เช่น โปรตีนในตัวกลางที่มี pH gradient โปรตีนจะเคลื่อนที่ในตัวกลางจนถึงบริเวณค่า pH ในตัวกลางมีค่าเท่ากับค่าค่า pI ของโปรตีน

การสร้าง pH gradient ในตัวกลางอาศัย amphoteric polyaminocarboxylic acid กลุ่มสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 300 – 1,000 และมีค่า pI ที่แตกต่างกันออกไปเมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปสารเหล่านี้ทำให้เกิด "stable pH gradient"

3) Two-dimensional Electrophoresis (2D Electrophoresis) เป็นการทำ electrophoresis แบบสองทิศทาง คือการทำ IEF electrophoresis ก่อนแล้วตามด้วยการแยกตามขนาดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE การ run ในทิศทางแรกจะใช้ตัวกลางที่มีรูขนาดใหญ่ เช่น agarose gel หรือ polyacrylamine gel ที่มีรูขนาดใหญ่ โดยจะมีการเติม ampholytes ลงไปเพื่อทำให้เกิด pH gradient และการ run ในทิศทางที่สองจะใช้ polyacrylamide gel การทำ electrophoresis แบบนี้ มีประสิทธิภาพมากในการแยกโปรตีนต่างๆ ออกจากกัน

การทำ 2D Electrophoresis ตามวิธีของ O'Farrell จะ run ทิศทางแรกจะใช้ PAGE-IEF โดยใช้ pH 3-10 จากนั้นตัวเจลจะถูกค้นออกมา แล้วนำไป run ในแผ่นเจล ของ polyacrylamide ที่มี SDS เป็นส่วนประกอบอยู่ โปรตีนที่แยกได้จะย้อมด้วย coomassie blue หรือ silver stain วัดสารรังสีที่ติดสลากบนโปรตีนก็ได้ หรือใช้หลักการของสารเรืองแสงก็ได้ การใช้สารรังสีมีความไวกว่าการใช้ coomassie dyes 100 – 1,000 เท่า

ประโยชน์ของ 2D electrophoresis มีทั้งในแง่ลักษณะและการเตรียม ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการแยกส่วนประกอบโปรตีนออกจาก complex protein mixture ปัจจุบันใช้คำว่า "Proteome" หมายถึงการศึกษาการทำงานของยีนทั้งหมดในระดับของโปรตีน โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนต่างๆ หลายชนิดในเวลาเดียวกัน โดยเทคนิค 2D electrophoresis นี้มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาการทำงานของยีนทั้งหมดในระดับของโปรตีน

8. การวิเคราะห์ข้อมูล

8.1 ความถี่ของยีน (gene frequency)

ความถี่ยีน หมายถึง อัตราส่วนของจำนวนยีนหรือแอลลีลใดแอลลีลหนึ่งต่อจำนวนยีนหรือแอลลีลทั้งหมดใน locus หนึ่งบนโครโมโซมของประชากรหนึ่ง

- โลคัส (locus) หมายถึง ตำแหน่งของยีนหนึ่งบนโครโมโซม

- ประชากร (population) หมายถึง จำนวนสิ่งมีชีวิตทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ในพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่ง ในสภาพภูมิประเทศหนึ่ง

การศึกษาความถี่ของประชากรมีวิธีวัดได้ 3 วิธีคือ 1) ความถี่ของฟีโนไทป์ 2) ความถี่ของจีโนไทป์ 3) ความถี่ของยีนหรือแอลลีล ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังนี้

- ความถี่ของฟีโนไทป์ = $\frac{\text{จำนวนประชากรที่แสดงลักษณะนั้น}}{\text{จำนวนประชากรทั้งหมด}}$

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

- ความถี่ของยีน A หรือ a = $\frac{\text{จำนวนแอลลีล A หรือ a}}{\text{จำนวนแอลลีลทั้งหมด}}$

8.2 การวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium)

กฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (the Hardy-Weinberg principle) กล่าวว่า "ถ้าประชากรมีขนาดใหญ่มากและการผสมพันธุ์ในประชากรนั้นเป็นไป โดยไม่มีการเจาะจงคู่ หรือเป็นไปโดยวิธีสุ่ม (โดยไม่มีปัจจัยสำคัญภายนอกในการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีน สัดส่วนของแอลลีลจะเป็นตัว กำหนดสัดส่วนของจีโนไทป์ และสัดส่วนจีโนไทป์จะคงที่ ไม่ว่าจะถ่ายทอดไปกี่รุ่นก็ตาม" ซึ่งปัจจัยที่มีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงกฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก ได้แก่

1) การคัดเลือก (selection) หมายถึง การคัดเลือกไว้ทำพันธุ์ โดยสิ่งมีชีวิตที่ถูกคัดเลือกจะมีโอกาสสืบพันธุ์มากกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น การคัดเลือกถือว่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนในประชากรมากที่สุด มีผลต่อสัดส่วนของยีน และความถี่ของจีโนไทป์ในประชากร ทำให้ค่าเฉลี่ยของลักษณะที่คัดเลือกมีการเปลี่ยนแปลง

2) การอพยพ (migration) มีผลให้เกิดการกระจายของยีนไปยังพื้นที่ใหม่ๆ ทำให้ยีนเก่ามีการเปลี่ยนแปลงที่ลดลง และสัดส่วนยีนใหม่ในประชากรเพิ่มขึ้น ในที่สุดยีนเหล่านี้จะเข้าสู่สมดุล

3) การกลายพันธุ์ (mutation) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสภายในยีนจากแอลลีลหนึ่งไปเป็นแอลลีลหนึ่ง และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้

4) อิทธิพลของประชากรขนาดเล็ก (genetic drift) ประชากรที่มีขนาดเล็กเกินไป มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ยีนในประชากรเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง ทั้งนี้มีทิศทางการเปลี่ยนแปลงไม่แน่นอน โดยขึ้นกับโอกาสหรือเกิดขึ้นแบบสุ่มของขั้นตอนการจับคู่ผสมพันธุ์ หากประชากรมีขนาดเล็กก็ยิ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนในประชากร

ประชากรที่มีสัดส่วนของยีนและจีโนไทป์คงที่นี้เรียกว่า ประชากรที่สมดุล (equilibrium population)

นอกจากนี้ประชากรจะอยู่ในสมดุลของฮาร์ดีไวน์เบิร์กได้นั้นจะต้องมีเงื่อนไขดังนี้

1) ประชากรมีขนาดใหญ่

2) ไม่มีการถ่ายเทเคลื่อนย้ายยีนระหว่างกลุ่มประชากร

3) ไม่เกิดมิวเทชัน ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแอลลีลในประชากร

4) สมาชิกทุกคนมีโอกาสผสมพันธุ์ได้เท่ากัน

5) ไม่เกิดการคัดเลือกโดยธรรมชาติ โดยสิ่งมีชีวิตทุกตัวมีโอกาสอยู่รอด และประสบความสำเร็จในการสืบพันธุ์ได้เท่าๆ กัน

ความถี่ของแอลลีลและความถี่ของจีโนไทป์นำมาคิดสัดส่วน ซึ่งผลรวมของสัดส่วนของแอลลีลและจีโนไทป์ต้องมีค่าเท่ากับ 1 และเท่ากัน สามารถนำมาเขียนสมการทางคณิตศาสตร์ดังนี้

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1.0$$

กำหนดให้ p คือแอลลีล A, p^2 คือจีโนไทป์ของ AA

$2pq$ คือจีโนไทป์ของ Aa

q คือแอลลีล a, q^2 คือจีโนไทป์ของ aa

การทดสอบสมมติฐานด้วยวิธีการทางสถิตินิยมใช้ *Chi*-square หรือบริการฟรีแวร์ ซอฟต์แวร์บนอินเตอร์เน็ต เช่น SNPanalyzer หรือฟรีแวร์อื่นๆ เช่น Arlequin, PHASE, Haploview หรือซอฟฟต์แวร์เชิงพาณิช เช่น SNPAlyze ซึ่งอาจใช้รุ่นทดลองในการวิเคราะห์ได้

8.3 ความไม่สมดุลจากการเชื่ยมโยงยีน (linkage disequilibrium)

ความไม่สมดุลจากการเชื่ยมโยงยีน คือ ค่าที่ใช้สำหรับการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ซึ่งสามารถใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างแอลลีลในประชากร ปัจจุบันได้มีการมุ่งเน้นการศึกษาเพื่ออำนวยความสะดวกในการทำแผนที่ยีนของโรคที่ซับซ้อนได้ พารามิเตอร์ที่ใช้กันทั่วไปของการวิเคราะห์การเชื่อมโยงยีน เช่น

- D' ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์ของ Lewontin การวัดจะขึ้นอยู่กับค่าความถี่ของข้อมูล และแสดงค่าอยู่ในช่วง -1 ถึง +1 หากประชากรในการศึกษามีขนาดเล็กไม่ควรใช้ค่า D'

- r^2 เป็นความสัมพันธ์ของแอลลีลทั้งสองตำแหน่ง ค่าจะอยู่ในช่วง -1 ถึง +1 ซึ่งค่านี้จะมีความไวต่อความถี่ของแอลลีล

- Akaike's information criterion (AIC) ใช้เป็นค่าที่ดีในการเปรียบเทียบกับ nonhierarchical model ซึ่งค่า AIC จะแสดงรูปแบบที่เหมือนกันกับค่า r^2เป็นวิธีทางเลือกที่ใช้ใน

การประเมินความไม่สมดุลจากการเชื่อมโยงยีน ค่า AIC ที่สูงแสดงถึงความเชื่อมโยงกันมากที่สุด

ทั้งหมดเป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณค่าความสัมพันธ์ โดยทั้งฟรีซอฟต์แวร์ และซอฟต์แวร์เชิงพาณิชย์ ที่อธิบายก่อนหน้านี้

9. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดที่คลอดปกติที่โรงพยาบาลสงขลา

10. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การตรวจหาความผิดปกติทางพันธุกรรมของ *UGT1A1* ในทารกแรกเกิด ทำให้ทราบความถี่ของการเกิดการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดที่คลอดปกติในโรงพยาบาลสงขลา เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับประชากรในเขตอำเภอเมือง จ.สงขลา ที่อาศัยอยู่โดยรอบของโรงพยาบาลสงขลา หากมีความถี่ในการเกิดสูงและการกลายพันธุ์นั้นทำให้การทำงานของเอนไซม์ UGT1A1 ลดลง จะทำให้แพทย์หันมาสนใจ และให้ความสำคัญในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ก่อนการรักษาด้วยยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ชนิดนี้ เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาได้

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และวิธีการศึกษา

1. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

- หลอดเก็บเลือด รุ่น Vacuum Venous Blood Specimen Collection Tube จากบริษัท Beijing Sekisui Trank Medical Technology ประเทศจีน

- หลอดหยด (pasture pipette) จากบริษัท Paul Marienfeld GmbH & Co. KG ประเทศเยอรมันนี

- Pipette tips ขนาด 0.1-10 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร จากบริษัท LABCON North America ประเทศสหรัฐอเมริกา และขนาด 20-200 ไมโครลิตร จากบริษัท Pacific Science ประเทศไทย

- ไมโครปิเปต (microliter pipette) รุ่น Pipetman ขนาด P2, P20, P200 และ P1000 จากบริษัท Gilson S.A.S. ประเทศฝรั่งเศส

- ถุงมือ รุ่น Sempermed® จากบริษัทสยาม เซมเพอร์เมด จำกัด ประเทศไทย

- Illustra™ blood genomicPrep Mini Kit (250 ชุด) จากบริษัท GE Healthcare UK Limited ประเทศสหราชอาณาจักร ประกอบด้วย

  - Proteinase K, lyophilized powder 2 ขวด (2x30 มิลลิกรัม)
  - Lysis solution 250 มิลลิลิตร
  - Wash buffer 30 มิลลิลิตร (ก่อนนำไปใช้เติม absolute ethanol 120 มิลลิลิตร)
  - Elution buffer 60 มิลลิลิตร
  - Mini columns 250 ชิ้น
  - Collection tubes 250 ชิ้น

- Microcentrifuge tubes ขนาด 1.7 มิลลิลิตร จากบริษัท LABCON North America ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR และ gel electrophoresis

- Microliter pipette
- Pipette tips
- ถุงมือ
- Eppendorf tube รุ่น Thermowell® Gold PCR ชนิดฝาโดม ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากบริษัท Corning Incorporated Life Sciences
- *i-Taq*™ DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 500 ยูนิต, 10x $MgCl_2$ free PCR buffer, dNTPs (2.5 mM each) และ 25 mM $MgCl_2$ จากบริษัท iNtRON Biotechnology ประเทศเกาหลี
- Primers (forward และ reverse primers) จากบริษัท BioDesign ประเทศไทย
- Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) disodium salt dihydrate ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2{\cdot}2H_2O$, MW= 372.24), Tris ($C_4H_{11}NO_3$, MW= 121.14) และ ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากบริษัท AMRESCO Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Glacial acetic acid (CH_3COOH, MW= 60.05) จากบริษัท Guangdong Guanghua Chemical Factory ประเทศจีน
- Ethyl alcohol absolute (C_2H_6O, MW= 46.07) จากบริษัท VWR International S.A.S.ประเทศฝรั่งเศส
- ผงเจล agarose (Lot number: W59727) จากบริษัท Research Organics ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 100 bp+1.5 kbp DNA marker จากบริษัท SibEnzyme ประเทศรัสเซีย

1.3 เครื่องมืออื่นๆ

- เครื่องเขย่า (vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie® 2 จากบริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น GMC-260 จากบริษัท Daihan Labtech ประเทศเกาหลี
- เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น WiseSpin® CF-10 จากบริษัท Daihan Scientific ประเทศเกาหลี
- เครื่อง MyCycler ™ Thermal Cycler จากบริษัท Bio–Rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ชุด Mini-Sub® Cell GE และเครื่อง PowerPac™ Basic จากบริษัท Bio-Rad Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น BioMate 3 จากบริษัท Thermo Electron ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Gel Documentation
- ตู้อบแห้ง (hot air oven) จากบริษัท Heraeus GmbH ประเทศเยอรมันนี
- หม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) จากบริษัท Tomy Seiko ประเทศญี่ปุ่น
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2. วิธีการศึกษา

2.1 อาสาสมัคร

วิธีการศึกษาในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการพิจารณาอนุญาตและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ภาคผนวก ก)

ในการศึกษานี้ใช้อาสาสมัครชาวไทยที่เป็นทารกแรกเกิดจากหญิงตั้งครรภ์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณจังหวัดสงขลา และมาคลอดที่โรงพยาบาลสงขลา โดยก่อนการเก็บตัวอย่างหญิงตั้งครรภ์ที่มาคลอดบุตรที่โรงพยาบาลสงขลาทุกคน จะได้รับข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษา วิธีการศึกษา ประโยชน์ที่จะได้รับ และเซ็นต์ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ จากนั้นทำการสอบถามและเก็บข้อมูลโดยแบบสอบถามมีคำถามเกี่ยวกับทารก มารดา บิดา และบรรพบุรุษ ในส่วนของทารกจะมีคำถามเกี่ยวกับ เพศ น้ำหนักแรกคลอด วิธีการคลอด และแบบติดตามอาการหลังคลอด เช่น อาการเหลืองหลังคลอด (jaundice afterbirth) ผลการตรวจระดับบิลิรูบิน อาการ kernicterus การรักษาทารกที่มีอาการตัวเหลือง และประวัติอาการเหลืองของบุตรคนอื่นๆ ในส่วนของข้อมูลมารดามีคำถามเกี่ยวกับ อายุ ภูมิลำเนา เชื้อชาติ ศาสนา กรุ๊ปเลือด ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง การดื่มแอลกอฮอล์ ประวัติการเป็นโรค ข้อมูลการคลอด ประเภทของการคลอด และประวัติเชื้อชาติของบรรพบุรุษ ในส่วนของข้อมูลบิดามีคำถามเกี่ยวกับ อายุ ภูมิลำเนา เชื้อชาติ ศาสนา การดื่มแอลกอฮอล์ ประวัติการเป็นโรค และประวัติเชื้อชาติของบรรพบุรุษ (ภาคผนวก ข)

2.2 การคำนวณขนาดตัวอย่างประชากร

การศึกษาเภสัชพันธุศาสตร์ของ *UGT1A1* ของคนไทยที่อาศัยอยู่ในบริเวณจังหวัดสงขลา ภาคใต้ของไทย เนื่องจากไม่มีข้อมูลที่รายงานความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ในคนไทยที่อาศัยทางภาคใต้ ดังนั้นจึงใช้ข้อมูลจากการศึกษาความถี่ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ของประชากรไทยที่มีถิ่นฐานจากภาคใต้ (Udomuksorn, 2006) เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคำนวนขนาดตัวอย่างประชากร โดยได้มีการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน

UGT1A1 ที่ตำแหน่ง 211G>A และ $(TA)_7TAA$ ในจำนวนประชากรที่มีถิ่นฐานจากภาคใต้จำนวน 32 คน พบว่าพบ 211G>A จำนวน 2 คนและ $A(TA)_7TAA$ จำนวน 8 คน (ตารางที่ 3-1 แสดงความถี่การกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* จากประชากรไทยทั้งหมด 129 คน)

ตารางที่ 3-1 การศึกษาความถี่การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ในประชากรของไทย (Udomuksorn, 2006)

Polymorphism	Nucleotide change	Exon	Allele frequency		Number of subject
			Minor	Major	
*UGT1A1*6*	G211A (Gly71Arg)	1	0.070	0.930	15/129 (11.62%)
*UGT1A1*28*	$A(TA)_7TAA$	Promoter	0.167	0.833	37/129 (28.68%)

ขนาดของตัวอย่าง (sample size: n) คำนวณโดยใช้สูตรดังนี้ (Padmanaban, 2002)

$$n \text{ (แต่ละกลุ่ม)} = \frac{(p_0q_0 + p_1q_1)(Z_{1-a/2} + Z_{1-b})^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

เมื่อ p_1 คือสัดส่วนของจีโนไทป์ที่เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม = $(p_0)(RR)$

p_0 คือสัดส่วนของจีโนไทป์ที่ไม่เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม

$q_0 = 1 - p_0$

$q_1 = 1 - p_1$

$Z_{1-a/2}$ คือค่าการกระจายปกติมาตรฐานที่สอดคล้องกับค่าแอลฟ่า (alpha: α) สำหรับทดสอบ 2 ด้านของเส้นโค้งมาตรฐานที่ระดับ $\alpha = 0.05$ เท่ากับ 1.96

$Z_{1-\beta}$ คือค่าการกระจายปกติมาตรฐานที่สอดคล้องกับระดับ power of the test: power of 80% เท่ากับ 0.84

1.) ขนาดตัวอย่างของ *UGT1A1*6* พิจารณาจากสูตรได้ดังนี้

แทนค่า $p_0 = 11.62\%$, RR = 1.5, $p_1 = (p_0)(RR) = (0.1162)(1.5) = 0.1743$ --- $p_1 = 0.1743$

$p_0 = 0.1162$ $q_0 = 1 - p_0 = 1-(0.1162) = 0.8838$ --- $q_0 = 0.8838$

$p_1 = 0.1743$ $q_1 = 1 - p_1 = 1-(0.1743) = 0.8257$ --- $q_1 = 0.8257$

$\alpha = 0.05$, $Z_{0.025} = 1.96$

Power of 80% = 0.84

$$n = \frac{[(0.1162)(0.8838)+(0.1743)(0.8257)](1.96+0.84)^2}{(0.1743 - 0.1162)^2}$$

$$= \frac{(0.2466)(7.84)}{(0.003376)}$$

$$= 572.67$$

$$= \mathbf{573} \text{ คน (ประมาณ)}$$

2.) ขนาดตัวอย่างของ *UGT1A1*28* พิจารณาจากสูตรได้ดังนี้

แทนค่า p_0 = 28.68%, RR = 1.5, $p_1 = (p_0)(RR) = (0.2868)(1.5) = 0.4302$ --- $p_1 = 0.4302$

$p_0 = 0.2868$ $q_0 = 1 - p_0 = 1-(0.2868) = 0.7132$ --- $q_0 = 0.7132$

$p_1 = 0.4302$ $q_1 = 1 - p_1 = 1-(0.4302) = 0.5698$ --- $q_1 = 0.5698$

$\alpha = 0.05$, $Z_{0.025} = 1.96$

Power of 80% = 0.84

$$n = \frac{[(0.2868)(0.7132)+(0.4302)(0.5698)](1.96+0.84)^2}{(0.4302 - 0.2868)^2}$$

$$= \frac{(0.44967372)(7.84)}{(0.02056)}$$

$$= 171.47$$

$$= \mathbf{172} \text{ คน (ประมาณ)}$$

การคำนวณขนาดตัวอย่างการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* แบบ *UGT1A1*6* และ *UGT1A1*28* ได้เท่ากับ 573 และ 172 คน ตามลำดับ ซึ่งจะใช้ในการตรวจสอบเภสัชพันธุศาสตร์ของความถี่ความผิดปกติของยีน *UGT1A1* ในประชากรภาคใต้ของไทย จังหวัดสงขลา ดังนั้นจำนวนตัวอย่างประชากรที่ใช้ในการศึกษาการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* จะใช้จำนวนตัวอย่างอย่างน้อย 180 คน ในการศึกษานี้ได้เก็บตัวอย่างเลือดจากสายสะดือทารกจำนวน 500 ตัวอย่าง และได้สุ่มเลือกด้วยวิธีการจับสลากมาศึกษาจำนวน 189 ตัวอย่าง

2.3 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บเลือดจากสายสะดือทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสาร EDTA เขย่าเบาๆ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ตัวอย่างแยกชั้นอย่างสมบูรณ์ ใช้ pasture pipette ที่ปราศจากเชื้อเก็บส่วนของชั้นพลาสมาและ buffy coat (แยกตัวอย่างทั้งสองชนิด) ลงใน microcentrifuge tubes ขนาด 1.7 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป

2.4 การสกัดดีเอ็นเอ

ขั้นตอนของการสกัด genomic DNA ของตัวอย่าง ใช้ชุด Illustra™ blood genomicPrep Mini Kit ในการสกัด โดยใช้ส่วนของ buffy coat ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

1. เติมเอนไซม์ proteinase K 20 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.7 ไมโครลิตร นำไป spin down เพื่อให้เอนไซม์ตกลงก้นหลอด

2. เติมตัวอย่าง buffy 300 ไมโครลิตร นำตัวอย่างไปเขย่า เพื่อให้ตัวอย่างกับเอนไซม์ผสมกัน

3. เติม lysis buffer 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่านาน 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที (เขย่าตัวอย่างทุกๆ 2 นาที โดยสีของตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม) spin down ตัวอย่างเพื่อตกตะกอน

4. ดูดตัวอย่างจาก microcentrifuge tube ลง column ของชุดสกัด

5. ปิดฝา column จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที

6. เทสารจาก collection tube ทิ้ง แล้วนำกลับมาสวมกับ column อีกครั้ง

7. เติม lysis buffer 500 ไมโครลิตร ลงใน column จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที เทสารจาก collection tube ทิ้ง แล้วนำกลับมาสวมกับ column อีกครั้ง

8. เติม wash buffer 500 ไมโครลิตร ลงใน column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลานาน 3 นาที หมุนเหวี่ยงซ้ำ ที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที จะได้ purification column

9. นำ purification column มาสวมกับ microcentrifuge tube ขนาด 1.7 มิลลิลิตร

10. เติม elution buffer 200 ไมโครลิตร ลงใน column และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลานาน 1 นาที (ก่อนนำ elution buffer มาใช้ต้องนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 70°C)

11. นำตัวอย่าง genomic DNA จำนวน 1 ไมโครลิตร เติมน้ำ 99 ไมโครลิตร (1:100) แล้ววัดความเข้มข้นของตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

12. เก็บ purified genomic DNA ของตัวอย่างที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำไปทำ PCR ต่อไป

2.5 การตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *UGT1A1* (genotyping of *UGT1A1* in genomic DNA)

1.) การออกแบบไพรเมอร์

- ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Vecter NTI เวอร์ชัน 6.0

- ใช้ *UGT1A* gene locus (AF297093) จาก NCBI nucleotide sequence คัดลอกลงในโปรแกรม Vecter NTI และสร้าง UGT1A locus โดยตำแหน่งของ *UGT1A1* เริ่มจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 174990-187313

- สร้างไพรเมอร์สำหรับสายนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ตำแหน่ง -300 ถึง +800 (ขนาด 1,100 bp) ครอบคลุมในส่วนบริเวณโปรโมเตอร์ตำแหน่ง TATA box และเอกซอน 1

- ใช้โปรแกรม Nucleotide Blast จากเว็บไซต์ NCBI เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมามีความจำเพาะต่อ *UGT1A1* (ที่มา: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

ตารางที่ 3-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ของยีน *UGT1A1* ที่เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งตำแหน่งของ TATA box และบริเวณที่มีการแปลรหัสในส่วนของเอกซอน 1 (Udomuksorn, 2006)

Amplification region	Primers
-300 bp ถึง +800 bp (ขนาด 1,100 bp) [ครอบคลุมในตำแหน่ง TATA box และเอกซอน 1]	**Forward** 5'-TCACTACATAGTCGTCCTTCTTCCT-3' **Reverse** 5'-GGCCTAGGGTAATCCTTCACAAAGT-3'

การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* บนตำแหน่ง TATA box และเอกซอน 1 (*UGT1A1*6*, *UGT1A1*28*) ถูกวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค DNA sequencing ในการตรวจหาความผิดปกติของจีโนไทป์ของยีน *UGT1A1* จะใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อยีน (ทั้ง forward และ reverse primers ตารางที่ 3-2) ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการโดยการทำ PCR amplification

2.6 PCR amplification

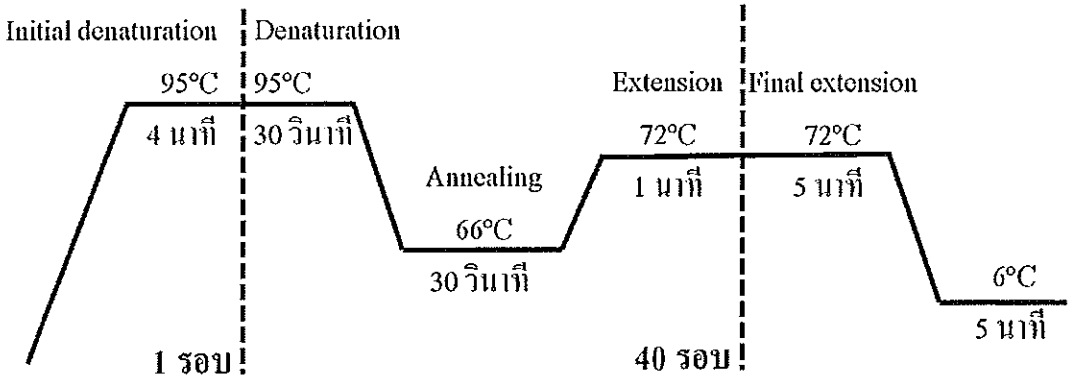
การ setup reaction เตรียม reaction เป็นแบบ reaction mixture ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำกลั่น (sterile distilled water), Taq buffer ($MgCl_2$ free), $MgCl_2$ 25 mM, dNTPs mixture, forward และ reverse primer และ *Taq* polymerase (5 ยูนิตต่อ

ไมโครลิตร) ดูด reaction mixture มา 19 ไมโครลิตร เตรียมไว้ใน microcentrifuge tube ที่ใช้สำหรับ PCR ดูด genomic DNA ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (ทุกขั้นตอนในการเตรียม reaction จะต้อง on ice เสมอ) (ตารางที่ 3-3)

จากนั้นนำไป amplified โดยใช้เครื่อง MyCycler ™ Thermal Cycler ซึ่งใน PCR cycle ประกอบด้วยขั้นตอน initial denaturation ตั้งที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 4 นาที 1 รอบ ขั้นตอน denaturation ตั้งอุณหภูมิ 95°C เวลา 30 วินาที ขั้นตอน annealing อุณหภูมิ 66°C เวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension อุณหภูมิ 72°C เวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และในขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 5 นาที และ 6°C เวลา 5 นาที [ดัดแปลงจาก Udomuksorn, 2006 (thesis)] จากนั้นเก็บ PCR product ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (รูปที่ 3-1)

ตารางที่ 3-3 Reaction mixture สำหรับการทำ PCR (Udomuksorn, 2006)

Reaction mixture	ปริมาตร (20 µl)
Genomic DNA template	1 µl
Primer mixture (forward และ reverse primers)	2 µl
Taq buffer ($MgCl_2$ free)	2 µl
$MgCl_2$ 25 mM	1.4 µl
dNTPs mixture (2.5 mM each)	0.5 µl
i-Taq DNA polymerase (5U/µl)	0.5 µl
Sterile distilled water	12.6 µl



รูปที่ 3-1 PCR cycle ของการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR

2.7 Gel electrophoresis

ทำการตรวจเช็คขนาดดีเอ็นเอที่ได้ โดยวิธี 1% agarose gel electrophoresis โดยใช้ PCR product จำนวน 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer dye จำนวน 2 ไมโครลิตร และใช้ 100 bp + 1.5 kbp marker เป็น marker นำไปตัวอย่าง load ลงใน 1% agarose gel ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ ใช้เวลาในการ run ตัวอย่าง 30 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมใน ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel Documentation (Gel Doc)

2.8 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี DNA sequencing

การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *UGT1A1* ทำโดยส่งตัวอย่างชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR (เจือจาง 1:3 หรือ 1:5) และไพรเมอร์ไปที่บริษัทไบโอ-ดีไซน์ จำกัด ซึ่งให้บริการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ หลังจากได้รับผลการตรวจแล้วจึงทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานจาก Genbank (accession number: AF297093)

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

1) Genotyping data analysis นำข้อมูลของการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์

- สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium)
- ความไม่สมดุลของการเชื่อมโยงยีน (linkage disequilibrium)

โดยใช้โปรแกรม SNPAlyze version 7.0 (trial version) บริษัท DYNACOM Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น (ที่มา http://www.dynacom.co.jp/english/)

2) การวิเคราะห์ข้อมูลจากแบบสอบถาม

ข้อมูลจากแบบสอบถามนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ยีน *UGT1A1* และอาการตัวเหลืองของทารกแรกเกิด โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนจากจำนวนประชากรทั้งหมดในแต่ละกลุ่ม

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ผู้เข้าร่วมโครงการที่มาคลอดที่โรงพยาบาลสงขลา จังหวัดสงขลา เป็นคนไทยเชื้อชาติไทย โดยมาคลอดในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2552 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 ซึ่งได้ทำการเก็บข้อมูลโดยใช้แบบสอบถาม มีข้อมูลดังนี้

1. ข้อมูลทั่วไป (demographic data)

- ข้อมูลทารกแรกเกิด ทารกที่เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 189 คน มีอายุครรภ์เฉลี่ย 39.8 ± 0.9 สัปดาห์ (32-41 สัปดาห์) ซึ่งเป็นทารกที่คลอดโดยวิธีธรรมชาติ เป็นทารกเพศชาย 100 คน (52.91%) หญิง 89 คน (47.09%) น้ำหนักแรกเกิดของทารกเฉลี่ย 3,089.4 ± 424.5 กรัม (1,640-4,470 กรัม) (ตารางที่ 4-1)
- ข้อมูลของบิดา อายุเฉลี่ย 29.2 ± 7.4 ปี (16-58 ปี) นับถือศาสนาพุทธ 127 คน และอิสลาม 62 คน ภูมิลำเนาเกิด ภาคใต้ 94.18% (ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช นราธิวาส ปัตตานี พัทลุง ภูเก็ต ยะลา สงขลา สตูล) ภาคกลาง 2.12% (กรุงเทพมหานคร พระนครศรีอยุธยา) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3.70% (ขอนแก่น นครพนม นครราชสีมา ยโสธร สกลนคร หนองคาย อุดรธานี)
- ข้อมูลของมารดา อายุเฉลี่ย 25.9 ± 6.1 ปี (16-42 ปี) นับถือศาสนาพุทธ 119 คน และอิสลาม 70 คน ภูมิลำเนาเกิดของมารดา ภาคใต้ 92.59% (กระบี่ ตรัง นครศรีธรรมราช นราธิวาส ปัตตานี พังงา พัทลุง ยะลา สงขลา สตูล) ภาคกลาง 4.23% (กรุงเทพมหานคร นครนายก นครสวรรค์ สมุทรสาคร สระบุรี) ภาคเหนือ 0.53% (ลำปาง) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2.12% (นครพนม นครราชสีมา ร้อยเอ็ด อุบลราชธานี) ภาคตะวันตก 0.53% (ราชบุรี)
- ข้อมูลของบิดา-มารดา นับถือศาสนา ศาสนาพุทธ 115 คู่ (60.85%) ศาสนาอิสลาม 58 คู่ (30.69%) และศาสนาพุทธ-อิสลาม 16 คู่ (8.46%)

2. ข้อมูลทางพันธุกรรมกับเพศ ศาสนา และอาการเหลืองหลังคลอด (jaundice afterbirth)

- เพศ ทารกเพศชาย พบการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง -64G>C, $(TA)_7$TAA, 211G>A และ 686C>A คิดเป็น 3, 38, 11 และ 1% ของเพศชายทั้งหมด (n = 100 คน) ตามลำดับ ทารกเพศหญิง พบการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง -64G>C, $(TA)_7$TAA, 211G>A และ 686C>A คิดเป็น 6.74, 32.58, 11.24 และ 3.37% ของเพศหญิงทั้งหมด (n = 89 คน) ตามลำดับ (ตารางที่ 4-2)

- ศาสนา พุทธ พบการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง -64G>C, $(TA)_7$TAA, 211G>A และ 686C>A เป็น 4.35, 35.65, 7.83 และ 1.74% ของประชากรที่นับถือศาสนาพุทธทั้งหมด (n = 115) ตามลำดับ อิสลาม พบการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง -64G>C, $(TA)_7$TAA, 211G>A และ 686C>A เป็น 10.34, 34.48, 18.97, 3.45% ของประชากรที่นับถือศาสนาอิสลามทั้งหมด (n = 58) ตามลำดับ พุทธ-อิสลาม พบการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง -64G>C, $(TA)_7$TAA และ 211G>A เป็น 6.25, 37.5 และ 6.25% ของประชากรที่นับถือศาสนาพุทธและอิสลามทั้งหมด (n = 16) ตามลำดับ (ตารางที่ 4-3)

- อาการตัวเหลืองหลังคลอด การกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* พบว่ามีความสัมพันธ์กับอาการเหลืองหลังคลอดของเด็กทารก โดยทารกที่มีการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* บริเวณโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง -64G>C และ $(TA)_7$TAA พบอาการตัวเหลืองคิดเป็น 78% (7/9) และ 55% (37/67) ของทารกที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่ตำแหน่งนั้นๆ ตามลำดับ และบริเวณที่มีการแปลรหัสบนเอกซอน 1ที่ตำแหน่ง 211G>A และ 686C>A พบอาการเหลืองคิดเป็น 67% (14/21) และ 25% (1/4) ของทารกที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่ตำแหน่งนั้นๆ ตามลำดับ (ตารางที่ 4-4)

ตารางที่ 4-1 ข้อมูลทั่วไปของทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา (n = 189)

ข้อมูลทั่วไปทารกแรกเกิด	Normal	Jaundice
ชาย (n = 100):	44 (44.0%)	56 (56.0%)
อายุครรภ์ (mean ± S.E.)	39.7 ± 1.4 (32-40 สัปดาห์)	39.8 ± 0.9 (35-41 สัปดาห์)
น้ำหนักแรกเกิด (กรัม)	3,119.3 ± 445.8	3,118.0 ± 445.5
หญิง (n = 89):	45 (50.56%)	44 (49.44%)
อายุครรภ์ (mean± S.E.)	39.9 ± 0.7 (35-40 สัปดาห์)	39.9 ± 0.6 (35-40 สัปดาห์)
น้ำหนักแรกเกิด (กรัม)	3,063.3 ± 407.1	3,083.2 ± 375.1

% = เปอร์เซ็นต์ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในเพศนั้นๆ

ตารางที่ 4-2 ความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ของทารกแรกเกิดโรงพยาบาลสงขลา (n = 189)

เพศ	ความผิดปกติทางพันธุกรรมของ *UGT1A1*											
	-64G>C			(TA)$_7$TAA			211G>A (G71R)			686C>A (P229Q)		
	G/G	G/C	C/C	6/6	6/7	7/7	G/G	G/A	A/A	C/C	C/A	A/A
ชาย (%)	97 (97)	2 (2)	1 (1)	62 (62)	34 (34)	4 (4)	89 (89)	10 (10)	1 (1)	99 (99)	1 (1)	0
หญิง (%)	83 (93.26)	5 (5.62)	1 (1.12)	60 (67.42)	23 (25.84)	6 (6.74)	79 (88.77)	9 (10.11)	1 (1.12)	86 (96.63)	3 (3.37)	0
รวม (%)	180 (95.24)	7 (3.70)	2 (1.06)	122 (64.55)	57 (30.16)	10 (5.29)	168 (88.89)	19 (10.05)	2 (1.06)	185 (97.88)	4 (2.12)	0

% = เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดในเพศนั้นๆ

ตารางที่ 4-3 ความสัมพันธ์ระหว่างศาสนากับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ของทารกแรกเกิดโรงพยาบาลสงขลา (n = 189)

ศาสนา	ความผิดปกติทางพันธุกรรมของ *UGT1A1*											
	-64G>C			$(TA)_7TAA$			211G>A (G71R)			686C>A (P229Q)		
	G/G	G/C	C/C	6/6	6/7	7/7	G/G	G/A	A/A	C/C	C/A	A/A
พุทธ (n= 115)	110(95.67)	5(4.35)	0	74(64.35)	37(32.17)	4(3.48)	106(92.17)	7 (6.09)	2 (1.74)	113(98.26)	2(1.74)	0
อิสลาม (n= 58)	55(94.83)	1(1.72)	2(3.45)	38(65.52)	15(25.86)	5(8.62)	47(81.03)	11(18.97)	0	56(96.55)	2(3.45)	0
พุทธ-อิสลาม (n= 16)	15(93.75)	1(6.25)	0	10(62.5)	5(31.25)	1(6.25)	15(93.75)	1(6.25)	0	16(100)	0	0
รวม (n= 189)	180(95.24)	7(3.70)	2(1.06)	122(64.55)	57(30.16)	10(5.29)	168(88.89)	19(10.05)	2(1.06)	185(97.88)	4(2.12)	0

() = เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่นับถือศาสนานั้นๆ

ตารางที่ 4-4 ความสัมพันธ์ระหว่างอาการเหลืองหลังคลอดกับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ของทารกแรกเกิดโรงพยาบาลสงขลา (n = 189)

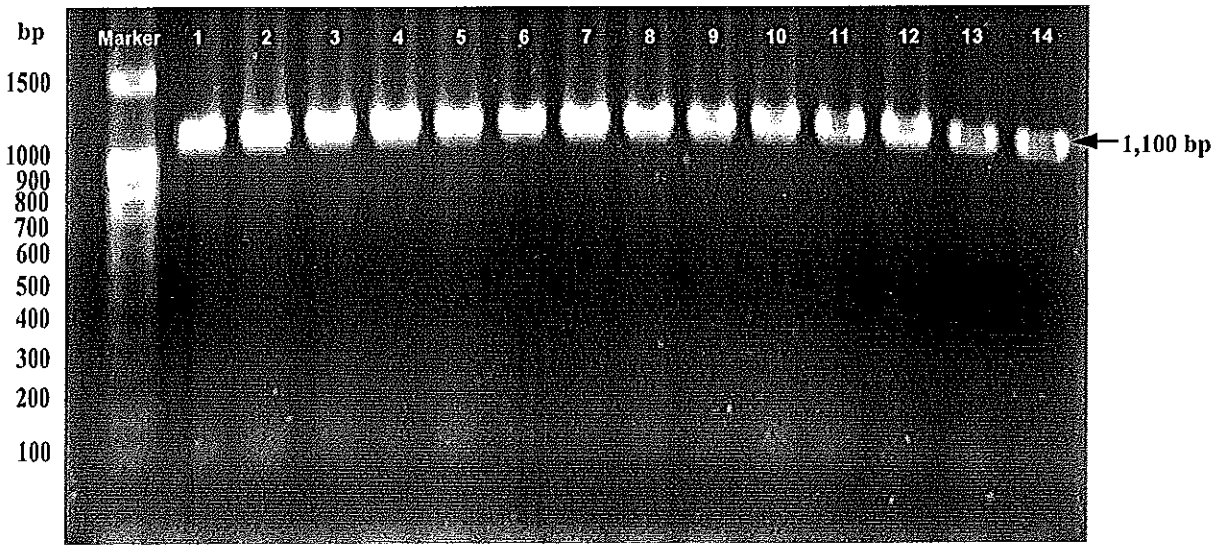
อาการเหลืองหลังคลอด	ความผิดปกติทางพันธุกรรมของ *UGT1A1*											
	-64G>C			$(TA)_7TAA$			211G>A (G71R)			686C>A (P229Q)		
	G/G	G/C	C/C	6/6	6/7	7/7	G/G	G/A	A/A	C/C	C/A	A/A
อาการเหลือง (n=100)	93	5	2	63	33	4	86	13	1	99	1	0
อาการไม่เหลือง (n=98)	87	2	0	59	24	6	82	6	1	86	3	0
รวม (%)	180(95.24)	7(3.70)	2(1.06)	122(64.55)	57(30.16)	10(5.29)	168(88.89)	19(10.05)	2(1.06)	185(97.88)	4(2.12)	0

() = เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของจำนวนตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างทั้งหมด

3. จีโนไทป์ของยีน *UGT1A1* ของทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา

ตัวอย่าง DNA ของทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลาทั้งหมด 189 ตัวอย่าง ได้ผ่านขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนโดยวิธี PCR และยืนยันขนาดชิ้นส่วนของยีนเท่ากับ 1,100 bp ที่ต้องการโดยวิธี 1% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 4-1) และส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากผลการศึกษาพบว่ามีการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* จำนวน 4 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการรายงานมาก่อนแล้ว (known mutation) โดยตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่อยู่บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter region) คือ -64G>C และ TATA box และบริเวณที่มีการแปลรหัสบนเอกซอน 1 (coding region) คือ 211G>A (G71R) และ 686C>A (P229Q) โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์จาก Genbank (AF297093) แสดงในรูปที่ 4-2



รูปที่ 4-1 1% agarose gel electrophoresis ของชิ้นดีเอ็นเอของยีน *UGT1A1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน ตั้งแต่ตำแหน่ง -300 ถึง +800 โดยมีขนาด 1,100 bp

- **Promoter region**

-64 TATA box [$(TA)_6TAA$] ←-1

attaacttggtgtatcgattggtttttgccatatatatatatataagtaggagagggcgaacctctggcaggagcaaaggcgcc

- **Coding region**

Exon 1: 864 bp (1-864)

Start codon

ATGgctgtggagtcccagggcggacgcccacttgtcctgggcctgctgctgtgtgctgggcccagtggtgtcccatgctg
ggaagatactgttgatcccagtggatggcagccactggctgagcatgcttggggccatccagcagctgcagcagagggga
catgaaatagttgtcctagcacctgacgcctcgttgtacatcagagacggagcattttacaccttgaagacgtaccctgtgcca
ttccaaagggaggatgtgaaagagtcttttgttagtctcgggcataatgtttttgagaatgattctttcctgcagcgtgtgatcaaa
acatacaagaaaataaaaaaggactctgctatgcttttgtctggctgttcccacttactgcacaacaaggagctcatggcctcc
ctggcagaaagcagctttgatgtcatgctgacggacccttccttccttgcagccccatcgtggcccagtacctgtctctgccca
ctgtattcttcttgcatgcactgccatgcagcctggaatttgaggctacccagtgccccaacccattctcctacgtgcccaggcct
ctctcctctcattcagatcacatgaccttcctgcagcgggtgaagaacatgctcattgccttttcacagaactttctgtgcgacgtg
gtttattccccgtatgcaacccttgcctcagaattccttcagagagaggtgactgtccaggacctattgagctctgcatctgtctg
gctgtttagaagtgactttgtgaaggattaccctaggcccatcatgcccaatatggtttttgttggtggaatcaactgccttcacca
aaatccactatcccag

Exon 2: 132 bp (865-996)

gaatttgaagcctacattaatgcttctggagaacatggaattgtggttttctctttgggatcaatggtctcagaaattccagagaa
gaaagctatggcaattgctgatgctttgggcaaaatccctcagaca

Exon 3: 88 bp (997-1084)

gtcctgtggcggtacactggaacccgaccatcgaatcttgcgaacaacacgatacttgttaagtggctaccccaaaacgatctgcttg

Exon 4: 220 bp (1085-1304)

gtcacccgatgacccgtgcctttatcacccatgctggttcccatggtgtttatgaaagcatatgcaatggcgttcccatggtgatg
atgcccttgtttggtgatcagatggacaatgcaaagcgcatggagactaagggagctggagtgaccctgaatgttctggaaa
tgacttctgaagatttagaaaatgctctaaaagcagtcatcaatgacaaaag

Exon 5: 298 bp (1305-1602)

ttacaaggagaacatcatgcgcctctccagccttcacaaggaccgcccggtggagccgctggacctggccgtgttctgggtg
gagtttgtgatgaggcacaagggcgcgccacacctgcgccccgcagcccacgacctcacctggtaccagtaccattccttg
gacgtgattggtttcctcttggccgtcgtgctgacagtggccttcatcacctttaaatgttgtgcttatggctaccggaaatgcttgg
ggaaaaaagggcgagttaagaaagcccacaaatccaagacccat**TGA**

Stop codon

รูปที่ 4-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UGT1A1* บนบริเวณตำแหน่งโปรโมเตอร์ และบริเวณที่มีการแปลรหัสของเอกซอน 1 ถึง 5 (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Genbank; accession number: AF297093)

3.1 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่มีการรายงานแล้ว

พบตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่บริเวณบนโปรโมเตอร์ 2 ตำแหน่ง และบริเวณที่มีการแปลรหัส 2 ตำแหน่ง คือ (รูปที่ 4-2)

Promoter region: - $(TA)_7TAA$ (*UGT1A1*28*: ตำแหน่ง TATA box)

- -64G>C (*UGT1A1*81*)

Coding region: - 211G>A (G71R) (*UGT1A1*6*: บนเอกซอน 1)

- 686C>A (P229Q) (*UGT1A1*27*: บนเอกซอน1)

จากการวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของยีน *UGT1A1* ทั้ง 4 แบบ ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา พบว่าการกลายพันธุ์ของยีนที่ตำแหน่ง $(TA)_7TAA$ และ 211G>A เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวน์เบิร์ก (ตารางที่ 4-5)

สำหรับความถี่แอลลีล (allele frequency) ของยีน *UGT1A1* ที่เกิดการกลายพันธุ์โดยเรียงจากความถี่สูงไปต่ำ ดังนี้ $(TA)_7TAA$ (0.204), 211G>A (0.061), -64G>C (0.029) และ 686C>A (0.011) (ตารางที่ 4-5)

ส่วนความถี่จีโนไทป์ (genotype frequency) ของแต่ละ variant แสดงในตารางที่ 4-6 ซึ่ง variants (homozygous และ heterozygous mutant) ของการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง $(TA)_7TAA$ (0.355) มีความถี่สูงที่สุด ถัดมาคือ 211G>A (0.111), -64G>C (0.048) และ 686C>A (0.021) ตามลำดับ

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* โดยการดูลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานของ Genbank พบการกลายพันธุ์ของยีนที่ทราบตำแหน่งมาก่อนแล้วจำนวน 4 ตำแหน่ง แสดงเป็น electropherograms ในรูปที่ 4-3 ถึง 7 ซึ่งแสดง wild-type, heterozygous และ homozygous mutant ของยีนแต่ละตำแหน่ง ส่วนที่ตำแหน่ง 686C>A ไม่พบการกลายพันธุ์แบบ homozygous mutant

จากการศึกษานี้พบการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่ง ในตัวอย่างเดียวกันคือ $(TA)_7TAA$ กับ 211G>A จำนวน 4 คน และ $(TA)_7TAA$ กับ 686C>A จำนวน 3 คน

3.2 ความไม่สมดุลจากการเชื่อมโยงยีน (linkage disequilibrium)

จากการวิเคราะห์ความไม่สมดุลจากการเชื่อมโยงยีน พบว่ามีตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่มีความเชื่อมโยงกันจำนวน 2 คู่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ คือ $(TA)_7TAA$ & 211G>A และ $(TA)_7TAA$ & 686C>A (ตารางที่ 4-7) นอกจากนี้ความเชื่อมโยงดังกล่าวยังสามารถดูได้จากค่า AIC ซึ่งพบว่าตำแหน่งการกลายพันธุ์ทั้ง 2 คู่ มีค่า AIC = 8.9 และ 3.6 ตามลำดับ มีความหมายว่า $(TA)_7TAA$ & 211G>A มีความเชื่อมโยงกันมากที่สุด

ตารางที่ 4-5 ผลการวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวน์เบิร์กของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา (n = 189)

SNPs	Observed values					Expected values					
	Numbers major allele homozygote	Numbers heterozygote	Numbers minor allele homozygote	Frequency Major allele	Frequency Minor allele	Numbers major allele homozygote	Numbers heterozygote	Numbers minor allele homozygote	Chi-Square	D_f	*p*-value
-64G>C	180	7	2	0.971	0.029	178.160	10.680	0.160	11.900	1	0.001#
$(TA)_7TAA$	122	57	10	0.796	0.204	119.843	61.315	7.843	0.552	1	0.457
211G>A (G71R)	168	19	2	0.939	0.061	166.700	21.601	0.699	1.038	1	0.308
686C>A (P229Q)	185	4	0	0.989	0.011	185.021	3.958	0.021	11.067	1	0.001#

*Observed values คือค่าสังเกตมีค่าที่แท้จริงที่ได้จากประชากรกลุ่มตัวอย่าง

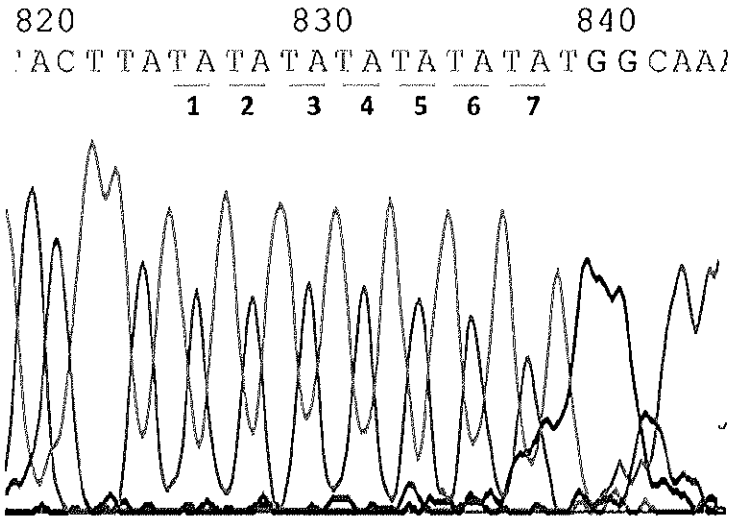
**Expected values คือค่าที่ได้จากการคำนวณจากสมการฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ จากการคำนวณความสมดุลของฮาร์ดีไวน์เบิร์ก

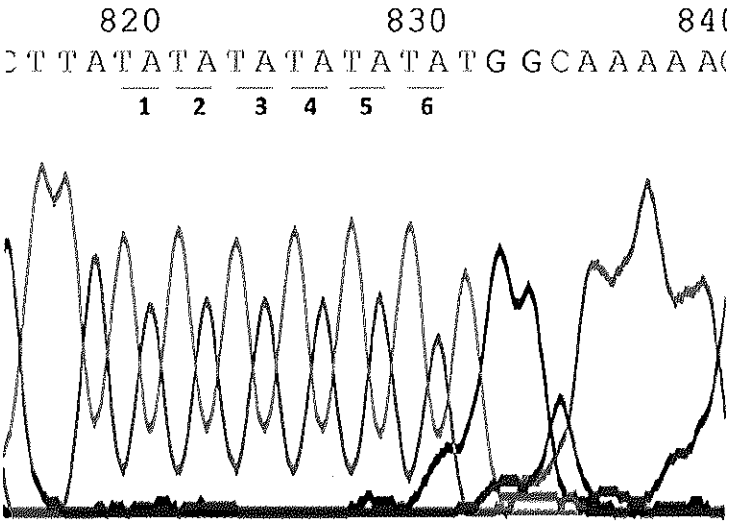
ตารางที่ 4-6 ความถี่จีโนไทป์ของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* และความสัมพันธ์กับอาการตัวเหลืองหลังคลอด (n = 189)

การกลายพันธุ์ของ *UGT1A1*	ความถี่ของจีโนไทป์	จำนวน (คน)	ความสัมพันธ์กับอาการตัวเหลืองหลังคลอด
-64G>C			
G/G	0.952	120	
G/C	0.037	7	7/9 คน (78%)
C/C	0.011	2	
$(TA)_7TAA$			
6/6	0.645	122	
6/7	0.302	57	37/67 คน (55%)
7/7	0.053	10	
211G>A (G71R)			
G/G	0.889	168	
G/A	0.100	19	14/21 คน (67%)
A/A	0.011	2	
686C>A (P229Q)			
C/C	0.979	185	
C/A	0.021	4	1/4 คน (25%)
A/A	-	0	

(ก) $(TA)_{7/7}TAA$ (homozygous)

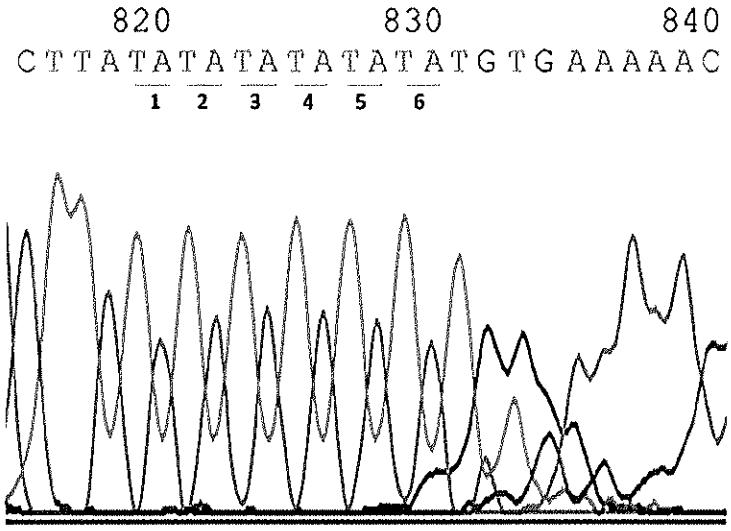


(ข) Wild-type $[(TA)_{6/6}TAA]$

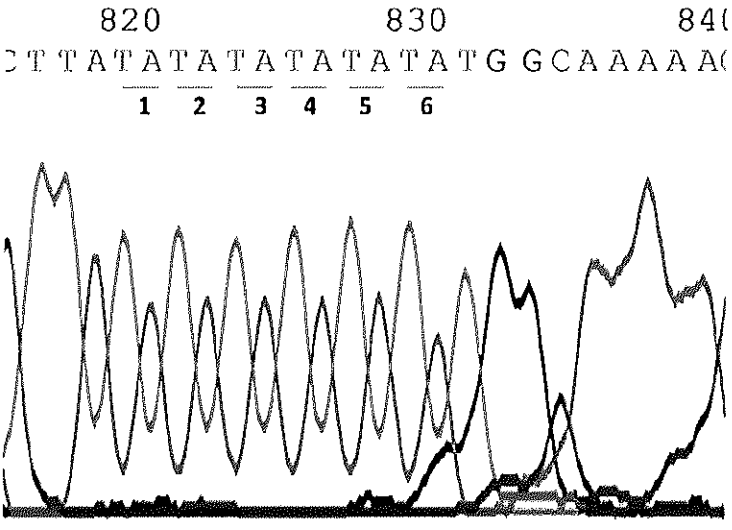


รูปที่ 4-3 Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง TATA box ของยีน *UGT1A1*: *UGT1A1*28*, ก: homozygous $[(TA)_{7/7}TAA]$ และ ข: wild-type $[(TA)_{6/6}TAA]$

(ก) $(TA)_{6/7}TAA$ (heterozygous)

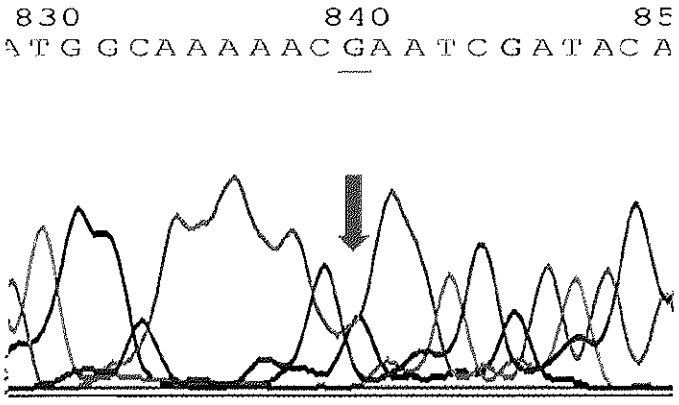


(ข) Wild-type $[(TA)_{6/6}TAA]$

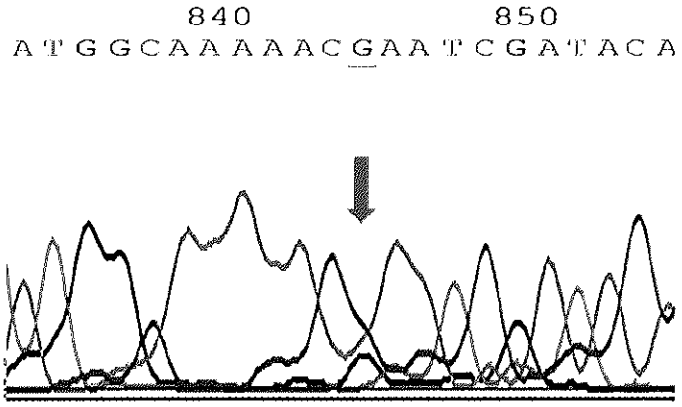


รูปที่ 4-4 Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง TATA box ของยีน *UGT1A1*: *UGT1A1*28*, ก: heterozygous $[(TA)_{6/7}TAA]$ และ ข: wild-type $[(TA)_{6/6}TAA]$

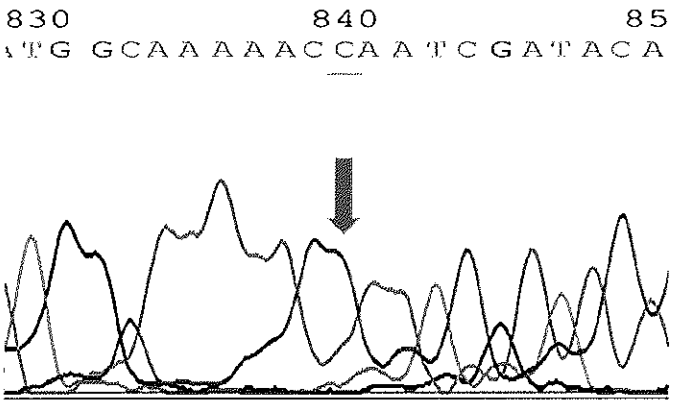
(ก) -64 G>C (homozygous)



(ข) -64 G>C (heterozygous)

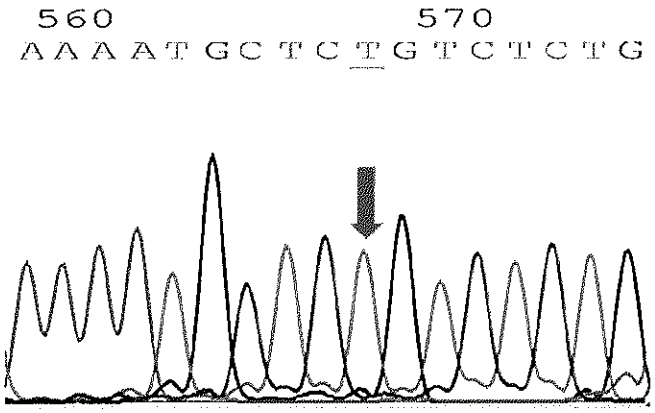


(ค) Wild-type

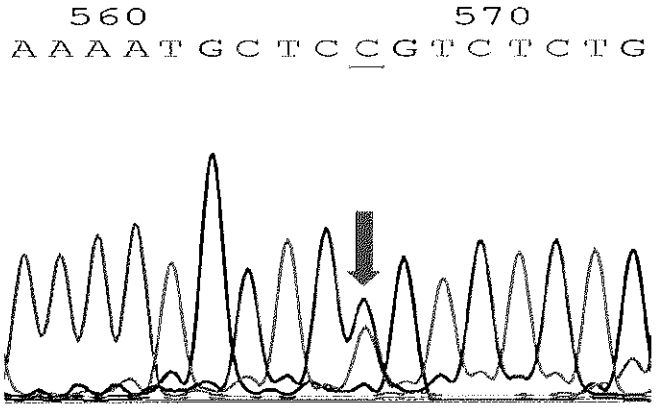


รูปที่ 4-5 Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ -64 ของยีน *UGT1A1*: *UGT1A1*81*, ก: homozygous, ข: heterozygous และ ค: wild-type

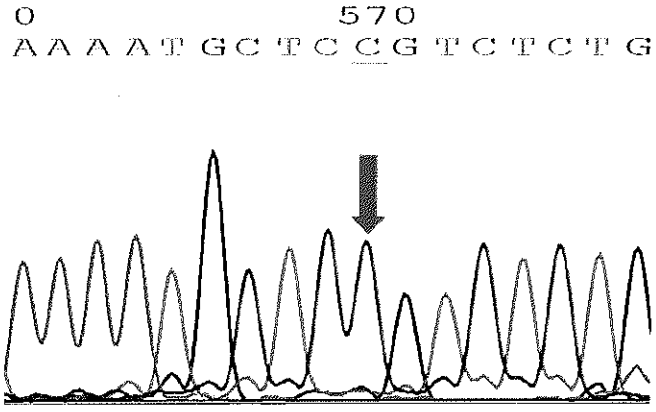
(ก) 211 G>A (homozygous)



(ข) 211 G>A (heterozygous)

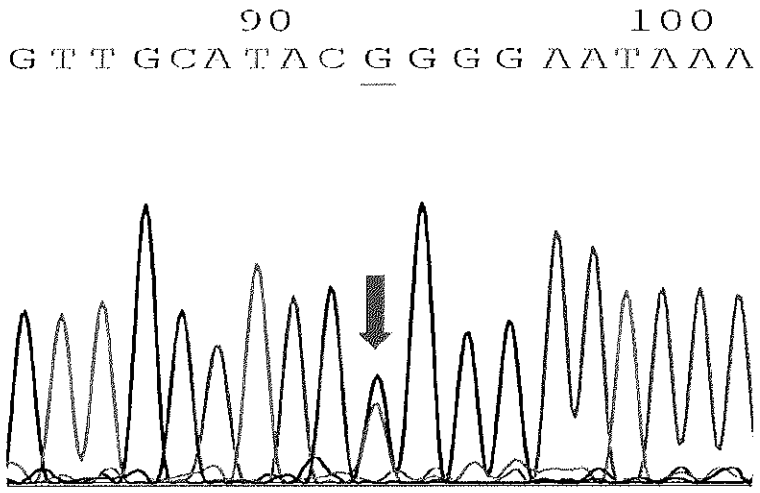


(ค) Wild-type

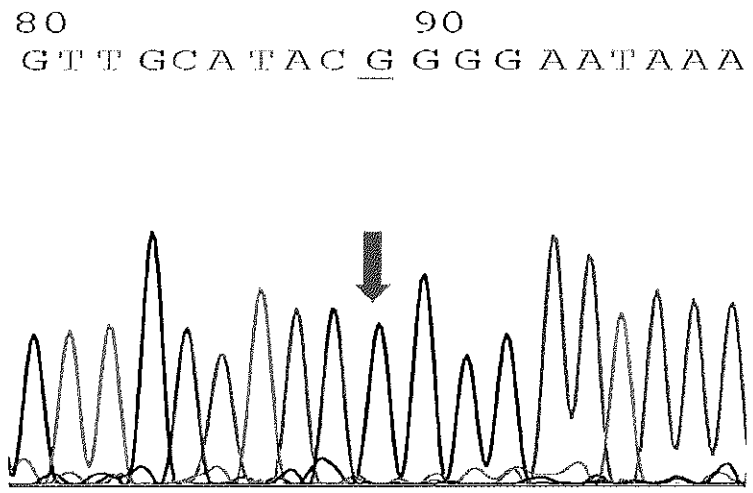


รูปที่ 4-6 Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณที่มีการแปลรหัสบนเอกซอน 1 ของยีน *UGT1A1* ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 211 G>A: *UGT1A1*6*, ก: homozygous, ข: heterozygous และ ค: wild-type

(ก) 686 C>A (heterozygous)



(ข) Wild-type



รูปที่ 4-7 Electropherograms การกลายพันธุ์บริเวณที่มีการแปลรหัสบนเอกซอน 1 ของยีน *UGT1A1* ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 686 C>A: *UGT1A1*27*, ก: heterozygous และ ข: wild-type

ตารางที่ 4-7 การวิเคราะห์ความไม่สมดุลจากการเชื่อมโยงยีน (linkage disequilibrium) ของยีน *UGT1A1*

Pairs	AIC	D-value	*r*-square	Chi-square	D_f	*p*-value
-64G>C & $(TA)_7$TAA	3.095	-0.01	0.01	2.898	1	0.089
-64G>C & 211G>A	-0.598	-0.00	0.00	0.734	1	0.392
-64G>C & 686C>A	-1.763	-0.00	0.00	0.121	1	0.728
$(TA)_7$TAA & 211G>A	8.853	-0.01	0.02	6.265	1	0.012[a]
$(TA)_7$TAA & 686C>A	3.583	0.01	0.02	7.438	1	0.006[a]
211G>A & 686C>A	-1.495	-0.00	0.00	0.262	1	0.609

[a] มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

1. อภิปรายผลการศึกษา

ข้อมูลทั่วไปกับภาวะตัวเหลืองหลังคลอด

จากการศึกษาและเก็บข้อมูลแบบสอบถามของทารกแรกเกิด 189 คน โดยผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมดมีเชื้อชาติไทย ประมาณ 90% เป็นประชากรที่มีถิ่นกำเนิดในภาคใต้ และมีบางส่วนที่แต่งงานและอพยพมาจากภาคอื่นๆ ของประเทศไทย มาตั้งถิ่นที่อยู่อาศัยในภาคใต้ พบว่าภาวะตัวเหลืองในทารกแรกเกิด 53% ของทารกแรกเกิดทั้งหมดที่ร่วมในการศึกษานี้ ใกล้เคียงกับอุบัติการณ์เกิดภาวะตัวเหลืองทั่วโลก (ประมาณ 60%) (Meredith and Bethl, 2002) ในการประเมินและวินิจฉัยภาวะตัวเหลืองหลังคลอดของทารกแรกเกิด ในทางปฏิบัตินิยมใช้การสังเกตสีผิวตั้งแต่ศีรษะจนถึงเท้า โดยแบ่งเป็น 5 โซน คือโซนที่ 1 ศีรษะและใบหน้า โซนที่ 2 บริเวณหน้าอกถึงสะดือ โซนที่ 3 ขาหนีบจนไปถึงขาส่วนบน โซนที่ 4 ขาส่วนล่างหรือแขนท่อนล่าง และโซนที่ 5 มือและเท้า (Kramer, 1969) ในปัจจุบันได้มีเครื่องมือที่สามารถวัดอาการตัวเหลืองของทารกแรกเกิดจากสีผิวคือ bilirubinometer พบว่าระดับบิลิรูบินที่วัดทางผิวหนังด้วยเครื่องดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับระดับของบิลิรูบินในเลือด อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถนำมาทดแทนวิธีการเจาะเลือดเพื่อตรวจหาระดับบิลิรูบินก่อนให้การรักษาได้ เนื่องจากมีตัวแปรหรือปัจจัยที่ทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้ เช่น อายุครรภ์ น้ำหนักทารกแรกเกิด และสีผิวของทารก

จากข้อมูลแบบสอบถามและการสังเกตอาการตัวเหลืองหลังคลอดพบว่าในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 189 คน มีอาการตัวเหลืองหลังคลอด 100 คน ในจำนวนนี้เป็นเพศชาย 55 คน และเพศหญิง 45 คน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าทารกเพศชายมีความเสี่ยงต่อการพัฒนาการเกิดภาวะตัวเหลืองในทารกหลังคลอด (Meredith and Bethl, 2002; Prachukthum *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลกับอาการตัวเหลืองหลังคลอด เช่น น้ำหนักทารกแรกเกิด อายุครรภ์ นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* มีผลทำให้ปริมาณและประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรค hyperbilirubinemia ซึ่งทำให้มีระดับบิลิรูบินในรูปของ unconjugate form สูงกว่าปกติ ได้แก่โรค CN1 และ CN2 รวมทั้งโรค Gilbert

การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1*

จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* พบว่ามี 4 ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ คือบริเวณโปรโมเตอร์พบ -64G>C (*UGT1A1*81*) และ $(TA)_7$TAA (*UGT1A1*28*) และบริเวณที่มีการถอดรหัสพบ 211G>A (*UGT1A1*6*) และ 686C>A (*UGT1A1*27*) โดยพบ $(TA)_7$TAA (homozygous และ heterozygous) (35.45%) สูงกว่า 211G>A (11.11%) ซึ่งสอดคล้องกับหลายรายงานที่มีการศึกษาในคนมาเลเซีย คนชวา และคนอินโดนีเซีย (Sutomo *et al.*, 2004; Yusoff *et al.*, 2006) แต่คนเอเชียตะวันออกและญี่ปุ่นพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง $(TA)_7$TAA 3% ซึ่งแตกต่างกับคนยุโรปและคนแอฟริกาจะพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้มากประมาณ 30% คนในเอเชียตะวันออก คือ ญี่ปุ่น จีน เกาหลี และไต้หวัน มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 211G>A ที่ความถี่สูงกว่าตำแหน่ง $(TA)_7$TAA (Akaba *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 686C>A ในตัวอย่างที่ทำการศึกษาจำนวน 4 คน (heterozygous) จากจำนวนทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Prachukthum และคณะ (2009) ที่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้จำนวน 7 คนในตัวอย่างทั้งหมด 170 คน แต่ไม่ทราบถิ่นกำเนิดของกลุ่มตัวอย่าง การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าวมีการรายงานพบมากในประชากรชาวจีนและไต้หวัน อาจเป็นไปได้ว่ามีการอพยพถิ่นฐานของบรรพบุรุษจากประเทศจีนก่อน 3 ชั่วอายุคน

ผลของการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* สามารถทำให้การแสดงออกของยีนและการทำงานของเอนไซม์มีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์และชนิดของสับสเตรท ตัวอย่างเช่นการกลายพันธุ์ตำแหน่ง $(TA)_7$TAA มีผลทำให้การถอดรหัสของยีนลดลง 70% และการกลายพันธุ์ตำแหน่ง 211G>A และ 686C>A มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ในการกำจัดออกของสับสเตรท เช่น 4MU, 1NP, บิลิรูบิน และ β-estradiol ลดลง 34-74% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ได้จากยีนปกติ (Udomuksorn *et al.*, 2007) ส่วนการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง -64G>C ยังไม่มีการศึกษารายงานว่ามีผลต่อการถอดรหัสของยีนหรือไม่ แต่ได้มีการศึกษาผลของการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง -63G>C (*UGT1A1*68*) พบว่าไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Farheen *et al.*, 2006) ดังนั้นการพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าว [$(TA)_7$TAA, 211G>A และ 686C>A] ในความถี่ที่สูง ในกลุ่มประชากรพื้นที่นั้นๆ จะทำให้ประชากรที่มีโอกาสได้รับยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ UGT1A1 เช่น irinotecan indinavir เป็นต้น มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรงจากยาได้ ถ้าเป็นไปได้ควรมีการตรวจยีน *UGT1A1* ก่อนทำการรักษาหรือให้ยาที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ UGT1A1 ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่มีประสิทธิภาพและมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากยาน้อยที่สุด

การกลายพันธุ์ของยีนที่เกิดขึ้นเมื่อนำมาพิจารณาดูความสัมพันธ์กับเพศ การนับถือศาสนา และอาการเหลืองหลังคลอด พบว่าเพศ และการนับถือศาสนาไม่มีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน โดยมีเปอร์เซ็นต์ที่พบการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ตัวอย่างการศึกษาของ Liu และคณะ (2007) พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง TATA box ($(TA)_{n/n}TAA$) ไม่มีความแตกต่างกันในเพศชายและหญิงทั้งในคนยุโรปและคนเอเชีย สำหรับการนับถือศาสนาได้นำมาพิจารณาเนื่องจากสามารถบอกขอบเขตที่อยู่ของกลุ่มประชากรหรือการอพยพย้ายถิ่นฐานของบรรพบุรุษ เช่น ศาสนาอิสลามสามารถบ่งบอกได้ว่าประชากรส่วนใหญ่อาศัยหรืออพยพย้ายถิ่นฐานมาจาก 5 จังหวัด (สงขลา สตูล ปัตตานี ยะลา และนราธิวาส) ในภาคใต้ตอนล่าง ส่วนอาการเหลืองหลังคลอดพบว่ามีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง -64G>C และ 211G>A คือ 78 และ 67% ของทารกที่มีการกลายพันธุ์ของยีนนั้นๆ อาจเกิดจากผลของการถอดรหัสของยีนหรือการทำงานของเอนไซม์ลดลงหรือการทำงานของตับยังไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้มีปริมาณของบิลิรูบินอิสระเพิ่มมากขึ้นในกระแสเลือด ทำให้เกิดอาการตัวเหลืองในทารกแรกเกิดได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Prachukthum และคณะ (2009) ที่พบว่า 211G>A มีผลทำให้เกิดอาการตัวเหลืองในทารกแรกเกิด

การวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวย์เบิร์ก

การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเมื่อนำมาวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวย์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งการกลายพันธุ์ $(TA)_7TAA$ และ 211G>A เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวย์เบิร์ก ยกเว้นตำแหน่ง -64G>C และ 686C>A ซึ่งไม่เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวย์เบิร์ก อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่อไปนี้ เช่น การอพยพ (migration) การคัดเลือกโดยธรรมชาติ (natural selection) และการผสมพันธุ์แบบไม่สุ่ม (non-random mating) ซึ่งมีรายงานก่อให้เกิดการเบี่ยงเบนของสมดุลและเป็นการยากที่จะทำการตรวจสอบในทางปฏิบัติ ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับแบบสอบถาม โดยบิดามารดาของทารกมีการอพยพย้ายถิ่นฐานมาจากหลายจังหวัดของประเทศไทย ส่วนใหญ่แล้วประมาณ 90% เป็นประชากรที่อาศัยอยู่ในภาคใต้ของไทย ทำให้ผลที่ตามมาไม่เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวย์เบิร์ก และมีการจับคู่แต่งงานที่หลากหลาย ระหว่างจังหวัดหรือภาคของประเทศไทย มีผลทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนเกิดขึ้น ซึ่งจากการศึกษาของ Udomuksorn (2006) มีรายงานการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 211G>A พบประมาณ 40% ของประชากรตัวอย่างในภาคเหนือ ซึ่งมีขอบเขตพื้นที่อยู่ใกล้กับประเทศจีน เกาหลี ไต้หวัน และญี่ปุ่น ซึ่งเป็นกลุ่มประเทศที่รายงานการกลายพันธุ์ของยีนที่ตำแหน่งนี้สูงมาก ส่วนการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง TATA box ($(TA)_7TAA$) พบว่ามีความถี่ของการกลายพันธุ์สูงที่สุด (ประมาณ 35% ของประชากรทั้งหมด) โดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้พบมากในคน Caucasians (Liu *et al.*, 2007) ดังนั้นควรมีการศึกษาความ

หลากหลายของยีนในประชากรประเทศต่างๆ ถึงแม้ว่าจะอยู่ในภูมิภาคเดียวกัน ทั้งนี้แม้ว่ามีข้อมูลการกลายพันธุ์ของยีนจากประเทศในเอเชียก็ไม่สามารถสรุปได้ว่าประชากรในประเทศไทยจะมีตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนนั้นๆ ที่ตำแหน่งเดียวกัน หรือในความถี่ที่ใกล้เคียงกัน

การวิเคราะห์ความไม่สมดุลจากการเชื่อมโยงของยีน

จากการศึกษาพบว่า $(TA)_7TAA$ กับ 211G>A มีความเชื่อมโยงกันมากที่สุด และ $(TA)_7TAA$ กับ 686C>A มีความเชื่อมโยงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Maruo และคณะ (2000) และ Boyd และคณะ (2006) ที่พบการเกิดการกลายพันธุ์แบบ heterozygous ของยีน UGT1A1 ที่ตำแหน่ง $(TA)_7TAA$ กับ 211G>A ทั้งสองตำแหน่งในตัวอย่างเดียวกัน ซึ่งมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงมากกว่าการพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง $(TA)_7TAA$ หรือ 211G>A ตำแหน่งเดียว และรายงานของ Maruo และคณะ (2003) พบการกลายพันธุ์ของยีนในตำแหน่ง $(TA)_7TAA$ กับ 211G>A ในคนเดียวกันและเป็นชาวจีน

2. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรตัวอย่างของคนไทย เชื้อชาติไทย และอาศัยอยู่ในภาคใต้ของไทยจำนวน 189 ตัวอย่าง สามารถสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

1) พบการกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง -64G>C และ $(TA)_7TAA$ (promoter region), 211G>A และ 686C>A (coding region) ซึ่งพบว่าที่ตำแหน่ง $(TA)_7TAA$ มีความถี่ของการกลายพันธุ์สูงที่สุด

2) การกลายพันธุ์ของ *UGT1A1* เมื่อนำมาวิเคราะห์สมดุลฮาร์ดีไวย์เบิร์ก พบว่าตำแหน่งการกลายพันธุ์ $(TA)_7TAA$ และ 211G>A เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวย์เบิร์ก ยกเว้นตำแหน่ง -64G>C และ 686C>A ซึ่งไม่เป็นไปตามกฎฮาร์ดีไวย์เบิร์ก และการวิเคราะห์ความไม่สมดุลจากการเชื่อมโยงของยีนพบว่าที่ตำแหน่ง $(TA)_7TAA$ กับ 211G>A และ $(TA)_7TAA$ กับ 686C>A มีความเชื่อมโยงกันมากที่สุด ตามลำดับ

3) สามารถพบอาการตัวเหลืองในทารกแรกเกิดได้ร้อยละ 53 ของทารกแรกเกิดทั้งหมด ซึ่งทารกเพศชายมีความเสี่ยงต่อการพัฒนาการเกิดอาการตัวเหลืองในทารกหลังคลอดได้มากกว่าเพศหญิง

4) เพศ และการนับถือศาสนาไม่มีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน โดยมีเปอร์เซ็นต์ที่พบการกลายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน

5) การกลายพันธุ์ของยีน *UGT1A1* ที่ตำแหน่ง -64G>C และ 211G>A พบว่ามีความสัมพันธ์กับอาการเหลืองหลังคลอด โดยพบอาการเหลืองจำนวน 78% ของตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง -64G>C และ 67% ของตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 211G>A

เอกสารอ้างอิง

กรกฎ งานวงศ์พาณิชย์. 2551. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด (DNA isolation from blood). สาขาวิชาพรีคลินิกทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. http://www.vet.cmu.ac.th/webmed/Branch/preclinic/service/DNA_from_blood.htm. (วันที่สืบค้น 22 พฤษภาคม 2551)

จริยา ชมวารินทร์, ชาญวิทย์ สีลายวัฒน์, เต็มดวง ลิ้มไพบูรณ์ และคณะ. 2540. PCR Technology and Applications. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น.

พจน์ ศรบุญลือ, โสพิศ วงศ์คำ, พัชรี บุญศิริ และคณะ. 2540. ตำราชีวเคมี. พิมพ์ครั้งที่ 2 โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา ขอนแก่น ขอนแก่น.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ม.ร.ว.ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, ยงยุทธ ยุทวงศ์ และคณะ. 2542. ชีวเคมี. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร.

รัชดา เดรสซี่. 2552. แขนงวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. http://www.ams.cmu.ac.th/mt/clinchemwebsite/teaching/510204/Electrophoresis204_RCr.doc (วันที่สืบค้น 20 มกราคม 2552)

วสันต์ จันทราทิตย์, ปราณี สี้ชนะชัย, วาสนา ศิริรังษี และคณะ. 2539. วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. โรงพิมพ์สวัสดิ์การพิมพ์ เชียงใหม่.

Adegoke, O.J., Shu, X.O., Gao, Y., Cai, Q., Breyer, J., Smith, J. and Zheng, W. 2004. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and risk of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 85(3): 239-245.

Ahmed, F., Vyas, V., Cornfield, A., Goodin, S., Ravikumar, T.S., Rubin, E.H., and Gupta, E. 1999. In vitro activation of irinotecan to SN-38 by human liver and intestine. *Anticancer Research.* 19: 2067– 2071.

Akaba, K., Kimura, T., Sasaki, A., Tanabe, S., Ikegami, T., Hashimoto, M., Umeda, H., et al. 1998. Neonatal hyperbilirubinemia and mutation of the bilirubin uridine diphosphateglucuronosyltransferase gene: a common missense mutation among Japanese and Chinese. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 46: 21-26.

Ando, Y., Saka, H., Ando, M., Sawa, T., Muro, K., Ueoka, H., Yokoyama, A., et al. 2000. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Research.* 60: 6921–6926.

Ando, Y., Saka, H., Asai, G., Sugiura, S., Shimokata, K., and Kamataki, T. 1998. UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan. *Annals of Oncology.* 9: 845–847.

Aono, S., Yamada, Y., Keino, H., Hanada, N., Nakagawa, T., Sasaoka, Y., Yazawa, T., Sato, H., Koiwai, O. 1993. Identification of defect in the genes for bilirubin UDP-glucuronosyl-transferase in a patient with Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 197(3): 1239-1244.

Araki, E., Ishikawa, M., Iigo, M., Koide, T., Itabashi, M., and Hoshi, A. 1993. Relationship between development of diarrhea and the concentration of SN-38, an active metabolite of CPT-11, in the intestine and the blood plasma of athymic mice following intraperitoneal administration of CPT-11. *Japanese Journal of Cancer Research.* 84: 697–702.

Babaoglu, M.O., Yigit, S., Aynacioglu, A.S., Kerb, R., Yurdakok, M. and Bozkurt, A. 2006. Neonatal jaundice and bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene polymorphism in Turkish patients. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 98: 377–380.

Beutler, E., Gelbart, T., and Demina, A. 1998. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 8170–8174.

Bosma, P.J., Chowdhury, J.R., Bakker, C., Gantla, S., de Boer, A., Oostra, B.A., Lindhout, D., et al. 1995. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *The New England Journal of Medicine.* 2:333(18): 1171-1175.

Boyd, M.A., Srasuebkul, P.,Ruxrungtham, K., Mackenzie, P., Uchaipichat, V., Stek, M. Jr, Lange, J.M.A., et al. 2006. Relationship between hyperbilirubinaemia and UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) polymorphism in adult HIV-infected Thai patients treated with indinavir. *Pharmacogenetics & Genomics.* 16(5): 321-329.

Burchell, B., Brierley, C.H., Rance, D. 1995. Specificity of human UDP-glucuronyltransferases and xenobiotic glucuronidation [review]. *Life Sciences.* 57(20): 1819-1831.

de Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S., van den Anker, J.N. 1999. Glucuronidation in humans: Pharmacogenetic and developmental aspect. *Clinical Pharmacokinetics.* 36(6): 439-452.

Dodds, H.M., Haaz, M.C., Riou, J.F., Robert, J., and Rivory, L.P. 1998. Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan): pharmacological properties and activation to SN-38. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 286: 578–583.

Evans W.E. and Relling M.V. 1999. Pharmacogenomics: translating functional genomic into rational therapeutics. *Science.* 286(5439): 487-491.

Farheen, S., Sengupta, S., Santra, A., Pal, S., Dhali, G.K., Chakravorty, M., Majumder, P.P., et al. 2006. Gilbert's syndrome: High frequency of the (TA)7 TAA allele in India and its interaction with a novel CAT insertion in promoter of the gene for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 gene. *World Journal of Gastroenterology*. 12(14): 2269-2275.

Gong, Q.H., Cho, J.W., Huang, T., Potter, C., Gholami, N., Basu, N.K., et al. 2001. Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics*. 11: 357–368.

Guillemette, C. 2003. Phamacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases enzymes. *The Pharmacogenomics Journal*. 3: 136-158.

Haaz, M.C., Riche, C., Rivory, L.P., and Robert, J. 1998. Biosynthesis of an aminopiperidino metabolite of irinotecan [7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecine] by human hepatic microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 26: 769–774.

http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html (วันที่สืบค้น 19 มกราคม 2552)

http://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04etta/background/dna/media/dna_1.html (วันที่สืบค้น 19 มกราคม 2552)

http://www.nature.com/tpj/journal/v6/n4/fig_tab/6500374f6.html (วันที่สืบค้น 19 มกราคม 2552)

http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm (วันที่สืบค้น 16 พฤศจิกายน 2552)

http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/webdav/site/pharmacogenomics/shared/Nomenclature/UGT1A/UGT1A1.htm (วันที่สืบค้น 16 พฤศจิกายน 2551)

Huang, C.S., Luo, G.A., Huang, M.L., Yu, S.C. and Yang, S.S. 2000. Variations of the bilirubin uridine-diphosphoglucuronosyl transferase 1A1 gene in healthy Taiwanese. *Pharmacogenetics*. 10(6): 539-544.

Huang, C.S., Luo, G.A., Huang, M.L., Yu, S.C., Yang, S.S. 2000. Variations of the bilirubin uridine-diphosphoglucuronosyl transferase 1A1 gene in healthy Taiwanese. *Pharmacogenetics*. 10(6): 539-544.

Iyer, L., Hall, D., Das, S., Mortell, M.A., Ramirez, J., Kim, S., Di Rienzo, A., and Ratain, M.J. 1999. Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 65: 576–582.

Iyer, L., King, C.D., Whitington, P.F., Green, M.D., Roy, S.K., Tephly, T.R., Coffman, B.L., and Ratain, M.J. 1998. Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *The Journal of Clinical Investigation*. 101: 847–854.

Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Hanioka, N., Saeki, M., Ishida, S., Nishimura, T., et al. 2003. Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), an active metabolite of irinotecan (CPT-11), by human UGT1A1 variants, G71R, P229Q, and Y486D. *Drug Metabolism and Disposition*. 31: 108–113.

Kadakol, A., Ghosh, S.S., Sappal, B.S., Sharma, G., Chowdhury, J.R., Chowdhury, N.R. 2000. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Human Mutation*. 16(4): 297-306.

Kaplowitz, N. 1996. Liver and biliary disease. 2nd edition. Baltimore: Williams & Wilkins.

Kehrer, D.F., Yamamoto, W., Verweij, J., de Jonge, M.J., de Bruijn, P., and Sparreboom, A. 2000. Factors involved in prolongation of the terminal disposition phase of SN-38: clinical and experimental studies. *Clinical Cancer Research*. 6: 3451–3458.

Khongcharoensombat, P. 2008. The accuracy of transcutaneous bilirubin (TcB) compare to ranserumbilirubin (TsB). *Royal Thai AirForce Medical Gazette*. 54(1): 14.

King, C.D., Rios, G.R., Green, M.D. and Tephly, T.R. 2000. UDP-Glucuronosyltransferases. *Current Drug Metabolism*. 1(2): 143-161.

Kramer L.I. 1969. Advancement of dermal icterus in the jaundiced newborn. *American journal of diseases of children*. 118: 454-458.

Kristine K.H., James J.W. and Jill M.K. 2006. Pharmacogenetics and Irinotecan Therapy: Irinotecan Metabolism and Toxicity. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 63(22): 2211-2217.

Liu, J.Y., Qu, K., Sferruzza, A.D., Bender, R.A. 2007. Distribution of the UGT1A1*28 polymorphism in Caucasian and Asian populations in the US: a genomic analysis of 138 healthy individuals. *Anti-Cancer Drugs*. 18(6): 693-696.

Mackenziea, P.I., Bockb, K.W., Burchellc, B., Guillemette, C., Ikushiro, S., Iyanagi, T., Miners, J.O., et al. 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily [mini review]. *Pharmacogenetics and Genomics*. 15(10): 677–685.

Maisels M.J. and McDonagh A.F. 2008. Phototherapy for neonatal jaundice. *The New England Journal of Medicine*. 358: 920-928.

Maruo, Y., Nishizawa, K., Sato, H., Sawa, H. and Shimada, M. 2000. Prolonged Unconjugated Hyperbilirubinemia Associated With Breast Milk and Mutations of

the Bilirubin Uridine Diphosphate- Glucuronosyltransferase Gene. *Pediatrics*. 106(5): 1-5.

Maruo, Y., Poon, KK-H., Ito, M., Iwai, M., Takahashi, H., Mori, A., Sato, H. and Takeuchi, Y. 2003. Co-occurrence of three different mutations in the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene in a Chinese family with Crigler–Najjar syndrome type I and Gilbert's syndrome. *Clinical Genetics*. 64: 420–423.

Meredith, L. and Bethl, L. 2002. Hyperbilirubinemia in the Term Newborn. *American Family Physician*. 65(4): 599-607.

Monaghan, G., Ryan, M., Hume, R., Burchell, B., Seddon, R. 1996. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *The Lancet*. 347(9001): 578-581.

Okey, A.B., Boutros, P.C., Harper, P.A. 2005. Polymorphisms of human nuclear receptors that control expression of drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenet Genomics*. 15(6): 371-379.

Prachukthum, S., Nunnarumit, P., Pienvichit, P., Chuansumrit, A., Songdej, D., Kajanachumpol, S., Pakakasama, S., Hongeng, S. 2009. Genetic polymorphisms in Thai neonates with hyperbilirubinemia. *Acta Paediatrica*. 98(7): 1106-1110.

Pratt, D.S. and Kaplan, M.M. Jaundice. In: Braunwald, E., Fauci, A.S., Kasper, D.L., *et al.* 2001. Harrison's principles of internal medicine. 15th edition. New York : Mc Graw Hill, 255-259.

Ritter, J.K., Crawford, J.M., and Owens, I.S. 1991. Cloning of two human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS-1 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 266(2): 1043-1047.

Rivory, L.P., Bowles, M.R., Robert, J. and Pond, S.M. 1996. Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. *Biochemical Pharmacology*. 52:1103–1111.

Rothenberg, M.L. 2001. Irinotecan (CPT-11): recent developments and future directionscolorectal cancer and beyond. *Oncologist*. 6: 66–80.

Shatalova, E.G., Walther, S.E., Favorova, O.O., Rebbeck, T.R. and Blanchard, R.L. 2005. Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study. *Breast Cancer Research*. 7: 909-921.

Strassburg, C.P., Lankisch, T.O., Manns, M.P., Ehmer, U. 2008. Family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A): from Gilbert's syndrome to genetic organization and variability. *Archives of Toxicology*. 82(7): 415-433.

Sugatani, J., Kojima, H., Ueda, A., Kakizaki, S., Yoshinari, K., Gong, Q.H., Owens, I.S., et al. 2001. The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology*. 33(5): 1232-1238.

Sugatani, J., Nishitani, S., Yamakawa, K., Yoshinari, K., Sueyoshi, T., Negishi, M., Miwa, M. 2005. Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression: activated glucocorticoid receptor enhances constitutive androstane receptor/pregnane X receptor-mediated UDP-glucuronosyltransferase 1A1 regulation with glucocorticoid receptor-interacting protein 1. *Molecular Pharmacology*. 67(3): 845-855.

Sugatani, J., Yamakawa, K., Tonda, E., Nishitani, S., Yoshinari, K., Degawa, M., Abe, I., et al. 2004. The induction of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 mediated through a distal enhancer module by flavonoids and xenobiotics. *Biochemical Pharmacology*. 67(5): 989-1000.

Sun, G., Wu, M., Cao, J., Du, L. 2007. Cord blood bilirubin level in relation to bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene missense allele in Chinese neonates. *Acta Pediatrica*. 96(4): 1622-1625.

Sutomo, R., Laosombat, V., Sadewa, A.H., Yokoyama, N., Nakamura, H., Matsuo, M. and Nishio, H. 2002. Novel missense mutation of the UGT1A1 gene in Thai siblings with Gilbert's syndrome. *Pediatrics International*. 44(4): 427-432.

Sutomo, R., Talib, N.A., Yusoff, N.M., Van Rostenberghe, H., Sadewa, A.H., Sunarti, Sofro. A.S., et al. 2004. Screening for G71R mutation of the UGT1A1 gene in the Javanese-Indonesian and Malay-Malaysian populations. *Pediatrics International*. 46: 565-569.

Tukey, R.H. and Strassburg, C.P. 2000. Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40: 581-616.

Udomuksorn, W. 2006. Effects of coding region mutations on UGT1A1 enzyme activity and genetic polymorphisms of UGT1A1 in Thai population. Ph.D. Thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

Udomuksorn, W., Elliot, D.J., Lewis, B.C., Mackenzie, P.I., Yoovathaworn, K., Miners, J.O. 2007. Influence of mutations associated with Gilbert and Crigler-Najjar type II syndromes on the glucuronidation kinetics of bilirubin and other UDP-glucuronosyltransferase 1A substrates. *Pharmacogenet Genomics*. 17(12):1017-1029.

Xu, C., Li, C.Y., Kong, A.N. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of Pharmacal Research*. 28(3): 249-268.

Yamamoto, A., Nishio, H., Waku, S., Yokoyama, N., Yonetani, M., Uetani, Y. and Nakamura, H. 2002. Gly71Arg mutation of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene is associated with neonatal hyperbilirubinemia in the Japanese population. *Kobe Journal of Medical Sciences*. 48: 73–77.

Yamamoto, K., Sato, H., Fujiyama, Y., Doida, Y. and Bamba, T. 1998. Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler–Najjar syndrome type II. *Biochimica Biophysica Acta*. 1406: 267–273.

Yusoff, S., Van Rostenberghe, H., Yusoff, N.M., Talib, N.A., Ramli, N., Ismail, N.Z., Ismail, W.P., et al. 2006. Frequencies of $(TA)_7TAA$, G71R, and G493R Mutations of the *UGT1A1* Gene in the Malaysian Population. *Biology of the Neonate*. 89: 171-176.

Zhang, D., Chando, T.J., Everett, D.W., Patten, C. J., Dehal, S.S., and Griffith Humphreys, W. 2005. In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation. *Drug Metabolism and Disposition*. 33(11): 1729–1739.

Zhou, Q., Sparreboom, A., Tan, E., Cheung, Y., Lee, A., Poon, D., Lee, E.J.D., and Chowbay, B. 2005. Pharmacogenetic profiling across the irinotecan pathway in Asian patients with cancer. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 59(4): 415–424.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

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

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่
จังหวัดสงขลา 90110

หนังสือรับรองนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่า

โครงการวิจัยเรื่อง : การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน UGT1A locus ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์

หัวหน้าโครงการ : ดร.วันดี อุดมชัยกุร
ภาควิชา/คณะ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้ผ่านกระบวนการพิจารณารับรองจากคณะอนุกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคนจากเวชระเบียน และสิ่งส่งตรวจจากร่างกายมนุษย์ รองคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แล้ว

ให้ไว้ ณ วันที่ 30 มิถุนายน 2552

.....ประธานอนุกรรมการ
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์วีระพล จันทร์ดียิ่ง)
รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ภาคผนวก ข

ใบเชิญชวน

ขอเชิญเข้าร่วมโครงการวิจัยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา

เรียน ท่านผู้อ่านที่นับถือ

คณะผู้วิจัยขอเล่าถึงโครงการวิจัยที่กำลังทำอยู่ และขอเชิญชวนท่านเข้าร่วมในโครงการนี้

อาการตัวเหลืองตาเหลืองของทารกหลังคลอด พบได้บ่อยในเด็กทารกหลังคลอดชาวไทย โดยที่การเกิดอาการดังกล่าวยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด คาดว่าอาการตัวเหลืองตาเหลืองของทารกหลังคลอดอาจเกิดจากความผิดปกติของการทำงานของโปรตีนชนิดหนึ่ง การทำวิจัยครั้งนี้ทำให้เราทราบสาเหตุของการเกิดอาการตัวเหลืองตาเหลืองของทารกหลังคลอด และสามารถนำไปใช้ในการประเมินความเสี่ยงของการเกิดอาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาบางชนิด การวิจัยนี้จำเป็นต้องมีอาสาสมัครจำนวนมากเข้าร่วมในโครงการ คณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอเชิญชวนท่านเข้าร่วมในโครงการนี้

ถ้าท่านตัดสินใจเข้าร่วมโครงการจะมีขั้นตอนของการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับท่านคือ 1) สอบถามข้อมูลจากแม่ 2) เก็บเลือดจากสายสะดือ หลังจากแยกทารกและคลอดรกแล้ว จึงไม่เป็นอันตรายต่อแม่และเด็ก รวมทั้งติดตามอาการของทารกหลังคลอด จากนั้นผู้วิจัยจะนำเลือดที่เก็บไปทำการศึกษาต่อไป

ท่านจะได้รับการรักษาตามวิธีการมาตรฐานอย่างครบถ้วน จะไม่มีการตรวจพิเศษใดๆ และไม่มีการเสียค่าใช้จ่ายใดๆ จากการเข้าร่วมในการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจและประวัติของผู้ร่วมโครงการ ในการหาสาเหตุของอาการตัวเหลืองหลังคลอด โดยรายละเอียดเหล่านี้จะถูกเก็บไว้เป็นความลับ และใช้เฉพาะสำหรับการวิจัยทางการแพทย์นี้เท่านั้น

ไม่ว่าท่านจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้หรือไม่ ท่านยังคงได้รับการรักษาที่ดีเช่นเดียวกับผู้ป่วยคนอื่นๆ และถ้าท่านต้องการจะถอนตัวออกจากการศึกษานี้เมื่อใด ท่านก็สามารถกระทำได้อย่างอิสระ

ถ้าท่านมีคำถามใดๆ ก่อนที่จะตัดสินใจเข้าร่วมในโครงการนี้ โปรดซักถามคณะผู้วิจัยได้อย่างเต็มที่ ตามสถานที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และหมายเลขโทรศัพท์ 084-6268483 ในเวลาราชการ

ขอบพระคุณอย่างสูง

ดร.วันดี อุดมอักษร

(หัวหน้าโครงการผู้วิจัย)

ภาคผนวก ข (ต่อ)

ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ

ชื่อโครงการ **การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *UGT1A1* ในทารกแรกเกิดที่โรงพยาบาลสงขลา**

ข้าพเจ้า (นาย/นาง/นางสาว) .....(นามสกุล) .....
ยินยอมเข้าร่วมโครงการที่ผู้วิจัย ได้อธิบายให้ข้าพเจ้าทราบ (ดังใบเชิญชวนให้ร่วมโครงการวิจัยที่แนบมานี้)

หากข้าพเจ้ามีข้อสงสัยเกี่ยวกับการรักษา ข้าพเจ้ามีสิทธิซักถามแพทย์ได้ในระหว่างการเข้าร่วมโครงการ หากการกระทำและคำชี้แจงของแพทย์ยังไม่เป็นที่พอใจ ข้าพเจ้ามีสิทธิแจ้งต่อประธานกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน (คณบดี คณะแพทยศาสตร์ โทร.074-451100) ได้ และหากข้าพเจ้าไม่พอใจในการรักษาข้าพเจ้ามีสิทธิปฏิเสธการเข้าร่วมโครงการได้ทันที โดยไม่เสียสิทธิในการรับการรักษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ต่อไป

ข้าพเจ้าได้อ่านและเข้าใจเกี่ยวกับการรักษาทั้งหมดตามคำอธิบายข้างต้นแล้ว ข้าพเจ้ายินยอมรับการรักษาตามวิธีการดังกล่าว

....
( ) (วัน/เดือน/ปี)
(ลายเซ็นอาสาสมัคร)

....
( ) (วัน/เดือน/ปี)
(ลายเซ็นนักวิจัย)

....
( ) (วัน/เดือน/ปี)
(ลายเซ็นพยาน)

ภาคผนวก ข (ต่อ)

Code.....

สำหรับสติ๊กเกอร์

แบบบันทึกประวัติผู้เข้าร่วมโครงการ

"การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน UGT1A1 ในทารกแรกเกิดที่คลอดที่โรงพยาบาลสงขลา"

1. ประวัติผู้คลอด

อายุ.....ปี

ภูมิลำเนา - จังหวัดที่เกิด.....

- จังหวัดที่อยู่.....

เชื้อชาติ.....

ศาสนา ❍ พุทธ ❍ คริสต์

❍ อิสลาม ❍ อื่นๆ.....

กรุ๊ปเลือด.....

Hct ครั้งที่ 1.....

ครั้งที่ 2.....

การดื่มแอลกอฮอล์

❍ ดื่ม ความถี่.....ครั้ง/สัปดาห์

❍ ไม่ดื่ม

การเป็นธาลัสซีเมีย

❍ ปกติ ❍ พาหะ ❍ เป็นโรค

ประวัติการเป็นโรค

❒ ความดันโลหิตสูง

❒ เบาหวาน

❒ ไทรอยด์ (Thyroid)

❒ โรคหัวใจ

❒ โรคตับ

❒ ไวรัสตับอักเสบชนิด B/ C/ พาหะ

❒ G6PD

❒ มีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง หลังคลอดหรือช่วงอื่นๆ

❒ อื่นๆ(ระบุ).....

ข้อมูลการคลอด

- คลอดวันที่.....
- เวลา.....น.
- น้ำหนักทารก.....
- เพศ.....
- APGAR score 1 นาที.....

5 นาที.....

- ประเภทของการคลอด

❍ ครบกำหนด

❍ ก่อนกำหนด.....สัปดาห์

ได้รับยา ❍Bricanyl

❍Dexamethasone.....dose

❍ ได้รับยาทั้งสองชนิด

- วิธีการคลอด

❍ ปกติ <NL> ❍ F/E

❍ V/E ❍ ท่าก้น

- ถุงน้ำคร่ำแตกก่อนคลอด.....ชั่วโมง
- การได้รับยา (ขณะรอคลอด)

- Oxytocin

❍ ได้รับ

❍ ระยะที่ 1 ❍ ระยะที่ 2

❍ ไม่ได้รับ

- ยาอื่นๆ (ระบุ).....

<มีต่อหน้าหลัง>

<พลิก>

ภาคผนวก ข (ต่อ)

Code.....

แบบบันทึกประวัติผู้เข้าร่วมโครงการ
"การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน UGT1A1 ในทารกแรกเกิดที่คลอดที่โรงพยาบาลสงขลา"

4. ประวัติสามี

อายุ.....ปี

ภูมิลำเนา - จังหวัดที่เกิด.....

- จังหวัดที่อยู่.....

เชื้อชาติ.....

ศาสนา ❍ พุทธ ❍ คริสต์

❍ อิสลาม ❍ อื่นๆ.....

การดื่มแอลกอฮอล์

❍ ดื่ม ความถี่.....ครั้ง/สัปดาห์

❍ ไม่ดื่ม

การเป็นธาลัสซีเมีย

❍ ปกติ ❍ พาหะ

❍ เป็นโรค ❍ ไม่เคยตรวจ

ประวัติการเป็นโรค

❐ ตับ

❐ ไวรับตับอักเสบชนิด B/ C/ พาหะ

❐ G6PD

❐ มีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง หลังคลอดหรือช่วงอื่นๆ

❐ อื่นๆ(ระบุ).....

2. ประวัติเชื้อชาติของบรรพบุรุษของผู้คลอด

- บิดา..... มารดา.....
- ปู่..... ย่า.....
- ตา..... ยาย.....

3. ประวัติเชื้อชาติของบรรพบุรุษของสามี

- บิดา..... มารดา.....
- ปู่..... ย่า.....
- ตา..... ยาย.....

ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

คณะผู้วิจัย

ภาคผนวก ข (ต่อ)

แบบติดตามทารกหลังคลอด

Code.....

สำหรับสติ๊กเกอร์

1. ทารกมีอาการเหลืองหลังคลอดหรือไม่

   ❍ มี หลังคลอดวันที่.....สาเหตุจาก.....

   ❍ ไม่มี

2. ผลการตรวจระดับบิลิรูบินหลังคลอด

Date	Total billirubin (mg/dl)	Direct billirubin (mg/dl)
วันที่ 1		
วันที่ 2		
วันที่ 3		
วันที่ 4		
วันที่ 5		
วันที่ 6		
วันที่ 7		

3. อาการ kernicterus

   ❍ มี ❍ ไม่มี

4. การรักษาหลังจากมีอาการเหลืองหลังคลอด

   ☐ On photo จำนวน.....วัน

   ☐ เปลี่ยนถ่ายเลือด

   ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

5. ประวัติตัวเหลืองของบุตรคนอื่นๆ

   บุตรคนที่ 1 ❍ มี ❍ ไม่มี

   บุตรคนที่ 2 ❍ มี ❍ ไม่มี

   บุตรคนที่ 3 ❍ มี ❍ ไม่มี

   บุตรคนที่ 4 ❍ มี ❍ ไม่มี

ภาคผนวก ค

การคำนวณและวิธีการเตรียมสาร

1. การเตรียม 1% Agarose Gel

- ใช้ผง agarose gel 3 กรัม
- เติม 1X ของ TAE buffer 300 มิลลิลิตร
- ให้ความร้อน โดยนำไปใส่ในเตาอบไมโครเวฟ ระดับปานกลาง เป็นเวลา 3 ถึง 4 นาที

2. การเตรียมสารละลาย Buffers และ Stock สารละลายอื่น ๆ

- สารละลาย Tris acetate (TAE) buffer 50X (Sambrook, 2001)
  - ใช้ trisma base 242 กรัม
  - เติม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร
  - เติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร

สำหรับ working solution การทำเจือจางสารละลาย 1X (เตรียม stock solution 50X 20 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 980 มิลลิลตร)

- EDTA (0.5 M, pH 8.0)
  - ชั่ง disodium EDTA·$2H_2O$ 186.1 กรัม ลงในน้ำ 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
  - จากนั้นเติม NaOH เพื่อปรับ pH ให้ได้เท่ากับ pH 8.0 (ใช้ NaOH pellets ประมาณ 20 กรัม)
  - แบ่งสารละลายเป็นส่วนๆ และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave

- Loading buffer สำหรับใช้ในการทำ agarose gel electrophoresis
  - 0.25% of bromophenol blue (run faster than xylene cyanol) (Purple)
  - 0.25% of xylene cyanol FF (Blue)
  - 30% glycerol in water

ภาคผนวก ค (ต่อ)

การคำนวณและวิธีการเตรียมสาร

- การเตรียม Molecular weight marker
  - 1 kb DNA ladder (500 µg/ml) for DNA fragments ranging from 0.5-10 kb
  - ทำการเจือจาง (0.3 ไมโครกรัม ใน 10 ไมโครลิตร หรือ 0.03 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับ working solution) กับ loading dye buffer

ถ้าต้องการเตรียม 1 มิลลิลิตร ใช้ stock 60 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye buffer 940 ไมโครลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายพีรพล สรยิง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010220090

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

รับทุนผู้ช่วยสอนภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Sornying, P., Chunuan, S. and Udomuksorn, W. 2011. The Study of *UGT1A1* Polymorphism in Neonate at Songkhla Hospital. Proceeding of the 33rd Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. Prince of Songkla University, March 17-19, 2011.