สำนักหอสมุด

อภินันทนาการ

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน MRP2 (ABCC2) ที่ ตำแหน่ง A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T และ G4544A กับการแสดงออกของ MRP2 ในเม็ดเลือดขาว ในกลุ่มอาสาสมัครชาวไทย

(Relationship between the single nucleotide polymorphisms (A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T and G4544A) of *MRP2* Gene and its expression in Thai volunteers' white blood cells)

โดย

ผศ.ดร.ภญ.พัชราภรณ์ สุดชาฎา

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 12 มิ.ย. 2558
เลขทะเบียน 1678736397
เลขเรียกหนังสือ 9 QH
W80
พ๓๑๒
๒๕๕๗

กันยายน 2557

สัญญาเลขที่ **R2555B081**

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน MRP2 (ABCC2) ที่ ตำแหน่ง A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T และ G4544A กับการแสดงออกของ MRP2 ในเม็ดเลือดขาว ในกลุ่มอาสาสมัครชาวไทย

(Relationship between the single nucleotide polymorphisms (A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T and G4544A) of *MRP2* Gene and its expression in Thai volunteers' white blood cells)

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผศ.ดร.ภญ.พัชราภรณ์ สุดชาฎา

ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

Executive Summary

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกในประเทศไทย ที่ศึกษาถึง ความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน *ABCC2* ที่ ตำแหน่ง A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T และ G4544A กับการแสดงออกของ *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาวในกลุ่มอาสาสมัครชาวไทย โดยทางผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีตรวจ SNPs ของยีนนี้โดยใช้เทคนิค Denaturing High Pressure Liquid Chromatography (DHPLC) และ การตรวจระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาวโดยวิธี real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) ซึ่งผลการศึกษาพบว่ามีเพียง SNPs -1549 G>A ที่พบว่ามีความสัมพัธ์กับระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาว (r=-0.225, p=0.031) และสำหรับ SNPs C24Tและ C3972T ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธีที่ทางผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมา จึงจะต้องมีการศึกษาค้นคว้าต่อไป

หากพิจารณาถึงระดับการแสดงออกของยีน ABCC2 ในเม็ดเลือดขาว นั้น ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพียงระดับการแสดงออกของยีน แต่ควรจะต้องมีการศึกษาการแสดงออกในระดับของโปรตีนต่อไป ยีน ABCC2 นี้เป็นยีนที่มีการแสดงออกน้อยกว่า housekeeping genes มาก และในการพัฒนาการตรวจวัดนั้นใช้เวลา และต้องทำการทดสอบจำนวนมากทำให้มีการสิ้นเปลืองงบประมาณในการพัฒนาวิธีการตรวจระดับการสดงออกของยีนนี้ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ การใช้ housekeeping gene นั้น ควรใช้มากกว่า 1 ชนิด อาจใช้ 2 หรือ 3 ชนิด ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน และผลการศึกษาพบว่าเพศหญิง และเพศชาย มีระดับการแสดงออกของ *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาวไม่แตกต่างกัน แต่เพศชายมีแนวโน้มที่สูงกว่า

เมื่อพิจารณาถึงการตรวจวัด SNPs พบว่า มี 2 SNPs ที่ไม่อยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg Equilibrium ได้แก่ 1249G>A และ 4544G>A ซึ่งมีความแตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ และบาง SNPs ยังไม่มีการศึกษาในคนไทย (1019 A>G, 1023 G>A, 1549 G>A, 61606 A>G) จึงถือว่าเป็นข้อมูลที่สำคัญ เพื่อเป็นฐานข้อมูลของ SNPs ในประชากรและเป็นประโยชน์ต่อไป และควรมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ SNPs เหล่านี้ กับ เภสัชจลนศาสตร์ของยา และการเกิดโรคต่าง ๆ ด้

บทคัดย่อ

ยีน ATP-binding cassette transporter isoform C2 (*ABCC2*) มีการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาหลายชนิด และ SNPs ที่แตกต่างกันอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน และอาจมีผลต่อเภสัชจนลศาสตร์ของยา (Pharmacokinetic) ในมนุษย์แต่ละคน โครงงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน *ABCC2* ที่ ตำแหน่ง A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T และ G4544A กับการแสดงออกของ *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาวในกลุ่มอาสาสมัครชาวไทย การศึกษานี้ทำการศึกษาในอาสาสมัคร 109 คน โดยใช้เทคนิค real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) โดยใช้ housekeeping gene (*Actin-ß, ß2-M, GAPDH*) เป็นตัวควบคุมภายใน เพื่อหาการแสดงออกของ *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาว และใช้เทคนิค Denaturing High Pressure Liquid Chromatography (DHPLC) ในการหา SNPs ของ *ABCC2* และยืนยันด้วยการทำ sequencing เมื่อทำการทดสอบความสัมพันธ์ของ SNPs และ การแสดงออกของยีน ABCC2 ในเม็ดเลือดขาวนั้น มีเพียง SNPs -1549 G>A ที่พบว่ามีความสัมพัธ์กับระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาว (r=-0.225, p=0.031) แต่อีก 5 SNPs ที่ทำการทดสอบ ยังไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงระดับการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเม็ดเลือดขาวต่อไปต่อไป นอกจากนี้อัตราส่วนการแสดงออกของยีน *ABCC2* ระหว่างเพศชายและเพศหญิง โดยเทียบกับการแสดงออกของ housekeeping genes ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P-value>0.05) และจากการทดสอบความคงตัวของ housekeeping genes พบว่าควรใช้ housekeeping genes มากกว่า 1 ชนิดเป็นตัวควบคุมภายในในการหาระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเซลล์เม็ดเลือดขาว และในด้านความถี่ของ SNPs ของยีน *ABCC2* พบว่ามีทั้งเหมือนและแตกต่างจากประชากรอื่น ผลจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางพันธุศาสตร์สำหรับประชาชนไทยต่อไป

Abstract

ATP-binding cassette transporter isoform C2 *(ABCC2)* is expressed in many organs including peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) which are targets of several drugs. Differences of *ABCC2* SNPs may result in variation of pharmacokinetics of the drugs. This study aimed to investigate the relationship of the *ABCC2* SNPs (A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T and G4544A) and the expression of the gene in PBMCs in 109 healthy Thai males and females. Real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time QPCR) was performed to analyze the expression of *ABCC2* and the housekeeping genes (*Actin-β, β2-M, GAPDH*) which were used as endogenous controls. Denaturing High Pressure Liquid Chromatography (DHPLC) technique was utilized to determine the SNPs and confirmed with sequencing. The results showed that only SNPs -1549 G>A reveal a week relationship (r=-0.225, p=0.031) with the expression of ABCC2 in PBMCs. However, the further studies to explore the protein expression are warranted. Considering the ratio of the level of *ABCC2* expression between males and females, no difference was found. In addition, the results revealed that more than 1 housekeeping genes should be used for normalization of *ABCC2* expression levels in PBMCs. Moreover, some of the SNPs frequencies were similar and some were different compared to other population. These results will be useful for future genetic study in Thai population.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี อันเนื่องมาจากการให้ความช่วยเหลือและการสนับสนุนเป็นอย่างดีจากหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.ภก. อนันต์ชัย อัศวเมฆิน และคุณวรรณวิสาข์ เจริญฉิม อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ดร.วรรณา ทองนพคุณ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล สำหรับความช่วยเหลือและกรุณาสนับสนุนการดำเนินงานทางห้องปฏิบัติการเป็นอย่างดี

ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปของงานวิจัย (Executive summary)	I
บทคัดย่อภาษาไทย	II
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	IV
รายการคำย่อ	V
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การปริทัศน์วรรณกรรม	3
บทที่ 3 กลุ่มตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง	11
บทที่ 4 การแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาว	13
บทที่ 5 Single nucleotides polymorphisms ของยีน *ABCC2*	24
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	38

มหาวิทยาลัยนเรศวร

รายการคำย่อ

ABCB1	=	Adenosine tri-phosphate binding cassette B1
ABCC1	=	Adenosine tri-phosphate binding cassette C1
ABCC2	=	Adenosine tri-phosphate binding cassette C2
ABCG2	=	Adenosine tri-phosphate binding cassette G2
Actin-β	=	Beta-actin
ALT	=	Alanine aminotransferase
AST	=	Aspartate aminotransferase
β2-M	=	Beta-2-microglobulin
BCRP	=	Breast cancer resistant protein
CBC	=	Complete blood count
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
cMOAT	=	Canalicular multispecific organic anion transporter
CPT	=	Cell preparation tube
Ct	=	Cycle threshold
DJS	=	Dubin-johnson syndrome
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
GAPDH	=	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hct	=	Hematocrit
Hgb	=	Hemoglobin
HIV	=	Human immunodeficiency virus
HMBS	=	Hydroxymethyl-bilane synthase
HPRT1	=	Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1
MDR1	=	Multidrug resistance 1
MHC class I	=	Major histocompatibility complex class I
mRNA	=	Messenger ribonucleic acid
MRP	=	Multidrug resistance protein
MRP1	=	Multidrug resistance protein 1
MRP2	=	Multidrug resistance protein 2
MSD	=	Membrane-spanning domains
MSD1	=	Membrane-spanning domains 1
MSD2	=	Membrane-spanning domains 2
MSD3	=	Membrane-spanning domains 3
NBD	=	Nucleotide binding domain
NBD1	=	Nucleotide binding domain 1
NBD2	=	Nucleotide binding domain 2
NTC	=	No-template control
PBMCs	=	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	=	Polymerase chain reaction
QRT-PCR	=	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RNA	=	Ribonucleic acid
RPL13A	=	Ribosomal protein L13A

RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
S.D.	=	Standard deviation
SDHA	=	Succinate dehydrogenase complex A
SNPs	=	Single nucleotide polymorphisms
TBP	=	TATA box binding protein
Tm	=	Melting temperature
UBC	=	Ubiquitin C
YWHAZ	=	Zeta polypeptide

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Adenosine tri-phosphate binding cassette transporter isoform C2 (*ABCC2*) ประกอบด้วย 32 exon และมีช่วงประมาณ 200 kb[1] มีบทบาทสำคัญในกระบวนการปกป้องร่างกายด้วยการขนส่งยา สารเคมี และสารแปลกปลอมออกจากร่างกาย (detoxification) โดยการ conjugate กับ lipophilic substance ได้แก่ glutathione, glucuronate และ sulfate ซึ่งจะเกิดขึ้นใน phase II ของกระบวนการ biotransformation[2] โดยยีน *ABCC2* นี้ มีการแสดงออกที่อวัยวะต่างๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น เซลล์ตับ ลำไส้ ไต สมอง รก อัณฑะ[3-6] และเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocytes)[4,7] ซึ่งมีการศึกษาที่สันนิษฐานว่าการแสดงออกของยีน *ABCC2* มีความแตกต่างกันระหว่างบุคคลและอาจส่งผลให้เกิดความแตกต่างทางเภสัชจลนพลศาสตร์ของยาหลายชนิดมีเป้าหมายในการออกฤทธิ์ที่เม็ดเลือดขาว เช่น ยาต้านมะเร็ง ยาปฏิชีวนะ ยาต้าน HIV และยากดภูมิคุ้มกัน เป็นต้น[3-6,10]

เซลล์เม็ดเลือดขาว (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) เป็นตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ยาหลายชนิด เช่น ยาต้านมะเร็ง[11] หรือยาต้าน HIV บางชนิด[12,13] เป็นต้น โดยภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแสดงออกของ ABC-transporter proteins หลายชนิด เช่น BCRP (ABCG2) MDR1 (ABCB1) MRP1 (ABCC1) รวมทั้ง MRP2 (ABCC2) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่ขนส่งยาออกจากเซลล์ ทำให้มีผลต่อเภสัชจลนศาสตร์และประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของยาได้[7] ระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2* ที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคลอาจเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น อายุครรภ์[14] ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์[15] ความแตกต่างทางพันธุกรรม (SNPs)[3,14-16] เชื้อชาติ[17] และเพศ[18-21] อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *ABCC2* โดยมีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าความแตกต่างระหว่างเพศมีผลต่อการแสดงออกของยีน *ABCC2* โดย testosterone อาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความแตกต่างในการแสดงออกของยีนนี้ระหว่างเพศ[18-21] อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษาในมนุษย์ยังมีจำกัดและผลการศึกษายังไม่ชัดเจน

ผลของ Single nucleotide polymorphisms (SNP) ของกลุ่มยีน ABC transporter นี้ ที่มีแตกต่างกันในมนุษย์แต่ละคนจะมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญต่อความไวในการตอบสนองต่อผลการรักษาของยาในแต่ละคน อันเป็นผลเนื่องจากผลของ SNP ที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อค่าการดูดซึมยาเข้าสู่กระแสเลือด(Bioavailability) การนำเข้า ทำลาย ตลอดจนการขับออก ที่ตับ ที่ลำไส้ และที่ไต ซึ่งส่งผลให้เกิดมีความ แปรปรวนของค่าเภสัชจลนศาสตร์ของยา (Pharmacokinetic) ในมนุษย์แต่ละคน[10,22] SNP ของยีน *ABCC2* นี้พบว่ามีความแตกต่างของความถี่ของการกระจายเป็นอย่างสูงระหว่างเชื้อชาติ (Inter-ethic variability)[22]

จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมายังไม่พบการศึกษาการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาวและการศึกษา SNP ของยีนนี้ ในกลุ่มคนไทย ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะทำการทดลองศึกษา SNP ของยีน *ABCC2* ในกลุ่มตัวอย่างคนไทยที่มีสุขภาพดีเพื่อเปรียบเทียบ หาความแตกต่างของ SNP กับกลุ่มประชากรเชื้อชาติอื่นๆ ที่มีรายงานการศึกษาใน ต่างประเทศแล้ว หาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ที่ตำแหน่ง A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T และ G4544A ของ ยีน *ABCC2* กับการแสดงออกของของยีนนี้ ตลอดจนสร้างข้อมูล SNP ของยีนนี้ในคนไทย ซึ่งจะเป็น ประโยชน์ในการศึกษาและการวิจัยผลของยีนต่อยา (Pharmacogenomic research) ในอนาคต ซึ่งจะเป็น ประโยชน์ต่อการใช้ยาให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในกลุ่มคนไทย

วัตถุประสงค์

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP ของยีน *ABCC2* ที่ ตำแหน่ง A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T และ G4544A กับการแสดงออกของ *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาวในกลุ่มอาสาสมัครชาวไทย

ขอบเขตของการศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการทำวิจัยทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ ในเชิงคุณภาพจะมีการตรวจชนิดของ SNP ของยีน *ABCC2* โดยวิธี DHPLC และการวิเคราะห์แบบ direct sequencing ในส่วนของการแสดงออก ของ *ABCC2* mRNA จะใช้วิธีการวิเคราะห์โดย Real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time QPCR) ในเชิงปริมาณ ค่าต่างๆที่ได้จากการวิเคราะห์จะถูกนำมาหาความสำคัญเชิงปริมาณและสถิติ ตลอดจนหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ SNP ของยีน *ABCC2* กับ *ABCC2* mRNA โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลองจะได้มาจาก เลือด และ เม็ดเลือดขาวที่เก็บมาจากเลือด อาสาสมัครสุขภาพดีชาวไทย ผลที่ได้จากการทำวิจัยครั้งนี้ (การวิจัยในคนไทย) จะนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับผลการวิจัยในเชื้อชาติอื่นๆที่มีผู้รายงานไว้แล้ว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

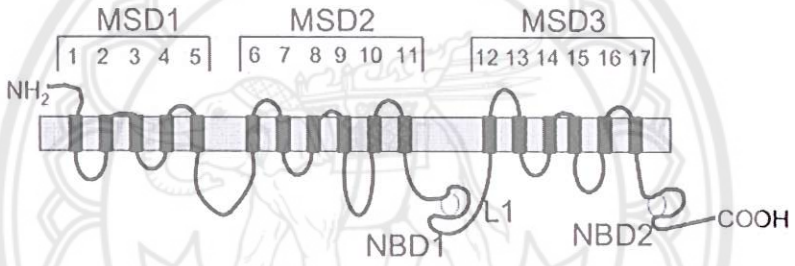
ผลการศึกษาที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและการวิจัยของยีน *ABCC2* ต่อยา (Pharmacogenomics research) ในอนาคตต่อไป ซึ่งจะก่อให้เกิดการใช้ยาอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดในกลุ่มประชากรชาวไทย

บทที่ 2
การปริทัศน์วรรณกรรม

โครงสร้างและลักษณะของโปรตีน ABCC2

Adenosine tri-phosphate binding cassette transporter isoform C2 (*ABCC2*) รู้จักกันในชื่อ MRP2, canalicular MRP (cMRP) หรือ canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) MRP2 เป็นสมาชิกลำดับที่ 2 ของตระกูล MRP membrane transporter ซึ่งปัจจุบันค้นพบ MRP ทั้งหมด 9 ชนิด[2] ยีน *ABCC2* ประกอบด้วย 32 exons ซึ่งถูกพบบนตำแหน่ง chromosome 10q24 และถ่ายทอดเป็นโปรตีนชนิด MRP2 (ABCC2) โดยโครงสร้างของโปรตีน ABCC2 ในมนุษย์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1545 โมเลกุลและมีน้ำหนักโมเลกุลในรูปที่ไม่รวมตัวเป็น glycosylated form เท่ากับ 174 kDa ซึ่งโปรตีน ABCC2 ที่อยู่ในรูป mature จะอยู่ในรูป N-glycosylated และจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 190 kDa[23] โปรตีน ABCC2 มีโครงสร้างหลักคล้ายกับ MDR อื่นๆคือภายในเป็นโครงสร้างที่เพิ่มจำนวนขึ้นของ 2 cytosolic nucleotide ATP-binding sites และ 2 six transmembrane segments[236]

ภายในโมเลกุลโปรตีน ABCC2 ประกอบด้วย 2 ส่วนที่คล้ายกัน ได้แก่ ส่วนแรกคือส่วนที่ฝังตัวในผนังเซลล์เรียกว่า transmembrane domain ซึ่งประกอบด้วยส่วนของโปรตีนรูปแท่งจำนวน 17 แท่ง ที่ถูกจัดให้อยู่ในรูป membrane-spanning domains (MSD) 3 ส่วน และส่วนที่สองคือส่วนของโมเลกุลที่ทำหน้าที่จับกับนิวคลีโอไทด์ เรียกว่า nucleotide binding domain (NBD)[24] ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างของ ABCC2[2]

บริเวณ N-terminal domain MSD1 ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 200 โมเลกุล โดยมี NH_2 –terminus อยู่บริเวณ extracytosolic ซึ่ง MSD1 ประกอบด้วย 5 transmembrane segments และเชื่อมต่อกับ MSD2 ด้วย cytoplasmic loop (L0) ส่วน MSD2 และ MSD3 ประกอบด้วย 6 transmembrane segments ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วย intracellular segment L1 โดยโปรตีน MRP2 ประกอบด้วย 2 cytosolic nucleotide-binding domains (NBD1 และ NBD2) ที่ทำหน้าที่จับกับ ATP ซึ่ง NBD1 จะอยู่บริเวณ L1 segment ส่วน NBD2 จะอยู่บริเวณ COOH-terminus ของ MSD2 domain[24]

ตำแหน่งที่พบโปรตีน ABCC2

ABCC2 มีการแสดงออกอยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ตับ (canalicular membrane) ไต ทางเดินอาหาร ลำไส้เล็ก[25] เยื่อหุ้มสมอง ลำไส้ใหญ่[26] syncytiotrophoblast ในรก เนื้อเยื่อปอด กระเพาะอาหาร[24] และพบมากที่ apical membrane ของท่อไตส่วน proximal นอกจากนี้ยังสามารถพบโปรตีน ABCC2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Peripheral blood mononuclear cells, CD4 lymphocytes) และใน tumor tissue เช่น ovarian and colorectal carcinomas, mesotheliomas, hepatocarcinoma[23]

บทบาทหน้าที่ของโปรตีน ABCC2

โปรตีน ABCC2 มีบทบาทสำคัญในการปกป้องร่างกายจาก xenobiotics ที่เกิดขึ้นจากสิ่งแวดล้อม โดยกระบวนการขับสารพิษออกจากเซลล์ นอกจากจะมีหน้าที่ในการขับสารพิษออกทางน้ำดีแล้วโปรตีน ABCC2 ยังมีบทบาทในการรักษาระดับสมดุลการลดลงของ folate ด้วย มีผลการศึกษาในหนูที่มีภาวะ hyperbilirubinemia เกี่ยวกับการขับ folate ออกทางน้ำดี ซึ่ง folate เป็น substrates ของ ABCC2 transporter อย่างไรก็ตามโปรตีน ABCC2 มีบทบาทหลักในการขับสาร organics anion ออกจากตับ ซึ่งในหนูและคนที่ขาด transporter นี้ก็จะพัฒนาเป็นโรคตับที่มีความรุนแรงน้อย ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ตับไม่สามารถขับ bilirubin-glucoronides ออกได้ นอกจากนี้ภาวะท่อน้ำดีอุดตันจะมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ที่ลดลง[23]

การศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าโปรตีน ABCC2 มีหน้าที่ขับสารจำพวก amphipathic anion เช่น bilirubin-glucoronides จากตับออกทางน้ำดี ซึ่งถ้าอยู่ในภาวะขาดโปรตีน ABCC2 ซึ่งเป็นตัวขนส่งที่ขับยาออกจะทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับตับ คือ Dubin-johnson syndrome (DJS)[23]

การศึกษาในหลอดทดลอง พบว่า โปรตีน ABCC2 จะทำหน้าที่ขนส่ง glutathione, glucoronide และ sulfated-conjugated substates เช่น organic anions (methotrexate), neutral multidrug resistance (vincristine, vinblastine, camptothesins, CPT-11, SN-38)[23]

สำหรับบทบาทสำคัญของโปรตีน ABCC2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Peripheral blood mononuclear cells: PBMCs) คือการขนส่งยาที่มีตำแหน่งออกฤทธิ์ (sites of action) อยู่ที่ PBMCs ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้ระดับยาสะสมในเซลล์ลดลงและส่งผลให้การรักษาล้มเหลว[27]

กลไกในกระบวนการขนส่งของโปรตีน ABCC2

กลไกที่แท้จริงในการขนส่ง substrates ของโปรตีน ABCC2 ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการขนส่งของโปรตีน ABCC2 เล็กน้อยดังนี้

1. กระบวนการขนส่งของ ABCC2 เกิดขึ้นโดยการจับกับ glutathione (GSH) เพียงอย่างเดียว หรือจับกับสารประกอบอื่นๆ เพื่อขนส่ง substrates ออกนอกเซลล์[23]
2. ABCC2 ผ่านกระบวนการ phosphorylation โดยการกระตุ้นด้วย protein kinase alpha (PKCα) ทำให้เกิดกระบวนการขนส่งขึ้น ซึ่งคล้ายกับการขนส่งของโปรตีน MRP1[28]
3. การขนส่ง substrates บางชนิดของ ABCC2 มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการทำงานของ chloride channel ที่แยกได้จากเซลล์ตับ[24]

Substrates และ inhibitors ของโปรตีน ABCC2

Substrates ของโปรตีน ABCC2 ที่พบในมนุษย์ ได้แก่ glutathione, bilirubin, glucuronide, glutathione disulfide เป็นต้น[23] ส่วนยาที่เป็น substrates ของโปรตีน ABCC2 ได้แก่ saquinavir[29,30], anticancer agent ประกอบด้วย cisplatin, vinblastin และ camptothecin derivatives[3], diclofenac, acetaminophen, methotrexate, ezetimibe, enalapril, enalaprilat[25] เป็นต้น

Inhibitors ของโปรตีน ABCC2 ได้แก่ organic anions เช่น furosemide, probenecid และยังพบว่า ยากลุ่ม non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (delavirdineefavarenz และ nevirapine), nucleoside reverse transcriptase inhibitors (abacavir, emtricitabine และ lamivudine) และ tenofovir[25,31] มีผลยับยั้ง MPR2/ABCC2 ในหลอดทดลอง[25]

ตารางที่ 1 Substrates ของโปรตีน ABCC2[24]

กลุ่มยา	ชื่อยา
Antibiotics	Ampicillin
	Ceftriaxone
	Azithromycin
	Grepafloxacin
Anticancer drugs	Methotrexate
	Cisplatin
	Vinblastine
	Irinotecan
	Camptothecin
HIV protease inhibitors	Saquinavir
	Ritonavir
	Indinavir
Other drugs	Pravastatin
	Temocaprilat
	Acetaminophen
Metalloids	Arsenic
Endogenous compounds	Bilirubin
	Leukotrienes
	Bile salts
	Estradiol
	Glutathione
Fluorescent dyes	Fluo-3
	Glutathione-monochlorobimane
	Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein

ตารางที่ 2 Inhibitors ของโปรตีน ABCC2[24]

กลุ่มยา	ชื่อยา
-	Probenecid
	Rifampicin
	Cyclosporin A
	Glibenclamide
	Flavonoids
	Indomethacin
	MK571
	Azithromycin

ตารางที่ 3 สารในร่างกายที่มีผลควบคุมการแสดงออกของโปรตีน ABCC2[24]

กลุ่มสาร	ชื่อสาร
Biliary acids	Chenodeoxycholic acid
	Cholic acid
	Ursodeoxycholic acid
Hormones	Glucocorticoids
	Endothelin-1
Inflammatory cytokines	Interleukin-1b
	Tumor necrosis factor a
	Interleukin-6

ตารางที่ 4 Inducers ของโปรตีน ABCC2[24]

กลุ่มสาร	ชื่อสาร
Metals and metalloids	Arsenic
	Antimony
	Cisplatin
PXR ligands	Rifampicin
	Spironolactone
	Nifedipine
	Ritonavir
	Hyperforin
	RU-486
Chemopreventive agents	Oltipraz
	Sulforaphane
	Diallylsulphide
Chemical carcinogens	2-Acetylaminofluorene
Other drugs	Phenobarbital
	Tamoxifen
	Genipin

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาว

การแสดงออกของโปรตีน ABCC2 พบได้ในหลายบริเวณของร่างกาย เช่น เซลล์ตับ ลำไส้เล็ก ท่อไตส่วน proximal[23] สมอง, หัวใจและเซลล์เม็ดเลือดขาว[32]

เซลล์เม็ดเลือดขาว (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) เป็นบริเวณที่ออกฤทธิ์ของยาหลายชนิด เช่น ยารักษาโรคมะเร็ง[11], ยาต้านไวรัส HIV[12,13] เป็นต้น

จากการศึกษาของ Janneh และคณะในปี ค.ศ. 2005 ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 กับการสะสมของยา saquinavir ใน PBMCs ในภาวะที่มี specific inhibitors ของ ABCC2 พบว่า specific inhibitors ของโปรตีน ABCC2 จะเพิ่มการสะสมของระดับยาของ saquinavir ในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ[12] และในปี ค.ศ. 2007 ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 กับระดับ CAR (cellular accumulation ratio) ของยา lopinavir ใน PBMCs และ CD4 T-cells ในภาวะที่มีตัวยับยั้งโปรตีน ABCC2 คือ tariquidar, MK571, furosemide และ dipyridamole พบว่าการยับยั้งโปรตีน ABCC2 มีผลการเพิ่มการสะสมของยา lopinavir ใน PBMCs และ CD4 T-cells อย่างมีนัยสำคัญ[27]

มีการศึกษาการแสดงออกของ ABCC2 ใน mature lymphocytes (CD4, CD8, CD56, CD19 cells) พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ใน CD4 cells มากที่สุด[28] และเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง mature lymphocyte กับ CD34-positive hematopoietic cells พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ใน CD34-positive hematopoietic cells มากกว่า mature lymphocyte ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ที่สูงกว่าใน CD34-positive hematopoietic cells นั้นจะช่วยในการป้องกันและกำจัดสารพิษออกจากเซลล์[33] และจากการศึกษาของ Liptrott และคณะในปี ค.ศ. 2008 พบว่า อาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 8 คน มีการแสดงออกของ ABCC2 ใน PBMCs ซึ่งมีความผันแปรระหว่างบุคคล 1.2 เท่าจากค่ามัธยฐาน[34]

การศึกษาความแตกต่างระหว่างเพศที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *ABCC2*

การศึกษาในสัตว์ทดลอง

ระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2*; จากการศึกษาของ Simon และคณะในปี ค.ศ. 2006 พบว่าระดับ mRNA *ABCC2* ที่เซลล์ตับของหนู Sprague-Dawley ในหนูเพศเมียมากกว่าเพศผู้ 3.5 เท่า[20]

ระดับการแสดงออกของโปรตีน *ABCC2*; มีการศึกษาในเซลล์ตับของหนู Sprague-Dawley ภาวะปกติพบว่าการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในหนูเพศเมียมากกว่าเพศผู้ 4.5 เท่า และเมื่อศึกษาผลของ pituitary hormone และ sex hormone ต่อการควบคุมการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 พบว่า testosterone มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในขณะที่ growth hormone มีเพียงเฉพาะรูปแบบการหลั่งแบบหนูเพศเมียเท่านั้นที่มีผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 อย่างมีนัยสำคัญ[20] Rost D. และคณะในปี ค.ศ. 2005 พบว่า ที่เซลล์ตับของหนู Sprague-Dawley (SD) เพศเมียมีการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 มากกว่าเพศผู้ 1.5 เท่า นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ของ Dehydroepiandrosterone (DHEA) ซึ่งเป็น steroid hormone ที่สามารถเปลี่ยนเป็น testosterone และ estradiol ได้ พบว่า DHEA มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในหนูเพศผู้ ในขณะที่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในหนูเพศเมีย[19] นอกจากนี้การศึกษาของ Hayashi และคณะในปี 2011 พบว่าหนู SD เพศเมีย มีอัตราการขจัดยา garenoxacin สูงกว่าเพศผู้ถึง 3 เท่าและในหนู Eisai hyperbilirubinemic (EHBRs) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน ABCC2 น้อย มีอัตราการขจัดยา garenoxacin ลดลงประมาณร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับหนู SD ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย[35] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Suzuki และคณะ ในปี 2006 ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเซลล์ตับของหนู Sprague-Dawley อายุประมาณ 10 สัปดาห์ โดยวัดจากระดับยาในเลือดของ doxorubicin ซึ่งเป็น substrates ของโปรตีน ABCC2 พบว่าหลังจากให้ยา doxorubicin IV single dose กราฟแสดงระดับความเข้มข้นของยาในเลือดของหนูเพศผู้สูงกว่าเพศเมียในช่วง 40 และ 60 นาทีหลังจากให้ยาซึ่งแสดงว่าการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในหนูเพศเมียมากกว่าหนูเพศผู้[18] จากการศึกษาข้างต้นพบว่า ในสัตว์มีแนวโน้มการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเพศเมียมากกว่าเพศผู้ โดยอาจเป็นผลมาจากการถูกควบคุมโดยฮอร์โมน แต่ในขณะที่การศึกษาของ MacLeanC และคณะ ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ที่ลำไส้ในหนูเพศผู้และเพศเมีย พบว่าการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 จะลดลงตามลำไส้แต่ละส่วน (duodenum > jejunum > ileum > colon) โดยพบว่าการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเพศเมียน้อยกว่าเพศผู้[21]

การศึกษาในมนุษย์

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเซลล์ตับของมนุษย์ โดย American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutic ในปี 2012 และการศึกษาใน PBMCs ของ Paintsil E. และคณะในปี ค.ศ.2011 พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างเพศและการแสดงออกของยีน *ABCC2*[16,36]

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่าการศึกษาการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ยังมีจำกัดและผลการศึกษายังไม่ชัดเจน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับการแสดงออกยีน *ABCC2* ในมนุษย์เพิ่มเติม

Housekeeping Genes ที่นำมาใช้เทียบการศึกษาการแสดงออกของยีน *ABCC2*

Housekeeping genes คือยีนที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมภายใน (Internal control) สำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละเซลล์ โดยจะต้องเป็นยีนที่มีการแสดงออกในทุกเซลล์หรือทุกเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาและควรมีระดับการแสดงออกคงที่หรือมีความผันแปรน้อยในเนื้อเยื่อที่นำมาศึกษาหรือในสภาวะการทดลองต่างๆ ซึ่ง Housekeeping genes ในมนุษย์มีหลายชนิด เช่น *Actin-β, β2-M, GAPDH, HMBS, HPRT1, RPL13A, SDHA, TBP, UBC* และ *YWHAZ*[37]

GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา oxidoreductase ในกระบวนการ glycolysis และ gluconeogenesis และยังมีบทบาทหน้าที่ในการควบคุมการขนส่งสารของเซลล์ การตายของเซลล์ การซ่อมแซม DNA การจำลอง DNA รวมไปถึงควบคุมกระบวนการ transcription และ translation ของ DNA[38]

Actin-β (Beta-actin) เป็นโปรตีนโครงร่างของเซลล์ (cytoskeletal structural protein) มีความเกี่ยวข้องกับโครงสร้างและการเคลื่อนที่ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ *Actin-β* มีความเกี่ยวข้องกับการลุกลามและกระจายตัวของเซลล์มะเร็งอีกด้วย[38]

β2-M (Beta-2-microglobulin) เป็นส่วนประกอบของ MHC class I (major histocompatibility complex class I) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีความจำเพาะบนผิวเซลล์ พบว่ายีน *β2-M* มีการแสดงออกในเม็ดเลือดขาวมากกว่า fetal brain 112 เท่า โดยมีการแสดงออกใน CD4, CD8, CD56 มากกว่า CD19 สองเท่า[37]

ยีน *GAPDH, Actin-β* และ *β2-M* ถูกนำมาใช้เป็นยีนเทียบการแสดงออกของยีนที่ศึกษาเพื่อประเมินประสิทธิภาพของการศึกษา mRNA expression[38] ซึ่งการแสดงออกของยีน *GADPH, Actin-β* และ *β2-M* มีความแตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อและมีการตอบสนองที่ต่างกันในแต่ละสภาวะการทดลอง[37,38] โดยในเม็ดเลือดขาวพบว่ายีน *β2-M* มีการแสดงออกมากกว่ายีน *GAPDH* และยีน *Actin-β* ตามลำดับ[37] ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ housekeeping genes ทั้งสามชนิดเป็น internal control

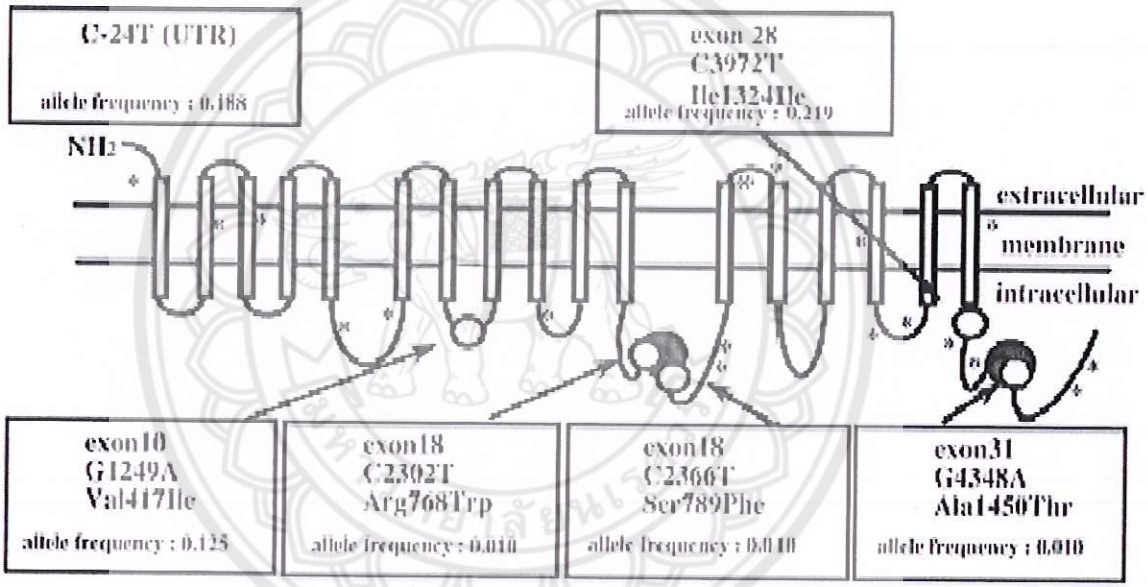
การศึกษา SNPs ของ *ABCC2*

ABCC2 มีความสำคัญต่อเภสัชจลนพลศาสตร์ ของยาต่าง ๆมากมาย ยากลุ่มต่างๆที่มี รายงานว่าเป็น substrate ของ ABCC2 นี้ เช่น ยาปฏิชีวนะ ขาเคมีบำบัด ยากดระบบภูมิคุ้มกัน ยากลุ่ม HIV protease inhibitors เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีส่วนสำคัญในการดื้อยาในการรักษามะเร็งบางชนิดด้วย[22,24,39-41] ซึ่งตำแหน่ง polymorphisms ที่สำคัญสำหรับ *ABCC2* นี้แสดงให้เห็นในตารางที่ 5

มีการศึกษา *ABCC2* SNPs ในกลุ่มประชากรญี่ปุ่น ดังรูปที่ 2 ซึ่งพบว่า C-24T (promoter) G1249A และ C3972 (exon 28) พบมากที่สุด ถึง ร้อยละ18.8 12.5 และ 21.9 ตามลำดับ[1] นอกจากนี้ มีเพียง1 คนเท่านั้น จาก อาสาสมัคร 48 คน ที่พบ C2302T, C2366T และ C4348A แบบผสม[1]

ตารางที่ 5 ลักษณะของยีน ABCC2 (โครโมโซม ที่ 10q24) และ ตำแหน่ง polymorphisms ที่สำคัญ[42]

Polymorphism	ตำแหน่ง	ผลที่เกิด
C-24T	5'-UTR	Unknown
C1249A	10	V417I
C2302T	18	R768W
C2366T	18	S789F
T2439+2C	18	Splice site
No data	26	W1254Y, A, C,F
C3972T	28	Silent
A4145G	29	Q1382R
G4348A	31	G1440S



รูปที่ 2 SNPs ของ *ABCC2* ที่พบในประชากรญี่ปุ่น (48 คน)[1]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษา MRP2 SNPs ในคนผิวขาวที่เป็นผู้ที่ได้รับการผูกถ่ายไต 95 คน[43] ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งพบว่า *ABCC2* haplotype ที่พบมากที่สุดคือ (-1549/-1023/-1019/-24/1249/3972/4544) G/G/A/C/G/C/G (ร้อยละ 25.3) และที่พบเป็นลำดับรองลงมาคือ haplotypes A/G/G/T/G/T/G และ G/A/A/C/G/C/G ร้อยละ 14.7 และ ร้อยละ12.6 ตามลำดับ

ดังข้างต้นจะเห็นได้ว่าประชากรญี่ปุ่น และ คนผิวขาวมีความแตกต่างกันของ *ABCC2* SNPs[1,43] ส่วนการศึกษาในการแสดงออกของ *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาวนั้นยังมีไม่มากนัก โดยอย่างยิ่งในประชากรไทย เมื่อไม่

นานมนี้มีการศึกษาถึงการ แสดงออกของยีน *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาวและพบว่ามี การแสดงออกของ ยีน *ABCC2* มีผลต่อการสะสมของยา saquinavir ในเม็ดเลือดขาว[44] แต่การศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ *ABCC2* SNPs และ การแสดงออกของ ยีน *ABCC2* นี้ในเม็ดเลือดขาวยังไม่มีการศึกษา

ตารางที่ 6 แสดง ความถี่ของ MRP2 SNPs ในคนผิวขาวที่ได้รับการปลูกถ่ายไต (95 คน)[43]

ตำแหน่ง	SNP	จำนวนคนที่พบ (n=95)	ความถี่ของ genotype (ร้อยละ)	Allele	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน	ความถีของ Allele (ร้อยละ)
1549	G/G	39	41.1	G	-	62.1
1549	G/A	40	42.1	A	-	37.9
1549	A/A	16	16.8		-	
1023	G/G	72	75.8	G	-	86.8
1023	G/A	21	22.1	A	-	13.2
1023	A/A	2	2.1		-	
1019	A/A	30	31.6	A	-	56.8
1019	A/G	48	50.5	G	-	43.2
1019	G/G	17	17.9		-	
24	C/C	54	56.8	C	-	76.8
24	C/T	38	40.0	T	-	23.2
24	T/T	3	3.2		-	
1249	G/G	65	68.4	G	Val	83.2
1249	G/A	28	29.5	A	Ile	16.8
1249	A/A	2	2.1		-	
3972	C/C	46	48.4	C	Ile	67.9
3972	C/T	37	38.9	T	Ile	32.1
3972	T/T	12	12.6		-	
4544	G/G	78	82.1	G	Cys	90.5
4544	G/A	16	16.8	A	Tyr	9.47
4544	A/A	1	1.1		-	

บทที่ 3
กลุ่มตัวอย่าง และการเก็บตัวอย่าง

สถานที่ทำการศึกษา

คณะเภสัชศาตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

ประชากรและตัวอย่าง

1) ประชากร

ประชากรเป้าหมาย : หญิงและชายไทยสุขภาพดีอายุระหว่าง 18-30 ปี จำนวน 109 คน

2) ตัวอย่าง

- กรอบตัวอย่าง : นิสิตหรือบุคลากรในมหาวิทยาลัยนเรศวร
- วิธีการสุ่มตัวอย่าง : ตัวอย่างจะถูกคัดเลือกเข้าตามความสมัครใจไม่มีการสุ่มตัวอย่าง
- การคำนวณขนาดตัวอย่าง : จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการแสดงออกของยีน พบว่าเมื่อใช้ตัวอย่างจำนวนอย่างน้อย 14 คนจะทำให้มี power ของการศึกษามากกว่าหรือเท่ากับ 80%[45]

เกณฑ์การคัดเข้า

เกณฑ์การคัดเข้า : อาสาสมัครสุขภาพดีอายุระหว่าง 18-30 ปีไม่ใช้ยาสำหรับโรคประจำตัวหรือโรคเรื้อรัง ไม่ดื่มสุราไม่สูบบุหรี่ก่อนเข้าร่วมการวิจัย 72 ชั่วโมง

เกณฑ์การคัดออก

- มีปัญหาด้านสุขภาพ เช่น เจ็บป่วย, ได้รับบาดเจ็บ ก่อนวันที่จะเก็บตัวอย่างเลือด
- ตัวอย่างเลือดไม่สามารถนำไปสกัดเพื่อทำการวิจัยต่อได้ เช่น มีไขมันมากเกินไป

การพิจารณาด้านจริยธรรมในมนุษย์

งานวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์และได้รับอนุมัติโดยคณะกรรมการจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรซึ่งก่อนเข้าร่วมการศึกษาอาสาสมัครทุกรายจะได้รับเอกสารแสดงความยินยอมในการเข้าร่วมวิจัย (consent form) และรายละเอียดการเข้าร่วมวิจัย (information form) อย่างชัดเจนก่อนเข้าร่วมการศึกษา โดยการศึกษานี้อาสาสมัครไม่ได้รับการให้ intervention ใดๆ และผู้วิจัยทราบข้อมูลการรักษาอื่นๆของอาสาสมัคร อาสาสมัครแต่ละรายจะมีรหัสเฉพาะเป็นความลับ และไม่มีการเปิดเผยข้อมูลส่วนตัวของอาสาสมัครต่อสาธารณะ รวมทั้งรายชื่ออาสาสมัครที่ระบุบนตัวอย่างใดๆ จะถูกนำออกก่อนส่งให้ผู้วิจัย และอาสาสมัครแต่ละรายจะได้รับค่าตอบแทนเป็นเงินสดจำนวน 500 บาท

ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดแบ่งเป็น 2 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ตรวจคัดกรองอาสาสมัครเพื่อเข้าร่วมการศึกษามีขั้นตอนดังนี้

1. อาสาสมัครทั้งหมดจะได้รับการตรวจคัดกรองสุขภาพและตรวจทางห้องปฏิบัติการที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร
2. แบบบันทึกข้อมูลอาสาสมัครจะประกอบด้วยข้อมูลพื้นฐาน เช่น น้ำหนัก ส่วนสูง วันเดือนปีเกิด และผลตรวจร่างกาย เช่น ความดันโลหิต สัญญาณชีพ และอัตราการเต้นของหัวใจ เป็นต้น
3. กระบวนการตรวจทางห้องปฏิบัติการอาสาสมัครแต่ละคนจะถูกเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 9 มิลลิลิตร เพื่อตรวจผลทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ระดับ sodium, potassium, chloride, bicarbonate, glucose, blood urea nitrogen, serum creatinine, alanine aminotransferase (ALT),

aspartate aminotranferase (AST), completed blood cell count (CBC; WBC w/diff, RBC, Hgb, Hct, Plt)

<u>ครั้งที่ 2</u> การเก็บตัวอย่างเลือด

1. อาสาสมัครที่ผลตรวจการคัดกรองผ่านจะถูกนำมาเข้าร่วมการศึกษาต่อไป อาสาสมัครสุขภาพดีที่ผ่านการคัดเลือกเข้าสู่การศึกษาจะถูกเก็บตัวอย่างเลือด ณ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร โดยแนะนำให้อดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมงก่อนเก็บตัวอย่างเลือด

2. การเก็บตัวอย่างเลือดประกอบด้วย

- 5 mL in EDTA tube
- 16 mL in BD Vacutainer® CPT™ (cell preparation tube) with sodium citrate

บทที่ 4
Single nucleotide polymorphisms ของยีน *ABCC2*

การแยกสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร

อาสาสมัครจะถูกเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำ เพื่อใช้ในการทดลอง เพื่อหา ชนิดของ SNP ของยีน *ABCC2* โดยจะเน้น SNP ที่ Nucleotide A1549G, G1023A, A1019G, C24T, G1249A, C3972T และ G4544A

เลือดจากอาสาสมัครถูกเก็บไว้ใน cryovial ที่ อุณหภูมิ -70 ºC จนกว่าจะทำการแยกสกัดจาก DNA โดยการแยกสกัด DNA ใช้ชุดแยกสกัดของ QIAamp DNA Blood Mini Kits

ขั้นตอนการวิเคราะห์ single nucleotide polymorphism ของ MRP2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยการทำ DHPLC

1. วัดความเข้มข้นของ DNA ในแต่ละตัวอย่าง

2. ทำ multiplex PCR สำหรับใช้ตรวจสอบ SNPs แต่ละตำแหน่ง โดยจะมีทั้งหมด 7 ตำแหน่ง SNPs ซึ่งใช้ primer ทั้งหมด 6 คู่ primer เพื่อ amplified PCR product ในการทำ multiplex PCR จะใช้ immolase DNA polymerase จากขั้นตอนนี้ในแต่ละตัวอย่างจะได้ PCR product ที่มีขนาด 90, 120, 142, 164, 211 และ 250 bp รวมเป็น 6 ขนาด

3. การทำ PCR product ให้ บริสุทธิ์โดยการใช้ exonuclease (Exo) ซึ่งจะทำหน้าที่ทำลาย primer และ shrimp alkaline phosphatase (SAP) จะช่วยทำลาย dNTPs ที่เหลือหลังจากการทำ PCR

4. การทำ single base extension (SBE) ทำได้โดยใช้ ddNTP ร่วมกับ enzyme terminator เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ SNPs แต่ละตำแหน่งด้วยเครื่อง DHPLC โดยจะใช้ primers 7 เส้น ที่จำเพาะเจาะจงกับแต่ละ SNPs

5. จากนั้นวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) ซึ่งหลักการทำงานโดยใช้คุณสมบัติการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่าน column เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อระบุเบสของ SNPs แต่ละตำแหน่งโดยดู peak ที่ได้จากเครื่อง DHPLC โดยเปรียบเทียบระหว่าง blank และตัวอย่าง พร้อมทั้งดูแนวโน้มของแต่ละตัวอย่างประกอบกัน

6. สุ่มตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของ peak แต่ละแบบมาทำการหาลำดับเบสของ DNA เพื่อเป็นการยืนยันการแปลผลจาก peak ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DHPLC

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้

ลำดับที่	สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต/จัดจำหน่าย
1	QIAamp DNA Blood Mini Kits	QIAGEN®,Valencia, CA/PrimaThailand
2	Immolase DNA polymerase	BIOLINE, AUSTRALIA/Life science AP
3	Primers for multiplex PCR	Pacific science
4	10X Immo buffer	BIOLINE, AUSTRALIA/Life science AP
5	MgCl2	BIOLINE, AUSTRALIA/Life science AP
6	dNTPs	Promega/DKSH
7	ExoSAP (Exonuclease (Exo) และ shrimp alkaline phosphatase (SAP))	usb®/Bionoetikos
8	Therminator DNA polymerase	New England BioLabs/Theera trading

ตารางที่ 8 เครื่องมือที่ใช้

ลำดับที่	อุปกรณ์	บริษัทผู้จำหน่าย
1	NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer	NanoDrop® Technologies,USA/Becthai
2	PCR Applied Biosystems รุ่น Veriti™ Thermal Cycler	Applied Biosystems / Gene Plus
3	DHPLC	Transgenomics/Uropecontinant
4	Sequencer Applied Biosystems3130 xL (Genetics Analyzer)	Applied Biosystems / Gene Plus

ตารางที่ 9 Primers แต่ละคู่สำหรับการทำ multiplex PCR สำหรับ SNPs ต่าง ๆ

Primer	Base	rs number	SNPs	Exon	PCR product length
1.1 1.2	F: TACAAAAGGTTGGGTCAGGT R: CACTATGTTGCCCAGGCT	rs2804402 rs7910642,	1019 A>G 1023 G>A	Exon 32	120 bp
1.3	F: TCTGTTCAAGTCCTTTGCC R: CAGCATTCAGTGTGGGAG	rs1885301	1549 G>A (-139-1410 A>G)	Exon 32	142 bp
1.4	F: GTTCCACTTTCTTTGATGAAAC R: AGCCTGAGCTTTAGACCAAT	rs717620	-24 C>T	5'UTR	250 bp
2.1	F: CCCTAGTATCCTTGGCTTTG R: CATGTGCATGAAGTTGGTC	rs2273697	1249G>A (21214 A>G)	Exon 10	164 bp
2.2	F: GGCAAGATCCAGTTTAACAAC R: TGACCCTTTCCCTCCAT	rs3740066	61606 A>G (เปลี่ยนจาก 3772C>T)	Exon 28	211 bp
2.3	F: CTTTCTTCCTTGTTTCAGGG R: GGTCCAGGGATTTGTAGC	rs8187710	c.4544 G>A (686933A>G)	Exon 32	90 bp

ตารางที่ 10 Primers สำหรับการทำ single base extension สำหรับ SNPs ต่าง ๆ

Primer	Base	SNPs	Exon	Code
1	TTT TgC CCT TTg ggA ggC CAA g	-1019 A>G		SBE1.1
2	Tgg gAg gCC AAg gCA g	-1023 G>A		SBE1.2
3	TTT TgT ATg AgT TCC TTA TAg TAT	-1549 G>A		SBE1.3
4	TTT TTT TTT AgT ATA ATT ATC TTC TCA gAA	-24 C>T	5'UTR	SBE1.4
5	CAg gAA ggA gTA CAC C	21214 A>G	Exon 10	SBE2.1
6	TTT Agg gAT CAC TTg TgA CAT	61606 A>G	Exon 28	SBE2.2
7	TTT TTT TCA ACg ggA AgA TTA TAg AgT	686933A>G	Exon 32	SBE2.3

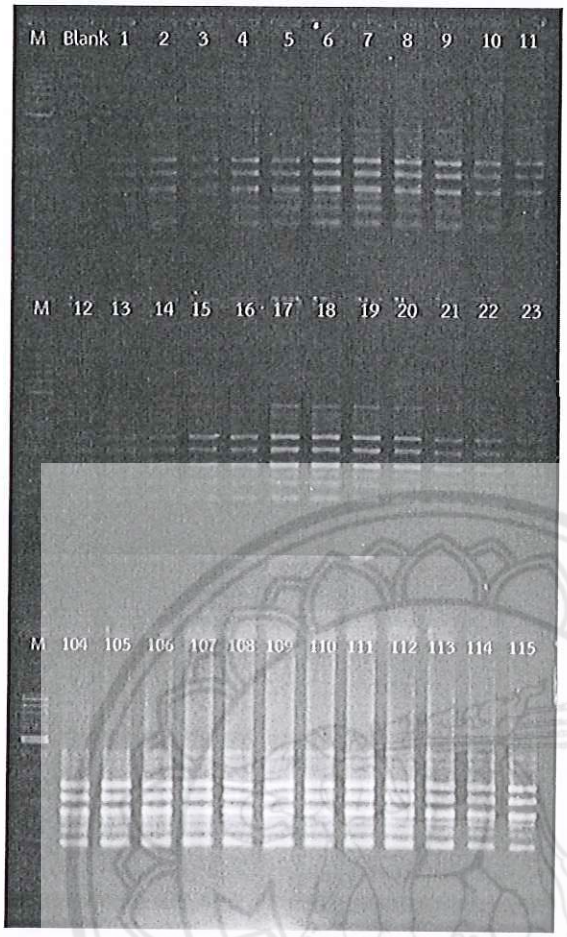
นำตัวอย่าง DNA_การวิเคราะห์โดยใช้ denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) เพื่อตรวจหา SNPs ในยีน ABCC2 ที่ทำการศึกษา การจัดเรียงตัวของยีนใช้หาโดยวิธี multiplex PCR จาก gDNA วิเคราะห์ร่วมกับการวิเคราะห์เบสของ SNPs แต่ละตำแหน่งด้วยเครื่อง DHPLC โดยจากทั้งหมด 7 SNPs ที่เลือกมาวิเคราะห์ พบว่ามี 6 SNPs ได้แก่ตำแหน่ง code ที่ 1.1, 1.2, 1.3, 2.1, 2.2 และ 2.4 มี peak ที่มีลักษณะที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง หรือ มี SNPs polymorphism cและเมื่อนำไปทำ sequencing พบว่าให้ผลที่ตรงกับ ตรงกับการทำ DHPLC แต่สำหรับ SNPs ที่ 1.4 มี มี peak ที่มีลักษณะเหมือนกันทั้งหมด และเมื่อนำไปยืนยันด้วย sequencing พบว่าให้ผลที่แตกต่างจากการทำ DHPLC ที่ แสดงให้เห็นว่าวิธีการ DHPLC อาจไม่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ SNPs ตำแหน่งนี้ ดังนั้นผลการศึกษานี้จึงสรุปผลสำหรับ 6 SNPs ที่สามารถวัดได้ด้วยวิธี DHPLC

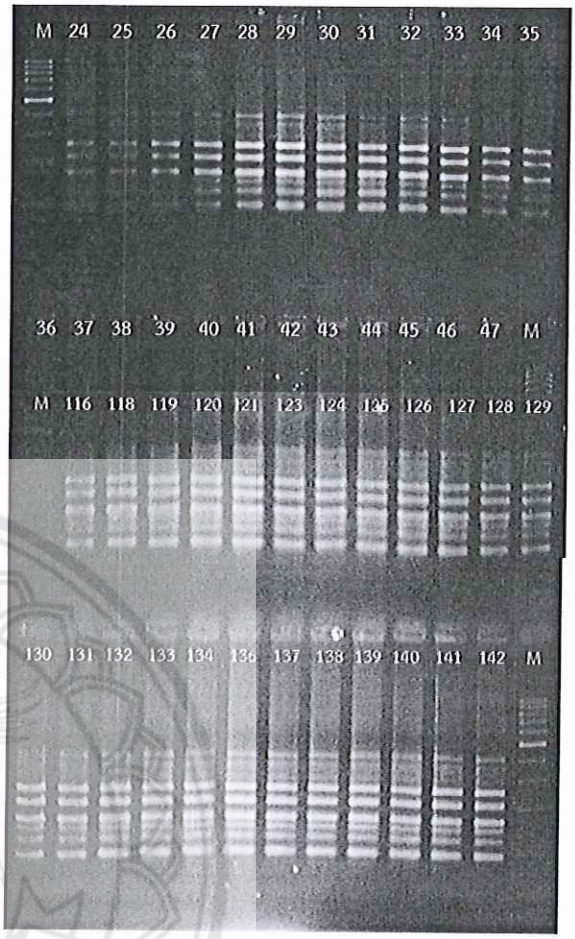
การทำ multiplex PCR

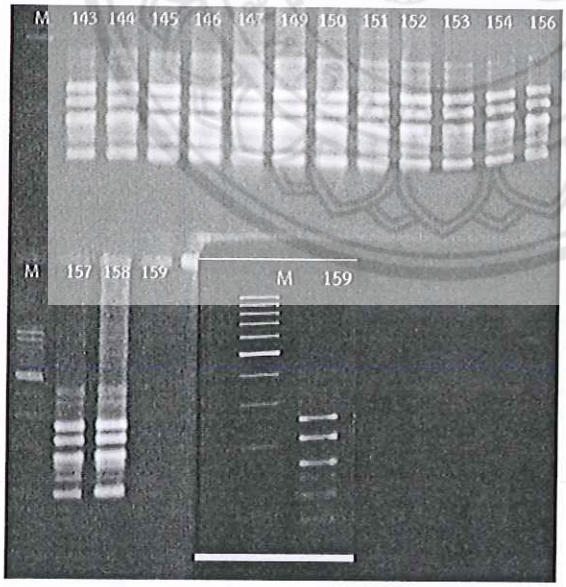
ตารางที่ 11 สารที่ใช้ในการทำ multiplex PCR

สารเคมี	ปริมาตรที่ใช้
10X Immo buffer	2.50 ul
50 mM MgCl2	1.25 ul
10 mM dNTPs	0.50 ul
10 pmole/ul 1.ABCC2 90 bp Forward	0.80 ul
2.ABCC2 90 bp Reverse	0.80 ul
3.ABCC2 120 bp Forward	0.50 ul
4.ABCC2 120 bp Reverse	0.50 ul
5.ABCC2 142 bp Forward	0.80 ul
6.ABCC2 142 bp Reverse	0.80 ul
7.ABCC2 164 bp Forward	0.50 ul
8.ABCC2 164 bp Reverse	0.50 ul
9.ABCC2 211 bp Forward	0.50 ul
10.ABCC2 211 bp Reverse	0.50 ul
11.ABCC2 250 bp Forward	0.50 ul
12.ABCC2 250 bp Reverse	0.50 ul
5U/ul Immolase DNA polymerase	0.10 ul
Milli-Q water	9.45 ul
25 ng/ul DNA sample	4.00 ul
Total volume	25.00 ul

Gel Picture







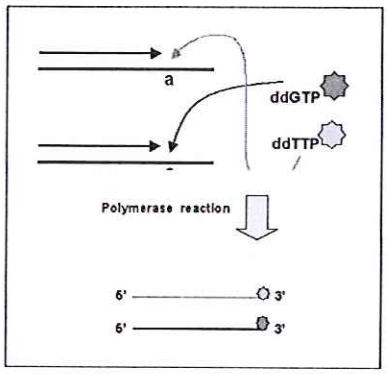
แต่ละตัวอย่างจะต้องมี PCR product ทั้งหมด 6 size ประกอบด้วย 90, 120, 142, 164, 211 และ 250 bp ดังภาพ ซึ่งพบว่ามีตัวอย่างหมายเลข 159 ไม่มี PCR product เกิดขึ้นจึงทำซ้ำตัวอย่าง 159 ทำจนได้ผลที่ดีครบทุกตัวอย่างจึงเริ่มทำการทดลองต่อไป

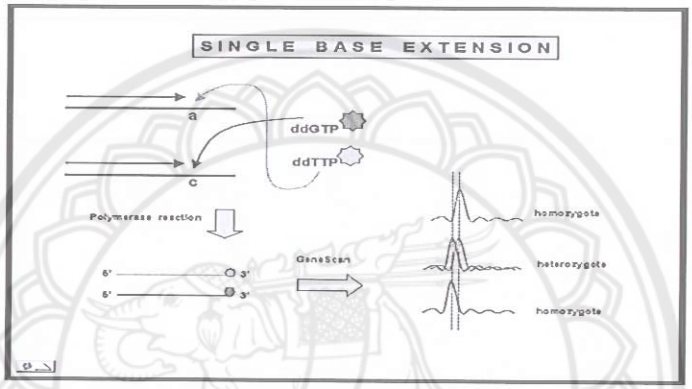
PCR product ที่ได้จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อกำจัด non specific bands ต่อไป เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการทำ SBE และ DHPLC ต่อไป

รูปที่ 3 PCR product **หลังจากการทำ** multiplex PCR **โดยการใช้เทคนิค** 2.5% agarose gel electrophoresis

การทำ Single Base Extension (SBE)

โดยแบ่งเป็น 2 set โดย set ที่ 1 จะเป็น primers ของ SNPs ที่ 1-4 และ set ที่ 2 จะเป็น primers ของ SNPs 5-7





รูปที่ 4 หลักการการทำ single base extension

ตารางที่ 12 สารที่ใช้ในการทำ single base extension set ที่ 1

Reagent Set 1

สารเคมี	ปริมาตร
10X PCR buffer	2.00 ul
1 mM ddNTPs	1.00 ul
2 U/ul Terminator	0.25 ul
10 pmole/ul SBE primer 1.1	0.50 ul
10 pmole/ul SBE primer 1.2	0.50 ul
10 pmole/ul SBE primer 1.3	0.50 ul
10 pmole/ul SBE primer 1.4	0.50 ul
DI water	9.75 ul
Multiplex PCR product	5.00 ul
Total	20.00 ul

ตารางที่ 13 สารที่ใช้ในการทำ single base extension set ที่ 2

Reagent Set 2

สารที่ใช้	ปริมาตร
10X PCR buffer	2.00 ul
1 mM ddNTPs	1.00 ul
2 U/ul Terminator	0.25 ul
10 pmole/ul SBE primer 2.1	1.00 ul
10 pmole/ul SBE primer 2.2	0.50 ul
10 pmole/ul SBE primer 2.3	0.30 ul
DI water	9.95 ul
Multiplex PCR product	5.00 ul
Total	20.00 ul

Condition

1 cycle	96 C	1 min
60 cycles	96 C	15 sec
	43 C	15 sec
	60 C	45 sec
1 cycle	96 C	1 min
	Store	4 C

การทำ DNA sequencing

ตารางที่ 14 สารที่ใช้ในการทำ DNA sequencing

สารที่ใช้	ปริมาตร
Big Dye V 3.1	0.20 ul
5X Sequencing buffer	2.00 ul
5X Betaine solution	1.00 ul
5X Q solution	1.00 ul
10 pmole/ul Primer	0.30 ul
Milli-Q water	5.50 ul
PCR product	0.20 ul
Total volume	10.20 ul

Condition

1 cycle	96 °C	2 mins
35 cycles	96 °C	10 secs
	58 °C	5 secs
	60 °C	2 mins
Store	15 °C	

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูล SNPs ของอาสาสมัคร จะถูกทดสอบการกระจายตัวว่าอยู่ในสมดุลของ Hardy-Weinberg equilibrium หรือไม่ โดยการใช้ Chi-squares

การคำนวณความถี่ของ genotypes สำหรับ SNPs ที่มี 2 alleles

$P^2 + q^2 + 2pq = 1$

การคำนวณความถี่ของ genotypes สำหรับ SNPs ที่มี 3 alleles

$P^2 + q^2 + 2pq + 2qr + 2pr = 1$

โดยที่

p คือ ความถี่ของ allele A
q คือ ความถี่ของ allele B
r คือ ความถี่ของ allele C

ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

วัตถุประสงค์ตอนแรกคือต้องการหาความถี่ของ SNPs ที่ตำแหน่ง 1549G>A, 1023G>A, 1019A>G, 24C>T, 1249G>A, 3972C>T และ 4544G>A แต่เมื่อได้ทำหาวิเคราะห์ด้วย DHPLC พบว่า การวิเคราะห์ SNPs ที่ตำแหน่ง , 24C>T และ 3972C>T ไม่สามารถวเราะห์ด้วยวิธีดังกล่าวได้เนื่องจากให้ผลไม่ตรงกับการทำ sequencing จึงต้องมีการ validate วิธีใหม่ หรืออาจต้องหาวิธีการตรวจวัด 2 SNPs นี้ ใหม่ในอนาคต และสำหรับ SNPs ที่เหลือ สามารถตรวจวัดโดยวิธี DHPLC ได้ นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังได้ตรวจวัดเพิ่มอีก 1 SNPs คือ 61606 A<G ผลแสดงความถี่ของ genotypes ในแต่ละ SNPs ที่ทำการตรวจวัด ดังแสดงในตารางที่ 15

จากผลการศึกษาพบว่า SNPs ทั้ง 6 ที่มีการตรวจวัดนั้นส่วนใหญ่อยู่ในภาวะสมดุล Hardy-Weinberg Equilibrium แต่มี 2 SNPs ได้แก่ 1249G>A และ 4544 G>A ไม่อยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg Equilibrium ซึ่งสาเหตุที่ 2 SNPs นี้ไม่อยู่ในสมดุล ดังกล่าวอาจมีหลายสาเหตุที่เป็นไปได้ เช่น มีการสืบพันธุ์ในกลุ่มเครือญาติ (inbreeding) ซึ่งก่อให้เกิด homozygosity หรือการคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างยังมีไม่กระจายตัวที่เหมาะสม การเกิด mutation จำนวนประชากรน้อยเกิน[60] แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยกวนเหล่านี้เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ผลที่ได้จากการศึกษาเป็นผลที่เกิดขึ้นในความเป็นจริง ซึ่งอาจพบทั้งยนที่อยู่ในภาวะสมดุล และไม่อยู่ในภาวะสมดุลHardy-Weinberg Equilibrium

ตารางที่ 15 ความถี่ของ genotype ของ SNPs ของยีน ABCC2

SNPs		Frequency					p-value*
		GG (%)	GA (%)	AA (%)	G allele (%)	A allele (%)	
1.1 1019 A>G (N=109)	Number of subjects	63	43	3	169 (77.52)	49 (22.48)	>0.05
	Expected value	65.51 (60.1)	37.99 (34.85)	5.51 (5.05)			
1.2 1023 G>A (N=109)	Number of subjects	60	14	35	134 (87.01)	20 (12.99)	>0.05
	Expected value	58.3 (75.71)	17.4 (22.6)	1.3 (1.69)			
1.3	Number of	58	42	9	158	60 (27.52)	>0.05

SNPs		Frequency					p-value*
		GG (%)	GA (%)	AA (%)	G allele (%)	A allele (%)	
1549 G>A (-139-1410 A>G) (N=109)	subjects				(72.48)		
	Expected value	57.26 (52.53)	43.49 (39.9)	8.26 (7.58)			
2.1 1249G>A (21214 A>G) (N=108)	Number of subjects	67	9	32	143 (66.2)	73 (33.8)	0.001
	Expected value	47.34 (43.83)	48.33 (44.75)	12.34 (11.42)			
2.2 61606 A>G (N=109)	Number of subjects	62	41	6	165 (75.69)	53 (24.31)	>0.05
	Expected value	62.44 (57.29)	40.11 (36.8)	6.44 (5.91)			
2.3 c.4544 G>A (686933A>G) (N=109)	Number of subjects	72	1	36	145 (66.51)	73 (33.49)	0.001
	Expected value	48.22 (44.24)	48.56 (44.55)	12.22 (11.21)			

*p value of HWD test using Chi's square

จากการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่าง SNps ของ ยีน ABCC2 พบว่า SNP1.1 และ 1.2 มีแนวโน้มสัมพันธ์กับ SNPs 1.3 และ 2.2 นอกจากนี้ SNPs 1.3 ยังมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ กับ SNPs 2.2 และ SNPs 2.1 มีความสัมพันธ์กับ SNPs 2.3 อย่างมีนัยสำคัญ เช่นกัน (ตารางที่ 16) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า SNPs บาง SNPs อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องข้อง และอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนร่วมกัน หรือในการแสดงออกของ phenotype ใด ๆ อาจไม่ได้ขึ้นกับ SNPs เดียวของยีนนั้น ๆ ซึ่ง SNPs ที่ 1.3 และ 2.2 มีค่า r สูงถึง 0.71 ซึ่งแสดงว่า SNPs 2 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์กัน แม้ว่าจะอยู่คนละ exon และอกคู่หนึ่งที่มีค่า r สูง ได้แก่ 2.1 และ 2.3 ซึ่งมีค่า r=0.84 ซึ่งอยู่คนละ exon เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ของ ABCC2 โดย Speaarmam's test

		SNP1.1	SNP1.2	SNP1.3	SNP2.1	SNP2.2	SNP2.3
SNP1.1	Pearson Correlation	1	.023	-.337**	-.058	-.357**	-.068
	Sig. (2-tailed)		.814	.000	.549	.000	.484
	N	109	109	109	108	109	109
SNP1.2	Pearson Correlation	.023	1	-.225*	.139	-.251**	.170
	Sig. (2-tailed)	.814		.019	.152	.009	.077
	N	109	109	109	108	109	109
SNP1.3	Pearson Correlation	-.337**	-.225*	1	.095	.710**	.058

		SNP1.1	SNP1.2	SNP1.3	SNP2.1	SNP2.2	SNP2.3
	Sig. (2-tailed)	.000	.019		.330	.000	.549
	N	109	109	109	108	109	109
SNP2.1	Pearson Correlation	-.058	.139	.095	1	-.003	.837**
	Sig. (2-tailed)	.549	.152	.330		.979	.000
	N	108	108	108	108	108	108
SNP2.2	Pearson Correlation	-.357**	-.251**	.710**	-.003	1	-.024
	Sig. (2-tailed)	.000	.009	.000	.979		.802
	N	109	109	109	108	109	109
SNP2.3	Pearson Correlation	-.068	.170	.058	.837**	-.024	1
	Sig. (2-tailed)	.484	.077	.549	.000	.802	
	N	109	109	109	108	109	109

และเมื่อเปรียบเทียบ SNPs ที่พบในการศึกษานี้กับการศึกษาในคนผิวขาว[43] พบว่า SNPs 1.2 และ 1.3 ไม่ต่างกัน แต่สำหรับ SNPs ความถี่ของ A alelle ในการศึกษานี้ ต่ำกว่าคนผิวขาว[43] มากกว่าร้อยละ 50 และสำหรับ SNPs 2.1 และ 2.3 นั้น พบว่า ประชากรในการศึกษานี้ มี ความถี่ของ A allele สูงกว่าคนผิวขาว อย่างมีนัยสำคัญ[43]

SNPs 1.1, 1.2 และ 1.3 ในประชากรไทยยังไม่มีข้อมูล แต่จากการเปรียบเทียบความถี่ของ SNPs นี้ จาก SNP database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) นั้นโดยพิจารณาจาก Global minor allele frequency (MAF) พบว่า SNPs 1.1 ซึ่งมีความถี่ของ G = 0.357 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้ และสำหรับ SNPs 1.2 (A allele = 0.156) พบว่าไม่มีความแตกต่างจากประชากรในการศึกษานี้ และ SNPs 1.3 จาก SNP database มีความถี่ของ A allele (A allele = 0.384) สูงกว่าประชากรในการศึกษานี้

SNPs 2.1 ได้มีการศึกษาในหลายกลุ่มประชากร ดังแสดงในตารางที่ 17 และเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษานี้พบว่า มีความแตกต่างกัน โดยในการศึกษานี้พบความถี่ของ A allele สูงกว่าในประชากรที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ โดยเฉพาะเปรียบเทียบกับประชากรไทยในการศึกษา depression control ซึ่งหากพิจารณาแล้วประชากรในการศึกษาปัจจุบันนี้มีจำนวน sample size ที่น้อยกว่า และเมื่อทำการทดสอบภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg Equilibrium แล้วพบว่าไม่อยู่ในภาวะสมดุล ดังกล่าวซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุดังได้กล่าวไว้ข้างต้น

ตารางที่ 17 ความถี่ของ SNPs 2.1 จากการศึกษาต่าง ๆ จาก ฐานข้อมูล Thai SNPs

Source	Population	Sample size	Allele Freq	Genotype Freq
dbSNP	---	1874	G [0.810] / A [0.154]	---
JSNP	Japan	1480	G [0.866] / A [0.134]	---

Source	Population	Sample size	Allele Freq	Genotype Freq
HapMap	ASW	166	G [0.837] / A [0.163]	GG [0.711] / GA [0.253] / AA [0.036]
HapMap	CEU	330	G [0.767] / A [0.233]	GG [0.570] / GA [0.394] / AA [0.036]
HapMap	CHB	168	G [0.899] / A [0.101]	GG [0.810] / GA [0.179] / AA [0.012]
HapMap	CHD	170	G [0.871] / A [0.129]	GG [0.765] / GA [0.212] / AA [0.024]
HapMap	GIH	176	G [0.693] / A [0.307]	GG [0.523] / GA [0.341] / AA [0.136]
HapMap	JPT	172	G [0.872] / A [0.128]	GG [0.756] / GA [0.233] / AA [0.012]
HapMap	LWK	180	G [0.794] / A [0.206]	GG [0.611] / GA [0.367] / AA [0.022]
HapMap	MEX	154	G [0.870] / A [0.130]	GG [0.753] / GA [0.234] / AA [0.013]
HapMap	MKK	342	G [0.763] / A [0.237]	GG [0.602] / GA [0.322] / AA [0.076]
HapMap	TSI	176	G [0.801] / A [0.199]	GG [0.682] / GA [0.239] / AA [0.080]
HapMap	YRI	334	G [0.790] / A [0.210]	GG [0.617] / GA [0.347] / AA [0.036]
Depression Control	Thai	376	G [0.960] / A [0.040]	---

Population descriptors: Japan: From JSNP database, Thai: 32 Thais sample, Thailand.
HapMap: ASW: African ancestry in Southwest USA, **CEU:** Utah residents with Northern and Western European ancestry from the **CEPH collection, CHB:** Han Chinese in Beijing, China, **CHD:** Chinese in Metropolitan Denver, Colorado, **GIH:** Gujarati Indians in Houston, Texas, **JPT:** Japanese in Tokyo, Japan,**LWK:** Luhya in Webuye, Kenya, **MEX:** Mexican ancestry in Los Angeles, California, **MKK:** Maasai in Kinyawa, Kenya, **TSI:** Toscans in Italy, **YRI:** Yoruban in Ibadan, Nigeria.
PASNP: AX: Populations from Affymetrix, **CN:** China, **ID:** Indonesia, **IN:** India, **JP:** Japan, **KR:** Korea, **MY:** Malaysia, **PI:** Philippines, **SG:** Singapore, **TH:** Hill tribe in Thailand, **TW:** Taiwan.
(http://www4a.biotec.or.th/thaisnp2/Search)

ตารางที่ 18 ความถี่ของ SNPs 2.2 จากการศึกษาต่าง ๆ จาก ฐานข้อมูล Thai SNPs

Source	Population	Sample size	Allele Freq
dbSNP	---	896	A [0.297] / G [0.703]
JSNP	Japan	1246	G [0.770] / A [0.230]

จากฐานข้อมูลของ SNPs ในประเทศไทยพบว่ายังไม่เคยมีการศึกษาถึงความถี่ของ SNPs มาก่อน แต่เมื่อเปรียนยบเทียบความถี่จากข้อมูลจาก SNPs database และ ของประชากรญี่ปุ่น (ตารางที่ 18) พบว่า ความถี่ของ SNPs 2.2 ไม่มีความแตกต่างกันกับ ฐานข้อมูลดังกล่าว

เมื่อพิจารณาถึงความถี่ของ SNPs 2.3 พบว่าผลการศึกษาของผู้วิจัยมีความแตกต่างจากการศึกษาต่าง ๆ ก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 19) โดยผลการศึกษาในครั้งนี้พบความถี่ของ A allele สูงกว่าการศึกษาอื่น ๆ มาก แม้ในประชากรไทยก็มีความแตกต่างกันมาก แต่อย่างไรก็ตามอาจเป็นเพราะ จำนวนประชากรที่ศึกษาในการศึกษานี้มีจำนวนน้อย หรืออาจเป็นเพราะอาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจมีผลให้ความถี่ของ SNPs นี้เปลี่ยนไป

ตารางที่ 19 ความถี่ของ SNPs 2.3 จากการศึกษาต่าง ๆ จาก ฐานข้อมูล Thai SNPs

Source	Population	Sample size	Allele Freq	Genotype Freq
dbSNP	---	1042	A [0.057] / G [0.943]	---
HapMap	ASW	166	G [0.855] / A [0.145]	GG [0.747] / GA [0.217] / AA [0.036]
HapMap	CEU	330	G [0.933] / A [0.067]	GG [0.867] / GA [0.133] / AA [0.000]
HapMap	CHB	90	G [1.000] / A [0.000]	GG [1.000] / GA [0.000] / AA [0.000]
HapMap	GIH	176	G [0.989] / A [0.011]	GG [0.977] / GA [0.023] / AA [0.000]
HapMap	JPT	90	G [1.000] / A [0.000]	GG [1.000] / GA [0.000] / AA [0.000]
HapMap	LWK	180	G [0.789] / A [0.211]	GG [0.611] / GA [0.356] / AA [0.033]
HapMap	MEX	152	G [0.934] / A [0.066]	GG [0.868] / GA [0.132] / AA [0.000]
HapMap	MKK	342	G [0.863] / A [0.137]	GG [0.749] / GA [0.228] / AA [0.023]
HapMap	TSI	176	G [0.892] / A [0.108]	GG [0.784] / GA [0.216] / AA [0.000]
HapMap	YRI	332	G [0.870] / A [0.130]	GG [0.747] / GA [0.247] / AA [0.006]
Depression Control	Thai	376	G [0.997] / A [0.003]	---

Population descriptors: Japan: From JSNP database, Thai: 32 Thais sample, Thailand.
HapMap: ASW: African ancestry in Southwest USA, CEU: Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection, CHB: Han Chinese in Beijing, China, CHD: Chinese in Metropolitan Denver, Colorado, GIH: Gujarati Indians in Houston, Texas, JPT: Japanese in Tokyo, Japan,LWK: Luhya in Webuye, Kenya, MEX: Mexican ancestry in Los Angeles, California, MKK: Maasai in Kinyawa, Kenya, TSI: Toscans in Italy, YRI: Yoruban in Ibadan, Nigeria.
PASNP: AX: Populations from Affymetrix, CN: China, ID: Indonesia, IN: India, JP: Japan, KR: Korea, MY: Malaysia, PI: Philippines, SG: Singapore, TH: Hill tribe in Thailand, TW: Taiwan.
(http://www4a.biotec.or.th/thaisnp2/Search)

บทที่ 5
กรแสดงออกของยีน *ABCC2* ในม็ดเลือดขาว

การแยกสกัด Total RNA และการสังเคราะห์ cDNA สายแรก

- Total RNA ถูกแยกสกัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMCs) ปริมาตร 800 µL โดยใช้วิธีการตามข้อกำหนดของบริษัทผู้จำหน่าย (Qiagen®,Valencia, CA)
- ตัวอย่าง RNA ทั้งหมดถูกสกัดด้วยสารละลายที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาตร 50 µL
- หาความเข้มข้นของ total RNA และตรวจวัดความบริสุทธิ์ของตัวอย่างด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop® Technologies, USA)
- ตัวอย่าง RNA ที่ถูกแยกสกัดออกมา จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาทำการวิเคราะห์
- กระบวนการ reverse transcription ทำโดยใช้ชุดเครื่องมือ cDNA synthesis kits (Stratagene®,GERMANY) โดยใช้ total RNA ปริมาตร 100 ng และปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้จำหน่าย
- cDNA สายแรก ถูกสังเคราะห์ในปริมาตรรวมทั้งหมด 50 µL ซึ่งสารที่จำเป็นในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ประกอบไปด้วย 2X cDNA synthesis master mix ปริมาตร 10 µl, oligo (dT) primers 3 µl และ AffinityScript RT/RNase block enzyme mixture 1 µl
- ทำการ incubate ที่อุณหภูมิ 25 ℃ เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้ primers คลายตัว
- จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 42 ℃ นาน 45 นาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ cDNA และเร่งอุณหภูมิขึ้นเป็น 95 ℃ นาน 5 นาที จึงสิ้นสุดกระบวนการถอดรหัส
- หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว cDNA ที่ได้จะถูกนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 ℃ จนกว่าจะถูกนำออกมาวิเคราะห์

การแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยการใช้เทคนิค Real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time QPCR)

ปฏิกิริยา Real-time QPCR จะถูกทำโดยเครื่อง BIO-RAD iCycler® (BIO-RAD®, USA) การแสดงออกของยีนเป้าหมายแต่ละชนิดในเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMCs) ประกอบด้วย *ABCC2*, *GAPDH*, *Actin-β* และ *β2-M* ซึ่งการตรวจวัดจะใช้สารทำปฏิกิริยาปริมาตร 20 µl ที่ประกอบด้วย qPCR master mix 10 µl, forward primers 0.5 µl และ reverse primers 0.5 µl สำหรับ *ABCC2* และ housekeeping genes ทั้ง 3 ชนิด, cDNA 1 uL (undiluted), diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water 8 µl

ตารางที่ 20 สารเคมี

ลำดับที่	สารเคมี	บริษัทผู้จำหน่าย
1	QIAamp RNA Blood Mini Kits	QIAGEN®,Valencia, CA
2	cDNA synthesis kits	Stratagene®,GERMANY
3	EXPRESS SYBR®GreenER™ qPCR SuperMixes and Two-Step qRT-PCR Kits	Invitrogen®,USA
4	*GAPDH, Actin-βand β2-M*primers	Invitrogen®,USA
5	*ABCC2* primers for QPCR	Invitrogen®,USA

ว
GH
450
พ.ย.ธ
2557

1 6773839

1 2 มิ.ย. 2558

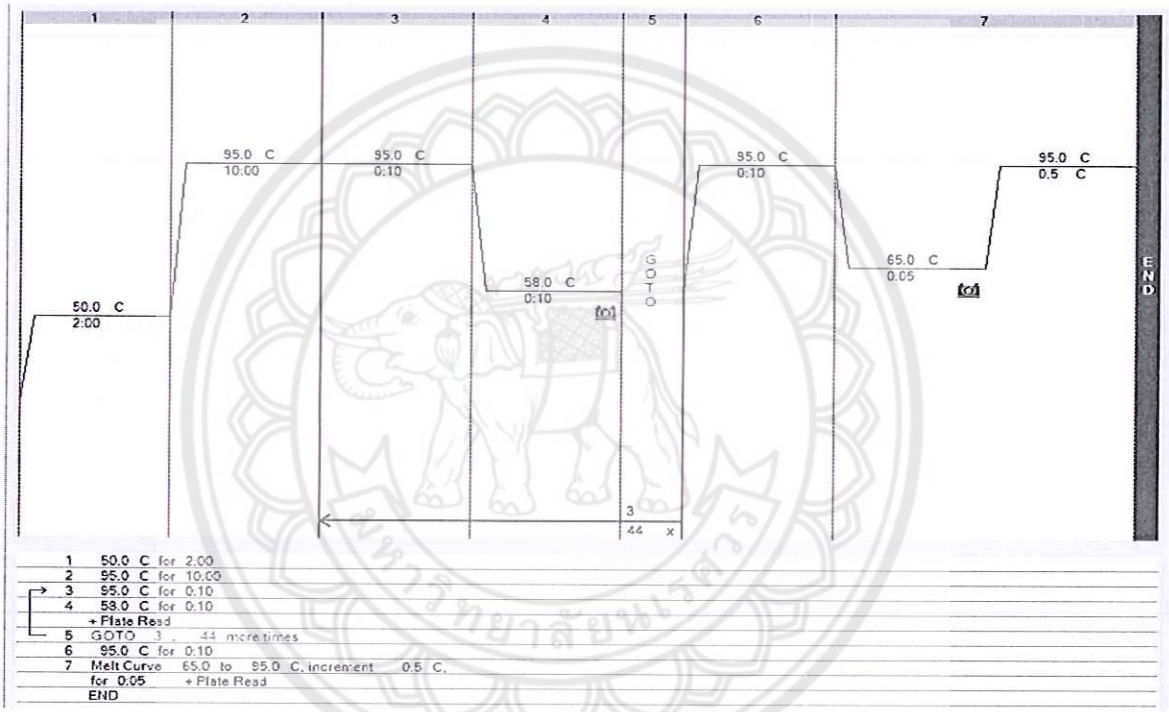
สำนักหอสมุด

ตารางที่ 21 วัสดุอุปกรณ์

ลำดับที่	อุปกรณ์	บริษัทผู้จำหน่าย
1	Bio-Rad iCycler®	BIO-RAD®USA
2	NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer	NanoDrop® Technologies,USA

การเพิ่มจำนวน cDNA ของยีน *ABCC2* โดยวิธี PCR with specific primers

เริ่มอุ่นเครื่องที่อุณหภูมิ 50 ℃ เป็นเวลา 2 นาที (UDG incubation) และปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นที่ขั้นตอน ความร้อนที่ 95 ℃ เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 95 ℃ ที่อุณหภูมิ 60 ℃ เป็นเวลา 10 วินาที โดยจะทำทั้งหมด 45 รอบ และจากนั้น เพิ่มอุณหภูมิเป็น 95 ℃ เป็นเวลา 10 วินาที และ melting curve analysis จะใช้อุณหภูมิ 60-95 ℃ และหลังจากรอบที่ 2 จะเพิ่มอุณหภูมิขึ้นรอบละ 0.5 ℃

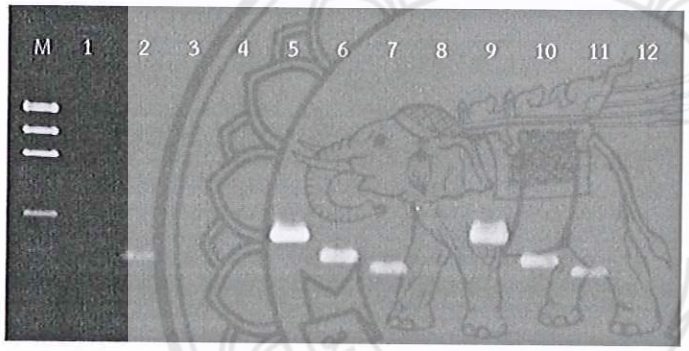


รูปที่ 5 กระบวนการเพิ่มจำนวน cDNA โดย real-time QPCR

ตารางที่ 22 Primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา Real-time QPCR

Gene	Sequence (5'-3')	Amplicon length (bp)
Actin-β	Forward; CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA	140
	Reverse; AAG GGA CTT CCT GTA ACA ATG CA	
GAPDH	Forward; TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC	87
	Reverse; GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG	
β2-M	Forward; CTC CGT GGC CTT AGC TGT G	69
	Reverse; TTT GGA GTA CGC TGG ATA GCC T	
ABCC2	Forward; ACATACAGGCCCTGAAGAGG	71
	Reverse; TCAGCCCATAGTCATCGTCT	

ผลผลิตจากปฏิกิริยาจะถูกเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20 °C จากนั้นจะนำผลผลิต PCR มาตรวจเช็คว่าเป็นยีนที่ต้องการหรือไม่ โดยใช้เทคนิค 2.5% agarose gel electrophoresis ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมาจากเครื่อง BIO-RADCFX96® (BIO-RAD®,USA)



Load 5 ul, 2.5% agarose gel
50 V 1 hr

M	EZ load
1	NTC/Actin
2	NTC/GAPDH
3	NTC/beta2M
4	NTC/ABCC2
5	106/Actin
6	106/GAPDH
7	106/beta2M
8	106/ABCC2
9	129/Actin
10	129/GAPDH
11	129/beta2M
12	129/ABCC2

รูปที่ 6 ขนาดของ PCR product หลังการทำ QPCR
โดยการใช้เทคนิค 2.5% agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีน *ABCC2*

ข้อมูลการแสดงออกของยีน *ABCC2* ได้จากเครื่อง BIO-RADCFX96 (BIO-RAD®, USA) การยืนยันข้อมูลความหลากหลายของการแสดงออกของยีนในตัวอย่างจะถูกทำให้น่าเชื่อถือโดยการใช้ endogenous controls อย่างน้อยหนึ่งชนิดในการทำการทดลอง ซึ่งการยืนยันการแสดงออกของยีนจะนำมาเทียบกับ housekeeping genes สามชนิด ได้แก่ beta-actin (*Actin-β*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) และ beta-2 microglobulin (*β2-M*)

วิธีการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนถูกนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบการถอดรหัส RNA (RNA transcription) ของยีน *ABCC2* ระหว่าง reference genes (housekeeping genes) กับ no-template control (NTC)

การประเมิน Housekeeping genes

การแสดงออกของยีน *ABCC2* มีความแปรปรวนระหว่างบุคคล เนื่องจากปริมาณ cDNA ที่ได้จากกระบวนการ reverse transcription อาจมีความเข้มข้นไม่เท่ากันในแต่ละตัวอย่างจึงต้องมีการนำการแสดงออกของยีน *ABCC2* มาเทียบกับ housekeeping gene(s) เพื่อลดความแปรปรวนของทำการทดลอง

ความคงตัว (Stability) ของการแสดงออกของ housekeeping genes ทั้ง 3 ชนิด ถูกตรวจสอบด้วยโปรแกรม Excel-based BestKeeper®[46] เพื่อค้นหายีนที่เหมาะสมในการเป็น endogenous controls เพื่อใช้ในการหาค่าการแสดงออกของยีน *ABCC2* โดยทำการป้อนข้อมูลค่า Ct ของ housekeeping gene(s) แต่ละประเภท (*GAPDH, Actin-β, β2-M*) และทำการจับกลุ่มยีนทั้ง 3 ชนิดดังนี้ *GAPDH+Actin-β, GAPDH+β2-M, Actin-β+β2-M* และ *GAPDH+Actin-β+β2-M* ซึ่งจะได้ endogenous controls ทั้งหมด 7 แบบ

ความคงตัวของ housekeeping gene(s) แต่ละประเภทอธิบายได้จากการมีค่า correlation coefficient (r) ต่อ Best-keeper index®[46] ที่สูงที่สุดและมีค่า standard deviation (S.D.) ของค่า Ct ใกล้เคียง 1

ผลการศึกษา และการอภิปราย

ผู้วิจัยทดสอบความคงตัวของการแสดงออกของ housekeeping genes 3 ชนิดซึ่งประกอบด้วยยีน *β2-M, Actin-β*และ *GAPDH* โดยใช้โปรแกรม BestKeeper®[46] จากตารางที่ 8 เมื่อพิจารณาการใช้ housekeeping gene(s) แต่ละประเภทแบบเดี่ยว พบว่ายีน *Actin-β* (r=0.968, S.D.=1.50) มีความคงตัวมากที่สุดเนื่องจากมีค่า correlation coefficient ต่อ Best-keeper index® มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีน *β2-M* (r=0.867, S.D.=1.89) และยีน *GAPDH* (r=0.865, S.D.=1.45) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน *GAPDH* มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *Actin-β* ค่อนข้างมาก (r=0.874, P=0.001) แต่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *β2-M* ในระดับปานกลาง (r=0.520, P=0.001) ส่วนการแสดงออกของยีน *Actin-β* พบว่ามีความสัมพันธ์ระดับปานกลางกับการแสดงออกของยีน *β2-M* (r=0.756, P=0.001) ดังแสดงในตารางที่ 9

เมื่อใช้ housekeeping genes มากกว่า 1 ชนิดในการทดสอบความคงตัวพบว่าค่า correlation coefficients ต่อ Best-keeper index® ของยีน 2 หรือ 3 ชนิด มีค่าเพิ่มมากขึ้น (r= 0.947-1.000; S.D. = 1.45-1.56 ; %C.V. = 5.85-6.38)ซึ่งพบว่ามีค่ามากกว่าการใช้ housekeeping gene เพียงชนิดเดียว ยกเว้นการใช้ *Actin-β* ซึ่งมี ค่า correlation coefficients ต่อ Best-keeper index® มากกว่าการใช้ GAPDH + *Actin-β* เป็น housekeeping genes

การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกเชิงปริมาณของ mRNA เทียบกับยีนที่สนใจศึกษาในแต่ละตัวอย่างจะใช้ housekeeping gene(s) เป็นตัวเทียบเพื่อยืนยันความถูกต้องของการทดลอง โดย housekeeping gene(s) ที่นิยมใช้กันมาก เช่น *GAPDH, Actin-β* และ *β2-M*

แม้จะไม่มีการศึกษาที่บ่งบอกว่า housekeeping gene(s) ตัวใดมีความเหมาะสมที่สุดแต่ก็มีการศึกษาของ Vandesompele และคณะ[37] ที่ทำการศึกษา housekeeping genes 10 ชนิดจากเนื้อเยื่อต่างๆของมนุษย์ ซึ่งผลการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวจาก 13 ตัวอย่าง พบว่าการแสดงออกของยีน *β2-M* มีความคงตัวมากกว่า *GAPDH* และ *Actin-β*ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้[47] ซึ่งทำการศึกษาในประชากรชาวไทยสุขภาพดีจำนวน 56 คนและคณะผู้วิจัยได้ศึกษาในประชากรกลุ่มเดียวกันนี้จำนวน 55 คน ซึ่งใช้วิธีการศึกษาเหมือนกันคือ real time RT-PCR โดยใช้ primers ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่แต่มีลำดับเบสเหมือนเดิมและเปลี่ยนเครื่องที่ใช้ในการทำ real time RT-PCR รวมถึงโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า Ct พบว่าผลการศึกษาที่ได้มีความสอดคล้องกันคือการแสดงออกของยีน *Actin-β* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความคงตัวมากที่สุดเมื่อ

การวิเคราะห์ข้อมูลการแสดงออกของยีน *ABCC2*

ข้อมูลการแสดงออกของยีน *ABCC2* ได้จากเครื่อง BIO-RADCFX96 (BIO-RAD®, USA) การยืนยันข้อมูลความหลากหลายของการแสดงออกของยีนในตัวอย่างจะถูกทำให้น่าเชื่อถือโดยการใช้ endogenous controls อย่างน้อยหนึ่งชนิดในการทำการทดลอง ซึ่งการยืนยันการแสดงออกของยีนจะนำมาเทียบกับ housekeeping genes สามชนิด ได้แก่ beta-actin (*Actin-β*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) และ beta-2 microglobulin (*β2-M*)

วิธีการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนถูกนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบการถอดรหัส RNA (RNA transcription) ของยีน *ABCC2* ระหว่าง reference genes (housekeeping genes) กับ no-template control (NTC)

การประเมิน Housekeeping genes

การแสดงออกของยีน *ABCC2* มีความแปรปรวนระหว่างบุคคล เนื่องจากปริมาณ cDNA ที่ได้จากกระบวนการ reverse transcription อาจมีความเข้มข้นไม่เท่ากันในแต่ละตัวอย่างจึงต้องมีการนำการแสดงออกของยีน *ABCC2* มาเทียบกับ housekeeping gene(s) เพื่อลดความแปรปรวนของทำการทดลอง

ความคงตัว (Stability) ของการแสดงออกของ housekeeping genes ทั้ง 3 ชนิด ถูกตรวจสอบด้วยโปรแกรม Excel-based BestKeeper®[46] เพื่อค้นหายีนที่เหมาะสมในการเป็น endogenous controls เพื่อใช้ในการหาค่าการแสดงออกของยีน *ABCC2* โดยทำการป้อนข้อมูลค่า Ct ของ housekeeping gene(s) แต่ละประเภท (*GAPDH, Actin-β, β2-M*) และทำการจับกลุ่มยีนทั้ง 3 ชนิดดังนี้ *GAPDH+Actin-β, GAPDH+β2-M, Actin-β+β2-M* และ *GAPDH+Actin-β+β2-M* ซึ่งจะได้ endogenous controls ทั้งหมด 7 แบบ

ความคงตัวของ housekeeping gene(s) แต่ละประเภทอธิบายได้จากการมีค่า correlation coefficient (r) ต่อ Best-keeper index®[46] ที่สูงที่สุดและมีค่า standard deviation (S.D.) ของค่า Ct ใกล้เคียง 1

ผลการศึกษา และการอภิปราย

ผู้วิจัยทดสอบความคงตัวของการแสดงออกของ housekeeping genes 3 ชนิดซึ่งประกอบด้วยยีน *β2-M, Actin-β*และ *GAPDH* โดยใช้โปรแกรม BestKeeper®[46] จากตารางที่ 8 เมื่อพิจารณาการใช้ housekeeping gene(s) แต่ละประเภทแบบเดี่ยว พบว่ายีน *Actin-β* (r=0.968, S.D.=1.50) มีความคงตัวมากที่สุดเนื่องจากมีค่า correlation coefficient ต่อ Best-keeper index® มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีน *β2-M* (r=0.867, S.D.=1.89) และยีน *GAPDH* (r=0.865, S.D.=1.45) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน *GAPDH* มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *Actin-β* ค่อนข้างมาก (r=0.874, P=0.001) แต่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน *β2-M* ในระดับปานกลาง (r=0.520, P=0.001) ส่วนการแสดงออกของยีน *Actin-β* พบว่ามีความสัมพันธ์ระดับปานกลางกับการแสดงออกของยีน *β2-M* (r=0.756, P=0.001) ดังแสดงในตารางที่ 9

เมื่อใช้ housekeeping genes มากกว่า 1 ชนิดในการทดสอบความคงตัวพบว่าค่า correlation coefficients ต่อ Best-keeper index® ของยีน 2 หรือ 3 ชนิด มีค่าเพิ่มมากขึ้น (r= 0.947-1.000; S.D. = 1.45-1.56 ; %C.V. = 5.85-6.38)ซึ่งพบว่ามีค่ามากกว่าการใช้ housekeeping gene เพียงชนิดเดียว ยกเว้นการใช้ *Actin-β* ซึ่งมี ค่า correlation coefficients ต่อ Best-keeper index® มากกว่าการใช้ GAPDH + *Actin-β* เป็น housekeeping genes

การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกเชิงปริมาณของ mRNA เทียบกับยีนที่สนใจศึกษาในแต่ละตัวอย่างจะใช้ housekeeping gene(s) เป็นตัวเทียบเพื่อยืนยันความถูกต้องของการทดลอง โดย housekeeping gene(s) ที่นิยมใช้กันมาก เช่น *GAPDH, Actin-β* และ *β2-M*

แม้จะไม่มีการศึกษาที่บ่งบอกว่า housekeeping gene(s) ตัวใดมีความเหมาะสมที่สุดแต่ก็มีการศึกษาของ Vandesompele และคณะ[37] ที่ทำการศึกษา housekeeping genes 10 ชนิดจากเนื้อเยื่อต่างๆของมนุษย์ ซึ่งผลการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวจาก 13 ตัวอย่าง พบว่าการแสดงออกของยีน *β2-M* มีความคงตัวมากกว่า *GAPDH* และ *Actin-β*ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้[47] ซึ่งทำการศึกษาในประชากรชาวไทยสุขภาพดีจำนวน 56 คนและคณะผู้วิจัยได้ศึกษาในประชากรกลุ่มเดียวกันนี้จำนวน 55 คน ซึ่งใช้วิธีการศึกษาเหมือนกันคือ real time RT-PCR โดยใช้ primers ที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่แต่มีลำดับเบสเหมือนเดิมและเปลี่ยนเครื่องที่ใช้ในการทำ real time RT-PCR รวมถึงโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า Ct พบว่าผลการศึกษาที่ได้มีความสอดคล้องกันคือการแสดงออกของยีน *Actin-β* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมีความคงตัวมากที่สุดเมื่อ

ตารางที่ 23 ความคงตัวของ housekeeping gene(s) แต่ละประเภทโดยโปรแกรม BestKeeper®[34]

N=55	*β2-M*	*GAPDH*	*Actin-β*	*β2-M +GAPDH*	*β2-M +Actin-β*	*GAPDH +Actin-β*	*β2-M +GAPDH +Actin-β*	*Best-Keeper® Index*
Geometric mean Ct	24.90	25.28	23.89	25.12	24.41	24.59	24.71	24.70
Arithmetic Ct	25.02	25.35	23.96	25.18	24.49	24.65	24.77	24.76
Min Ct	19.77	21.89	20.31	21.86	20.04	21.50	21.45	21.40
Max Ct	29.94	31.13	29.25	30.54	29.60	30.19	30.11	30.10
S.D.(±Ct)	1.89	1.45	1.50	1.56	1.56	1.45	1.45	1.45
C.V.(%)	7.55	5.72	6.26	6.38	6.38	5.88	5.85	5.87
Min [x-fold]								-
Max [x-fold]								-
S.D.[±x-fold]								-
Coeff.of corr. [r]*	0.867	0.865	0.968	0.991	0.972	0.947	1.00	-

Ct: Cycle threshold; Min: Minimum; Max: Maximum; S.D.: Standard deviation

C.V.: coefficient of variation; Coeff.ofcorr: coefficient of correlation

* the housekeeping gene(s) is correlated with the BestKeeper® Index determining by correlation coefficient test; p value=0.001

β2-M: Beta-2-microglobulin *GAPDH*: Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase *Actin-β*: Beta-actin

ตารางที่ 24 ค่า Pearson correlation coefficient (r) ระหว่าง housekeeping gene(s) โดยใช้โปรแกรม BestKeeper®[34]

Gene	*β2-M*	*GAPDH*	*Actin-β*	*β2-M +GAPDH*	*β2-M+ Actin-β*	*GAPDH + Actin-β*	*β2-M +GAPDH + Actin-β*
β2-M	-	-	-	-	-	-	-
GAPDH	0.520	-	-	-	-	-	-
Actin-β	0.756	0.874	-	-	-	-	-
β2-M+GAPDH	0.902	0.838	0.925	-	-	-	-
β2-M+Actin-β	0.951	0.722	0.921	0.973	-	-	-
GAPDH+Actin-β	0.660	0.968	0.968	0.911	0.849	-	-
β2-M+GAPDH+ Actin-β	0.868	0.865	0.967	0.991	0.972	0.946	-

Pearson correlation coefficient (r); p value=0.001

β2-M: Beta-2-microglobulin

GAPDH: Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase

Actin-β: Beta-actin

การคำนวณการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMCs) เทียบกับ housekeeping gene(s)

Comparative Ct method

การเทียบปริมาณ target gene (*ABCC2*) กับ endogenous controls คำนวณโดยใช้ค่า mean Ct จากการทดลอง 3 ซ้ำของแต่ละยีน

Housekeeping gene(s) ที่มีการแสดงออกคงตัวมากที่สุดจะถูกนำมาใช้เพื่อเป็นยีนเทียบการแสดงออกของยีน*ABCC2* ในเม็ดเลือดขาว เทียบกับ no-template control (NTC) โดยการแสดงออกของยีน *ABCC2* จะแสดงผลเป็นจำนวนเท่าเมื่อเทียบกับ NTC

สมการแสดงสมมติฐาน: กระบวนการ PCR ที่ใช้ในการวิเคราะห์ target gene และ endogenous control มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน

1.) การเทียบการแสดงออกของยีน *ABCC2* กับ housekeeping gene(s)

$$\text{mean } Ct_{ABCC2} - \text{mean } Ct_{\text{endogenous control}} = \Delta Ct_{ABCC2_\text{endogenous control}}$$

$$\text{mean } NTC_{ABCC2} - \text{mean } NTC_{\text{endogenous control}} = \Delta NTC_{ABCC2_\text{endogenous control}}$$

2.) ระดับการแสดงออกของ *ABCC2* เทียบกับ endogenous controls

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\Delta Ct\ ABCC2_\text{endogenous control} - \Delta Ct\ NTC\ ABCC2_\text{endogenous control}]}$$

ค่า relative *ABCC2* expression> 1 หมายถึง *ABCC2* มีระดับการแสดงออกมากกว่า endogenous control

ค่า relative *ABCC2* expression< 1 หมายถึง *ABCC2* มีระดับการแสดงออกน้อยกว่า endogenous control

ซึ่งสามารถปรับค่าด้วยสมการ

= - (1/fold difference of *ABCC2* relative expression)

ความคงตัวของ housekeeping gene(s)

จากการทดสอบความคงตัวของ housekeeping gene(s) จากโปรแกรม BestKeeper® จากตารางที่ 8 การใช้ housekeeping gene *β2-M หรือ GAPDH* แบบเดี่ยว ในการเป็นยีนเทียบการแสดงออกของ *ABCC2* นั้นมีความคงตัวในระดับดี โดยพิจารณาจากค่า correlation coefficient ซึ่งมีค่า 0.867-0.968 แต่เมื่อพิจารณาค่า SD พบว่า SD ของ *β2-M* มีค่าสูง ดังนั้นหากจะใช้ housekeeping gene ชนิดเดียว ควรเลือกใช้ *Actin-β* หรือ *GAPDH* มากกว่า ในการหาค่าการแสดงออกของ ABCC2 ในเม็ดเลือดขาว

นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าการใช้ housekeeping gene มากกว่า 1 ชนิด มีความคงตัวมากกว่าการใช้เพียงชนิดเดียว สังเกตได้จากค่า r ที่เพิ่มขึ้น และ SD ใกล้เคียง 1 มากขึ้นดังนั้นควรใช้ housekeeping genesมากกว่า 1 ชนิดในการเป็นยีนเทียบการแสดงออกของยีน *ABCC2* แต่การใช้ 2 และ 3 ชนิดอาจไม่แตกต่างกัน ดังนั้นหากมีงบประมาณที่จำกัดการใช้ housekeeping genes 2 ชนิด สามารถยอมรับได้

Housekeeping gene(s) ทั่วไปที่นิยมนำมาใช้ในการเทียบข้อมูลการแสดงออกของ mRNA ในกระบวนการ QRT-PCR ได้แก่ยีน Beta-actin (*Actin-β*), Beta-2-microglobulin (*β2-M*), Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), Hydroxymethyl-bilane synthase (*HMBS*), Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1 (*HPRT1*), Ribosomal protein L13a (*RPL13A),* Succinate dehydrogenase complex, subunit A (*SDHA*), TATA box binding protein (*TBP*), Ubiquitin C (*UBC*), Tyrosine 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein และ zeta polypeptide (*YWHAZ*)[37] จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวก่อนหน้านี้พบว่ามีการใช้ยีน *GAPDH*[27,36], *β2-M*[7,8] เป็น endogenous controls และจากการศึกษาของ Vandersompele J. และคณะ ที่ทำการศึกษา housekeeping genes 10 ชนิด ในเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าการแสดงออกของยีน *β2-M* มีความคงตัวมากที่สุดและคงตัวมากกว่ายีน *GAPDH* และ *Actin-β* ตามลำดับ[37] ดังนั้นในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ยีน *Actin-β*, *GAPDH* และ *β2-M* เป็นตัวควบคุมภายใน (endogenous controls)

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาว และจากการทดสอบความคงตัวโดยใช้โปรแกรม BestKeeper®[46] เมื่อพิจารณาการใช้ housekeeping gene แบบเดี่ยวในการเป็น endogenous control พบว่า ยีน *Actin-β* มีความคงตัวมากที่สุด รองลงมาเป็นยีน *GAPDH* และ *β2-M* ตามลำดับ แม้ว่าผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยจะขัดแย้งกับผลการศึกษาของ Vandersompele J. และคณะ[37] แต่ก็ยังมีความสอดคล้องกับผลของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้[47] ที่ทำการศึกษาในประชากรบางส่วนที่เป็นประชากรกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเป็นการยืนยันความแม่นยำและน่าเชื่อถือในผลการทดลองของคณะผู้วิจัย โดยยีน *β2-M* มีความหมาะสมน้อยที่สุดในการนำมาใช้เป็น endogenous control ชนิดเดี่ยวหากเทียบกับ *GAPDH Actin-β* ในการหาระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้เมื่อทดสอบความคงตัวของการใช้ housekeeping genes 2 ชนิดร่วมกันในการเป็น endogenous controls พบว่ามีความคงตัวเพิ่มสูงขึ้น โดยการใช้ *β2-M* ร่วมกับ *GAPDH* มีความคงตัวใกล้เคียงกับการใช้ *β2-M* ร่วมกับ *Actin-β* และการใช้ *GAPDH* ร่วมกับ *Actin-β* และเมื่อใช้ housekeeping genes 3 ชนิดร่วมกันในการเป็น endogenous controls จะมีความคงตัวมากที่สุด ซึ่งผลที่ได้เป็นในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยก่อนหน้านี้[37]

ตารางที่ 25 ร้อยละการแสดงออกของ *ABCC2* เทียบกับ housekeeping gene(s) โดยใช้วิธี comparative Ct method

Housekeeping gene(s) ที่ใช้ในการ normalization	ร้อยละการแสดงออกของ *ABCC2* เทียบกับ housekeeping gene(s)						
	Actin-β	*GAPDH*	*β2-M*	*GAPDH +Actin-β*	*β2-M +Actin-β*	*β2-M +GAPDH*	*β2-M +GAPDH +Actin-β*
				Overall (n=92)			
Mean*	-181.01	-49.76	-142.99	-87.97	-152.83	-70.77	-94.57
S.D.	407.98	62.15	330.13	136.90	356.10	128.03	179.02
%C.V.	-225.39	-124.91	-230.87	-155.63	-233.00	-180.91	-189.30
				Females (n= 48)			
Mean#	-198.32	-56.36	-177.62	-100.86	-179.44	-87.17	-112.80
S.D.	305.72	73.71	347.49	142.96	322.70	147.83	186.52
%C.V.	-154.15	-130.79	-195.63	-141.75	-179.83	-169.58	-165.35
				Males (n= 44)			
Mean#	-162.12	-42.37	-105.22	-73.91	-123.80	-52.88	-74.68
S.D.	499.38	46.18	309.62	130.14	391.00	100.88	170.36
%C.V.	-308.03	-109.00	-294.26	-176.09	-315.83	-190.78	-228.12
Ratio M/F+	1.195	1.329	1.447	1.261	1.261	1.272	1.250

S.D.; Standard deviation, C.V.; Coefficient of variation *β2-M:* Beta-2-microglobulin

GAPDH: Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase *Actin-β:* Beta actin

*ร้อยละการแสดงออกของยีน *ABCC2* เมื่อใช้ housekeeping gene(s) แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value<0.001) โดยใช้สถิติ one-way ANOVA (บางคู่) แต่เมื่อทำการวิเคราะห์โดย univariate analysis (gender, housekeeping genes) พบว่า housekeeping gene (s) ไม่มีอิทธิพลต่อระดับการแสดงออกของยีน แต่ เพศมีอิทธิพลแสดงถึงความแตกต่างของการแสดงออกของยีนนี้ (p=0.006)

ร้อยละการแสดงออกของยีน *ABCC2* เมื่อใช้ housekeeping gene(s) แต่ละประเภท ระหว่างเพศหญิงและเพศชายไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P-value>0.05) โดยใช้สถิติ independent t-tests

ดังนั้นการแปลผลระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาวนั้นต้องพิจารณาการใช้ housekeeping gene(s) ที่เหมาะสมในการเป็น endogenous controls และจากการศึกษานี้คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าหากต้องการใช้ housekeeping gene 1 ชนิดควรเลือกใช้ *Actin-β* หรือ *GAPDH* หรือควรใช้ housekeeping genes มากกว่า 1 ชนิดในการเป็น endogenous controls สำหรับการหาระดับการแสดงออกของยีนในเม็ดเลือดขาว

การแสดงออกของยีน*ABCC2*

การแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเทียบกับยีน *GAPDH*, *Actin-β*, *β2-M* และการใช้ housekeeping genes ร่วมกันมากกว่า 1 ชนิดแสดงในตารางที่ 12

ระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มประชากรที่คณะผู้วิจัยทำการศึกษาแสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนระหว่างบุคคล โดยเฉพาะในเพศชาย (%C.V. = 109.00-315.83) เมื่อเปรียบเทียบกับเพศหญิง (%C.V. = 130.79-179.83) ซึ่งค่าที่ได้ขึ้นอยู่กับประเภทของ housekeeping gene(s) ที่ใช้ โดยเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ One Way ANOVA พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการแสดงออกของยีน *ABCC2* เมื่อเทียบกับ *Actin-β*, *GAPDH* และ housekeeping genes ร่วมกันมากกว่า 1 ชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P-value>0.05) และผล poshoc analysis โดยใช้ Turkey test พบว่า ค่าการแสดงออกของยีน ABCC2 โดยใช้ *Actin-β* เป็นตัวเทียบมีความแตกต่างจากการใช้ *GAPDH* (p=0.001), *β2-M (p=0.001)*, *GAPDH+ β2-M (p=0.011)* และการใช้ *β2-M* เป็นตัวเทียบมีความแตกต่างจากการใช้ *Actin-β+ GAPDH* (p=0.001) , *β2-M + Actin-β* (p=0.001), *β2-M + GAPDH* (p=0.035) และ *β2-M +GAPDH + Actin-β β* (p=0.001) *อย่างมีนัยสำคัญ*

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ independent sample t-tests พบว่า ค่าเฉลี่ยร้อยละการแสดงออกของยีน *ABCC2* เมื่อใช้ housekeeping gene(s) แต่ละประเภท ระหว่างเพศหญิงและเพศชายไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P-value>0.05) แต่พบว่าเพศชายมีแนวโน้มมีการแสดงออกของยีนนี้สูงกว่าเพศหญิง

เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ univariate analysis โดยมี เพศ และ ประเภทของ housekeeping geen เป็น ตัวแปร พบว่า housekeeping gene(s) ไม่มีอิทธิพลต่อระดับการแสดงออกของยีน แต่เพศมีอิทธิพลแสดงถึงความแตกต่างของการแสดงออกของยีนนี้ (p=0.006)

การแสดงออกของยีน *ABCC2* สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น ตับ ไต ทางเดินอาหาร ลำไส้เล็ก และเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นต้น[3,48] โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยาหลายชนิด เช่น ยาต้านมะเร็ง[11] หรือยาต้าน HIV บางชนิด[12,49] ซึ่งโปรตีน ABCC2 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการปกป้องร่างกายด้วยการขนส่งยา สารเคมี และสารแปลกปลอมออกจากร่างกาย (detoxification) ความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *ABCC2* อาจมีผลต่อความแตกต่างของเภสัชจลนพลศาสตร์และประสิทธิภาพของยาหลายชนิดในแต่ละบุคคล การแสดงออกของยีน *ABCC2* เกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น อายุ[50] single nucleotide polymorphisms (SNPs)[14,16,26,51,52] อายุครรภ์[14] ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์[33] cytokine[53] และเพศ[16,18,19,36,54] อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนดังกล่าว นอกจากนี้ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวยังมีข้อโต้แย้ง[16,18,19,36,54] และจำนวนการศึกษายังมีจำกัด

ผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่า การแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเซลล์เม็ดเลือดขาวระหว่างเพศหญิงและเพศชาย พบว่าเพศชายมีระดับการแสดงออกของยีนนี้สูงกว่าเพศหญิง แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งต่างจากผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง[18,19,54] โดยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศกับการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ด้วยวิธี immunoblot analysis ในสัตว์ทดลองการศึกษาหนึ่งพบว่า หนู Spraque-Dawley (SD) เพศเมียมีการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเซลล์ตับมากกว่าหนูเพศผู้ 1.5 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.001) ซึ่งอาจเกิดจากฮอร์โมน testosterone ที่มีผลลดการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเซลล์ตับของหนูเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.042)[19] และสอดคล้องกับอีกการศึกษาหนึ่งที่ทำการศึกษาในหนูด้วยวิธี western blot analysis พบว่ามีระดับการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเพศเมียมากกว่าเพศผู้ และมีความสัมพันธ์กับระดับยา doxorubicin ในเซลล์ตับของหนูเพศผู้ที่สูงกว่าเพศเมีย ขณะที่ระดับยาในพลาสมาไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศ ซึ่งอาจเป็นเพราะ doxorubicin ไม่ได้เป็น substrates ของโปรตีน ABCC2 เพียงอย่างเดียว แต่ยังเป็น substrates ของ P-glycoprotein และ CYP2B1 ด้วย[18] ดังนั้นระดับยา doxorubicin ในพลาสมาอาจไม่ได้มีผลโดยตรงเนื่องมาจากการทำงานของโปรตีน ABCC2 อย่างเดียว ซึ่งแตกต่างจากอีกการศึกษาหนึ่งที่ศึกษาความสัมพันธ์ของเพศกับการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ที่ส่งผลต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยา ofloxacin ในเซลล์ไตของหนู พบว่า ร้อยละการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเพศผู้สูงกว่าเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ (3.695% และ 1.702% ตามลำดับ, p<0.05)[54] เนื่องจากที่เซลล์ไตพบว่าโปรตีน ABCC2 ทำหน้าที่ในการขับยาออกจากร่างกายผ่าน lumen ของ proximal tubule[55] และยาในกลุ่ม fluoroquinolones เป็น substrates ของโปรตีน ABCC2[35,56] รวมทั้งยา ofloxacin ยังเป็น substrates ของ breast cancer resistance protein (BCRP)[57] ซึ่งมีการแสดงออกที่ตับ[57] และไต[58] แต่มีการกำจัดออกจากร่างกายที่ไตเป็นหลัก[59] ดังนั้นจึงพบว่าระดับยา ofloxacin ในพลาสมาของหนูเพศเมียสูงกว่าหนูเพศผู้

อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่กล่าวมา[18,19,51] จะเห็นได้ว่าการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเพศหญิงและชายมีความแตกต่างกันในแต่ละอวัยวะ

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเพศและการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในมนุษย์ มีการศึกษาในเซลล์ตับของตัวอย่างจำนวน 51 คนจาก Human Liver Bank of the University of Washington School of Pharmacy พบว่าเพศไม่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเซลล์ตับของมนุษย์[16] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์เม็ดเลือดขาวของอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 9 คน (หญิง 5 คน, ชาย 4 คน) โดยใช้ *GAPDH* เป็นยีนเทียบค่า (endogenous controls) ในการหาดัชนีการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 พบว่าดัชนีการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเพศหญิงและเพศชายไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และยังพบว่าดัชนีการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ metabolite ของยา ethynylstavudine และ lamivudine แม้ว่ามีแนวโน้มสัมพันธ์กับระดับยา zidovudine[36] แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากประชากรที่ใช้ในการศึกษาค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยในครั้งนี้ได้ยืนยันผลการทดลองจากการศึกษาก่อนหน้านี้[36] ในขนาดประชากรที่มากกว่า โดยใช้ยีน *Actin-β*, *GAPDH* และ*β2-M* เป็น endogenous controls

เมื่อพิจารณาความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเม็ดเลือดขาวในการศึกษานี้พบว่าการแสดงออกของยีน *ABCC2* มีความแปรปรวนระหว่างบุคคลอย่างมีนัยสำคัญ (%C.V. = 124 -233) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Liptrott N.J. และคณะที่พบว่าการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 8 คน มีความแปรปรวนระหว่างบุคคล 1.2 เท่าจากค่ามัธยฐาน (median)[34] และจากผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าเพศชายมีความแปรปรวนมากกว่าเพศหญิง ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Paintsil E. (เพศหญิง; %C.V. = 50, เพศชาย; %C.V. = 22.92)[36] ในขณะที่การศึกษาในเซลล์ตับพบว่าเพศชายมีความแปรปรวนในการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 มากกว่าเพศหญิง (%C.V. = 48.65, 34.78 ตามลำดับ)[16] และแม้ว่าการศึกษานี้จะพบว่าอัตราส่วนของระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2* เพศชายต่อเพศหญิง เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ในการใช้ hosekeeping gene แต่ละชนิด (range = 1.20-1.45) แต่ระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2* ในเพศหญิงและเพศชายไม่แตกต่างกันเมื่อทดสอบทางสถิติ

แต่อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ด้วย univariate analysis พบว่าเพศอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนนี้ในเม็ดเลือดขาวในกลุ่มประชากรชาวไทย ดังนั้นเพศจึงอาจมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับความแตกต่างทางเภสัชจลนพลศาสตร์ของยาที่เป็น substrates ของโปรตีน ABCC2 ในเม็ดเลือดขาวในแต่ละบุคคล อย่างไรก็ตามยังต้องการการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเม็ดเลือดขาว เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ดังกล่าว และการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเภสัชพันธุศาสตร์ในประชากรชาวไทยต่อไป

และเมื่อทำการทดสอบความสัมพันธ์ของ SNPs ทั้ง 6 (-1019A>G, -1023 G>A, -1549 G>A, 1249 G>A, 61606 A>G, 4544G>A และ การแสดงออกของยีน ABCC2 ในเม็ดเลือดขาวนั้น มีเพียง SNPs 1.3 (-1549 G>A) ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน ABCC2 ในเม็ดเลือดขาว ($r=-0.225$, $p=0.031$) แต่อีก 5 SNPs ที่ทำการทดสอบ ยังไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงระดับการแสดงออกของโปรตีน ABCC2 ในเม็ดเลือดขาวต่อไปต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Ito S, Ieiri I, Tanabe M, Suzuki A, Higuchi S, Otsubo K. Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. Pharmacogenetics. 2001 Mar;11(2):175-84.
2. Gerk PM, Vore M. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. J PharmacolExpTher. 2002 Aug;302(2):407-15.
3. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. PharmacolTher. 2006 Nov;112(2):457-73.
4. Fardel O, Jigorel E, Le Vee M, Payen L. Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. Biomed Pharmacother. 2005 59(3):104-14.
5. Hoffmann U, Kroemer HK. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. Drug metabolism reviews. 2004 36(3-4):669-701.
6. Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. Advanced drug delivery reviews. 2002 54(10):1311-31.
7. Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'Graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, et al. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. BiochemPharmacol. 2005 Sep 15;70(6):949-58.
8. Oselin K, Mrozikiewicz PM, Pahkla R, Roots I. Quantitative determination of the human MRP1 and MRP2 mRNA expression in FACS-sorted peripheral blood CD4+, CD8+, CD19+, and CD56+ cells. European Journal of Haematology. 2003;71(2):119-23.
9. van der Kolk DM, de Vries EG, Koning JA, van den Berg E, Muller M, Vellenga E. Activity and expression of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 in acute myeloid leukemia cells, tumor cell lines, and normal hematopoietic CD34+ peripheral blood cells. Clin Cancer Res. 1998 4(7):1727-36.
10. Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. Expert Opin Drug MetabToxicol. 2006 Jun;2(3):351-66.
11. Ogura K, Ohta S, Ohmori T, Takeuchi H, Hirose T, Horichi N, et al. Vinca alkaloids induce granulocyte-macrophage colony stimulating factor in human peripheral blood mononuclear cells. Anticancer Res. 2000 Jul-Aug;20(4):2383-8.
12. Janneh O, Owen A, Chandler B, Hartkoorn RC, Hart CA, Bray PG, et al. Modulation of the intracellular accumulation of saquinavir in peripheral blood mononuclear cells by inhibitors of MRP1, MRP2, P-gp and BCRP. AIDS. 2005 Dec 2;19(18):2097-102.
13. Flamar AL, Xue Y, Zurawski SM, Montes M, King B, Sloan L, et al. Targeting concatenated HIV antigens to human CD40 expands a broad repertoire of multifunctional CD4+ and CD8+ T cells.
AIDS. 2013 Aug 24;27(13):2041-51.
14. Meyer zuSchwabedissen HE, Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C, et al. Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. Drug MetabDispos. 2005 Jul;33(7):896-904

15. van der Kolk DM, de Vries EG, Noordhoek L, van den Berg E, van der Pol MA, Muller M, et al. Activity and expression of the multidrug resistance proteins P-glycoprotein, MRP1, MRP2, MRP3 and MRP5 in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. Leukemia. 2001 Oct;15(10):1544-53.
16. Deo AK, Prasad B, Balogh L, Lai Y, Unadkat JD. Interindividual variability in hepatic expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2): quantification by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Drug MetabDispos. 2012 May;40(5):852-5.
17. Mor-Cohen R, Zivelin A, Rosenberg N, Shani M, Muallem S, Seligsohn U. Identification and functional analysis of two novel mutations in the multidrug resistance protein 2 gene in Israeli patients with Dubin-Johnson syndrome. J Biol Chem. 2001 Oct 5;276(40):36923-30.
18. Suzuki T, Zhao YL, Nadai M, Naruhashi K, Shimizu A, Takagi K, et al. Gender-related differences in expression and function of hepatic P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp2) in rats. Life Sci. 2006 Jun 27;79(5):455-61.
19. Rost D, Kopplow K, Gehrke S, Mueller S, Friess H, Ittrich C, et al. Gender-specific expression of liver organic anion transporters in rat. Eur J Clin Invest. 2005 Oct;35(10):635-43.
20. Simon FR, Iwahashi M, Hu LJ, Qadri I, Arias IM, Ortiz D, et al. Hormonal regulation of hepatic multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) primarily involves the pattern of growth hormone secretion. Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol. 2006 Apr;290(4):G595-608.
21. MacLean C, Moenning U, Reichel A, Fricker G. Closing the Gaps: A Full Scan of the Intestinal Expression of P-Glycoprotein, Breast Cancer Resistance Protein, and Multidrug Resistance-Associated Protein 2 in Male and Female Rats. Drug Metabolism and Disposition. 2008;36(7):1249-54.
22. Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. Adv Drug Deliv Rev. 2002 18;54(10):1311-31.
23. Liang XJ, Aszalos A. Multidrug transporters as drug targets. Current Drug Targets. 2006;7(8):911-21.
24. Fardel O, Jigorel E, Le Vee M, Payen L. Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. Biomed Pharmacother. 2005 Apr;59(3):104-14.
25. Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, et al. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. Current Medicinal Chemistry. 2008;15(20):1981-2039.
26. Elens L, Tyteca D, Panin N, Courtoy P, Lison D, Demoulin JB, et al. Functional defect caused by the 4544G>A SNP in ABCC2: Potential impact for drug cellular disposition. Pharmacogenetics and Genomics. 2011;21(12):884-93.
27. Janneh O, Jones E, Chandler B, Owen A, Khoo SH. Inhibition of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins modulates the intracellular concentration of lopinavir in cultured CD4 T cells and primary human lymphocytes. J AntimicrobChemother. 2007 Nov;60(5):987-93.
28. Ito K, Wakabayashi T, Horie T. Mrp2/Abcc2 transport activity is stimulated by protein kinase Cα in a baculo virus co-expression system. Life Sciences. 2005;77(5):539-50.
29. Huisman MT, Smit JW, Crommentuyn KM, Zelcer N, Wiltshire HR, Beijnen JH, et al. Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. AIDS. 2002 Nov 22;16(17):2295-301.
30. König SK, Herzog M, Theile D, Zembruski N, Haefeli WE, Weiss J. Impact of drug transporters on cellular resistance towards saquinavir and darunavir. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010;65(11):2319-28.

31. Kiser JJ, Aquilante CL, Anderson PL, King TM, Carten ML, Fletcher CV. Clinical and genetic determinants of intracellular tenofovirdiphosphate concentrations in HIV-infected patients. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2008;47(3):298-303.
32. Oswald S, Grube M, Siegmund W, Kroemer HK. Transporter-mediated uptake into cellular compartments. Xenobiotica. 2007;37(10-11):1171-95.
33. Laupeze B, Amiot L, Payen L, Drenou B, Grosset JM, Lehne G, et al. Multidrug resistance protein (MRP) activity in normal mature leukocytes and CD34-positive hematopoietic cells from peripheral blood. Life Sci. 2001 Feb 2;68(11):1323-31.
34. Liptrott NJ, Khoo SH, Back DJ, Owen A. Detection of ABCC2, CYP2B6 and CYP3A4 in human peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry. J Immunol Methods. 2008 Dec 31;339(2):270-4.
35. Hayashi T, Abe F, Kato M, Saito H, Ueyama J, Kondo Y, et al. Involvement of sulfate conjugation and multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) in sex-related differences in the pharmacokinetics of garenoxacin in rats. Journal of Infection and Chemotherapy. 2010;17(1):24-9.
36. Paintsil E, Dutschman GE, Hu R, Grill SP, Wang CJ, Lam W, et al. Determinants of individual variation in intracellular accumulation of anti-HIV nucleoside analog metabolites. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Feb;55(2):895-903.
37. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034
38. Sikand K, Singh J, Ebron JS, Shukla GC. Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin are targets of miR-644a. PLoS One. 2012;7(10):e47510.
39. Annereau JP, Szakacs G, Tucker CJ, et al. Analysis ofABC transporter expression in drug-selected cell lines by a microarray dedicated to multidrug resistance. Mol Pharmacol. 2004;66:1397–405.
40. Itoh Y, Tamai M, Yokogawa K, et al. Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 in in vivo cisplatin resistance of rat hepatoma AH66 cells. Anticancer Res. 2002;22:1649–53.
41. Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. Mol Pharmacol. 1999;55:929–37.
42. Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolising Enzymes and Drug Transporters in the Chemotherapeutic Treatment of Cancer. Clin Pharmacokinet. 2006 45(3): 253-85.
43. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y.Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. Transplantation. 2006 27;82(8):1074-84.
44. Janneh O, Owen A, Chandler B, Hartkoorn RC, Hart CA, Bray PG, Ward SA, Back DJ, Khoo SH. Modulation of the intracellular accumulation of saquinavir in peripheral blood mononuclear cells by inhibitors of MRP1, MRP2, P-gp and BCRP. AIDS. 2005 19(18):2097-102.
45. van Iterson M, t Hoen PA, Pedotti P, Hooiveld GJ, den Dunnen JT, van Ommen GJ, et al. Relative power and sample size analysis on gene expression profiling data. BMC Genomics. 2009;10:439.
46. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. BiotechnolLett. 2004 Mar;26(6):509-15.

47. Sudchada P, Oo-puthinan S, Kerdpin O, Saelim N. ABCB1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells in healthy Thai males and females. Genet Mol Res. 2010;9(2):1177-85.
48. Girardin F. Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development. Dialogues Clin Neurosci. 2006;8(3): 311-321.
49. Owen A, Chandler B, Bray PG, Ward SA, Hart CA, Back DJ, et al. Functional correlation of P-glycoprotein expression and genotype with expression of the human immunodeficiency virus type 1 coreceptor CXCR4. J Virol. 2004 Nov;78(21):12022-9.
50. Johnson DR, Guo GL, Klaassen CD. Expression of rat Multidrug Resistance Protein 2 (Mrp2) in male and female rats during normal and pregnenolone-16alpha-carbonitrile (PCN)-induced postnatal ontogeny. Toxicology. 2002 Sep 16;178(3):209-19.
51. Elens L, Yombi JC, Lison D, Wallemacq P, Vandercam B, Haufroid V. Association between ABCC2 polymorphism and lopinavir accumulation in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients. Pharmacogenomics. 2009 Oct;10(10):1589-97.
52. Haufroid V. Genetic polymorphisms of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC2 and their impact on drug disposition. Current Drug Targets. 2011;12(5):631-46.
53. Liptrott NJ, Penny M, Bray PG, Sathish J, Khoo SH, Back DJ, et al. The impact of cytokines on the expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes and chemokine receptors in human PBMC. Br J Pharmacol. 2009 Feb;156(3):497-508.
54. Wang D, Wei YH, Zhou Y, Zhang GQ, Zhang F, Li YQ, et al. Pharmacokinetic variation of ofloxacin based on gender-related difference in the expression of multidrug resistance-associated protein (Abcc2/Mrp2) in rat kidney. Yao XueXueBao. 2012 May;47(5):624-9.
55. Sissung TM, Troutman SM, Campbell TJ, Pressler HM, Sung H, Bates SE, et al. Transporter pharmacogenetics: transporter polymorphisms affect normal physiology, diseases, and pharmacotherapy. Discov Med. 2012 Jan;13(68):19-34.
56. Sun J, Sun YB, He ZG. [Significant role of transporters in drug hepatobiliary transport]. Yao XueXueBao. 2005 Aug;40(8):680-5.
57. Ando T, Kusuhara H, Merino G, Alvarez AI, Schinkel AH, Sugiyama Y. Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. Drug MetabDispos. 2007 Oct;35(10):1873-9.
58. Huls M, Brown CD, Windass AS, Sayer R, van den Heuvel JJ, Heemskerk S, et al. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. Kidney Int. 2008 Jan;73(2):220-5.
59. Lode H, Hoffken G, Olschewski P, Sievers B, Kirch A, Borner K, et al. Pharmacokinetics of ofloxacin after parenteral and oral administration. Antimicrob Agents Chemother. 1987 Sep;31(9):1338-42.
60. Hartl DL, Clarke AG. Principles of population genetics. Sundeland, 2007 MA: Sinauer.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ค่า Treshold cycle (Ct) จากการทำ realtime-RT-PCR เพื่อหาระดับการแสดงออกของยีน *ABCC2*

SID	Gender	Mean Ct Actin-β	Mean Ct GAPH	Mean Ct β2m	MeanCt Actin-β + GAPDH	MeanCt Actin-β + β2m	MeanCt GAPDH_B2M	MeanCt Actin-β + GAPDH + β2m	Mean Ct ABCC2
1	F	23.877	24.580	25.870	24.228	24.873	25.225	24.776	35.370
2	F	24.283	25.323	25.027	24.803	24.655	25.175	24.878	36.803
4	F	25.700	27.610	25.450	26.655	25.575	26.530	26.253	40.307
5	F	23.793	24.607	26.767	24.200	25.280	25.687	25.056	36.920
6	F	22.587	23.370	27.140	22.978	24.863	25.255	24.366	35.077
7	F	23.620	24.800	25.825	24.210	24.723	25.313	24.748	37.000
8	F	25.725	26.540	26.860	26.133	26.293	26.700	26.375	37.665
9	F	28.027	27.430	27.623	27.728	27.825	27.527	27.693	38.515
10	F	26.223	26.190	25.093	26.207	25.658	25.642	25.836	38.377
11	F	24.160	27.955	25.585	26.058	24.873	26.770	25.900	39.550
12	F	27.505	28.485	27.225	27.995	27.365	27.855	27.738	42.700
13	F	26.575	27.745	27.970	27.160	27.273	27.858	27.430	42.530
15	F	25.150	25.420	27.805	25.285	26.478	26.613	26.125	37.060
16	F	26.265	27.905	28.375	27.085	27.320	28.140	27.515	39.410
18	F	25.075	25.665	25.825	25.370	25.450	25.745	25.522	36.500
19	F	26.080	27.355	26.295	26.718	26.188	26.825	26.577	39.780
20	F	24.965	26.320	25.450	25.643	25.208	25.885	25.578	35.670
21	F	27.610	28.325	28.345	27.968	27.978	28.335	28.093	38.680
22	F	26.075	29.060	26.190	27.568	26.133	27.625	27.108	41.110
23	F	26.475	27.490	26.250	26.983	26.363	26.870	26.738	37.910

SID	Gender	Mean Ct Actin-β	Mean Ct GAPH	Mean Ct β2m	MeanCt Actin-β + GAPDH	MeanCt Actin-β + β2m	MeanCt GAPDH_B2M	MeanCt Actin-β + GAPDH + β2m	Mean Ct ABCC2
24	F	23.835	26.210	25.555	25.023	24.695	25.883	25.200	35.610
25	F	27.495	29.825	26.980	28.660	27.238	28.403	28.100	39.320
26	F	26.155	27.670	29.020	26.913	27.588	28.345	27.615	39.600
27	F	24.785	25.635	29.035	25.210	26.910	27.335	26.485	38.760
28	F	25.090	25.313	26.453	25.202	25.772	25.883	25.619	37.670
131	F	22.753	24.407	22.843	23.580	22.798	23.625	23.334	38.447
132	F	22.990	23.817	23.380	23.403	23.185	23.598	23.396	34.653
133	F	22.863	25.717	23.083	24.290	22.973	24.400	23.888	39.287
134	F	23.167	25.850	23.033	24.508	23.100	24.442	24.017	37.110
136	F	22.420	23.870	26.143	23.145	24.282	25.007	24.144	34.433
137	F	22.353	23.740	25.357	23.047	23.855	24.548	23.817	36.770
138	F	21.107	21.887	25.977	21.497	23.542	23.932	22.990	34.900
139	F	23.817	24.760	24.920	24.288	24.368	24.840	24.499	36.720
140	F	22.097	23.147	24.530	22.622	23.313	23.838	23.258	34.740
141	F	20.313	24.267	19.767	22.290	20.040	22.017	21.449	36.020
142	F	23.207	25.443	22.957	24.325	23.082	24.200	23.869	40.653
143	F	21.040	23.393	20.737	22.217	20.888	22.065	21.723	34.553
144	F	20.903	24.057	20.597	22.480	20.750	22.327	21.852	35.623
145	F	24.673	25.997	24.037	25.335	24.355	25.017	24.902	36.737
146	F	23.260	24.927	23.417	24.093	23.338	24.172	23.868	39.273
147	F	22.753	25.680	22.303	24.217	22.528	23.992	23.579	36.807
149	F	23.427	24.553	24.127	23.990	23.777	24.340	24.036	37.000
151	F	23.767	25.053	24.130	24.410	23.948	24.592	24.317	35.223
153	F	21.670	24.830	21.005	23.250	21.338	22.918	22.502	36.185
154	F	22.223	23.913	21.330	23.068	21.777	22.622	22.489	34.977

SID	Gender	Mean Ct Actin-β	Mean Ct GAPH	Mean Ct β2m	MeanCt Actin-β + GAPDH	MeanCt Actin-β + β2m	MeanCt GAPDH_B2M	MeanCt Actin-β + GAPDH + β2m	Mean Ct ABCC2
156	F	24.843	25.527	25.723	25.185	25.283	25.625	25.364	34.347
158	F	21.207	22.607	21.110	21.907	21.158	21.858	21.641	33.330
159	F	22.020	23.327	22.027	22.673	22.023	22.677	22.458	34.683
31	M	26.587	30.547	27.300	28.567	26.943	28.923	28.144	44.940
32	M	23.673	26.967	24.437	25.320	24.055	25.702	25.026	39.017
33	M	22.530	23.763	25.247	23.147	23.888	24.505	23.847	34.780
34	M	26.450	27.597	26.890	27.023	26.670	27.243	26.979	40.920
36	M	26.127	27.260	28.487	26.693	27.307	27.873	27.291	40.830
37	M	24.607	25.480	25.243	25.043	24.925	25.362	25.110	36.507
38	M	27.287	28.477	29.087	27.882	28.187	28.782	28.283	42.103
39	M	22.920	23.827	26.617	23.373	24.768	25.222	24.454	35.367
40	M	26.820	27.287	28.920	27.053	27.870	28.103	27.676	40.173
41	M	29.250	31.130	29.940	30.190	29.595	30.535	30.107	41.480
43	M	26.247	26.973	28.260	26.610	27.253	27.617	27.160	40.957
44	M	25.883	26.333	27.037	26.108	26.460	26.685	26.418	40.003
45	M	22.550	23.130	24.990	22.840	23.770	24.060	23.557	34.537
46	M	23.673	24.260	24.803	23.967	24.238	24.532	24.246	35.580
47	M	23.863	24.577	28.463	24.220	26.163	26.520	25.634	36.440
48	M	22.347	22.780	26.313	22.563	24.330	24.547	23.813	34.457
49	M	23.010	23.573	27.097	23.292	25.053	25.335	24.560	35.003
50	M	24.963	25.093	27.217	25.028	26.090	26.155	25.758	38.247
51	M	24.267	25.140	27.127	24.703	25.697	26.133	25.511	35.857
52	M	22.117	22.750	25.053	22.433	23.585	23.902	23.307	34.207
53	M	21.883	22.707	25.910	22.295	23.897	24.308	23.500	34.180
54	M	23.503	24.543	25.890	24.023	24.697	25.217	24.646	35.897

SID	Gender	Mean Ct Actin-β	Mean Ct GAPH	Mean Ct β2m	MeanCt Actin-β + GAPDH	MeanCt Actin-β + β2m	MeanCt GAPDH_B2M	MeanCt Actin-β + GAPDH + β2m	Mean Ct ABCC2
56	M	22.287	23.183	25.380	22.735	23.833	24.282	23.617	34.807
101	M	23.220	23.765	24.870	23.493	24.045	24.318	23.952	35.025
103	M	24.185	26.215	23.715	25.200	23.950	24.965	24.705	35.985
104	M	22.710	24.705	21.890	23.708	22.300	23.298	23.102	36.080
105	M	22.175	25.120	22.200	23.648	22.188	23.660	23.165	32.965
106	M	21.160	24.065	19.860	22.613	20.510	21.963	21.695	34.980
107	M	23.570	24.715	23.755	24.143	23.663	24.235	24.013	35.180
108	M	23.190	24.400	23.075	23.795	23.133	23.738	23.555	33.215
109	M	24.260	26.220	23.470	25.240	23.865	24.845	24.650	35.810
110	M	22.850	23.270	23.723	23.060	23.287	23.497	23.281	34.520
111	M	23.300	23.760	22.550	23.530	22.925	23.155	23.203	33.160
112	M	24.010	25.005	24.540	24.508	24.275	24.773	24.518	35.220
113	M	20.715	22.665	21.155	21.690	20.935	21.910	21.512	33.490
114	M	25.135	25.760	24.125	25.448	24.630	24.943	25.007	38.470
121	M	22.247	25.303	21.007	23.775	21.627	23.155	22.852	35.230
123	M	24.313	26.080	24.770	25.197	24.542	25.425	25.054	36.390
124	M	23.033	25.083	23.037	24.058	23.035	24.060	23.718	37.190
125	M	22.583	23.647	23.287	23.115	22.935	23.467	23.172	34.163
126	M	23.837	25.207	23.370	24.522	23.603	24.288	24.138	35.083
127	M	21.603	23.667	21.360	22.635	21.482	22.513	22.210	35.597
128	M	23.947	24.833	24.590	24.390	24.268	24.712	24.457	36.093
129	M	23.077	23.680	24.843	23.378	23.960	24.262	23.867	35.687

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงความเข้มข้นของ DNA ในแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ng/ul)	ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ng/ul)	ตัวอย่างที่	ความเข้มข้น (ng/ul)
1	6.63	38	32.78	121	22.62
2	15.78	39	21.88	123	25.70
3	11.84	40	14.94	124	17.15
4	8.38	41	28.87	125	14.99
5	6.04	42	23.76	126	19.30
6	26.34	43	24.02	127	21.81
7	12.42	44	31.05	128	18.28
8	8.37	45	25.81	129	17.25
9	16.72	46	21.58	130	22.16
10	11.36	47	27.28	131	25.03
11	12.15	48	15.16	132	36.45
12	16.65	49	25.62	133	32.78
13	12.37	50	25.80	134	22.07
14	29.68	51	28.54	136	29.34
15	10.67	52	28.44	137	28.67
16	23.71	53	26.12	138	19.59
17	20.48	54	25.34	139	33.12
18	7.58	55	21.74	140	7.90
19	4.76	56	26.44	141	29.53
20	3.68	101	7.88	142	25.43
21	29.05	103	28.73	143	25.97
22	4.36	104	10.55	144	20.77
23	6.71	105	22.67	145	30.87
24	7.74	106	20.79	146	36.48
25	5.04	107	26.18	147	19.08
26	12.98	108	17.38	149	24.51
27	16.33	109	17.45	150	20.76
28	17.93	110	17.33	151	27.61
29	30.93	111	18.70	152	30.54
30	10.48	112	19.59	153	19.95
31	23.13	113	16.58	154	22.09
32	23.26	114	11.88	156	38.59
33	28.29	115	24.54	157	21.09
34	34.53	116	15.22	158	43.52
35	31.41	118	15.48	159	49.32
36	13.48	119	16.25	159	54.27
37	27.01	120	14.96		

ภาคผนวก ค

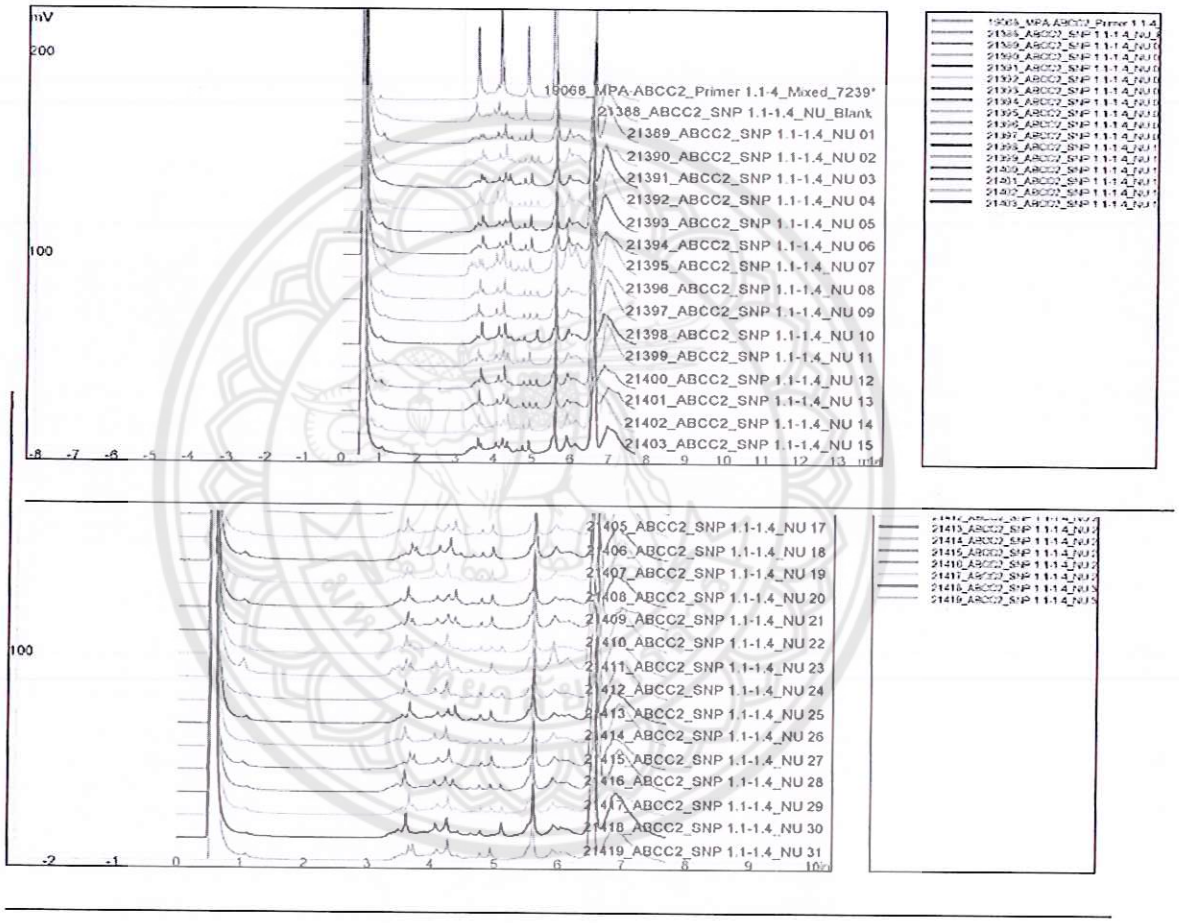
ผลการทำ DHPLC

Primer SNPs ชุดที่ 1

ABCC2_SNP 1.1-1.4_Method 7239_10-25-45,4-4.7'_NU 01-15_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

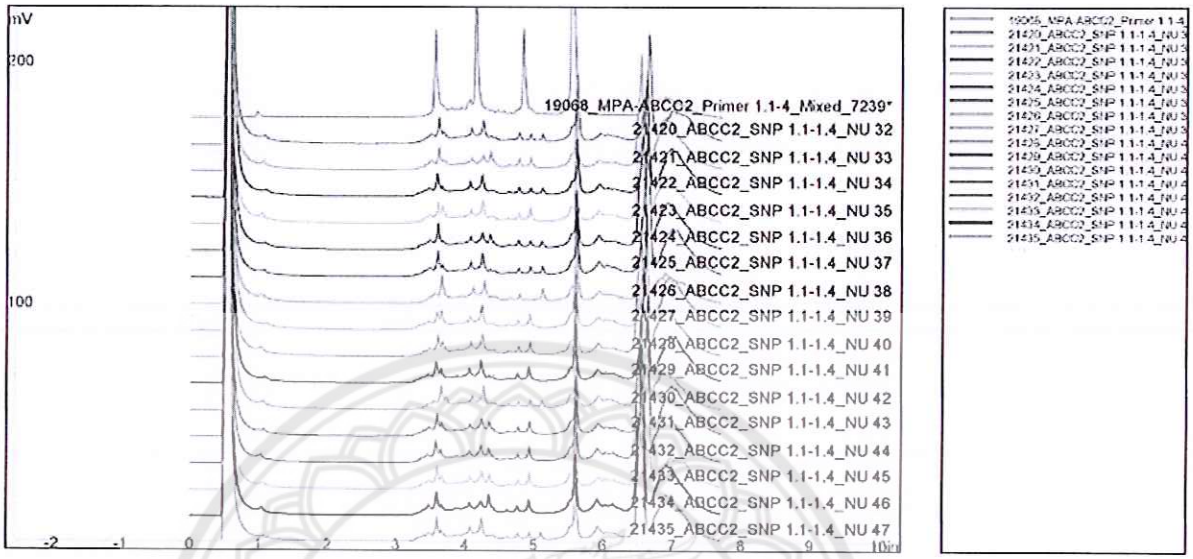
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:11:35 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 1.1-1.4_Method 7239_10-25-45,4-4.7'_NU 32-47_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

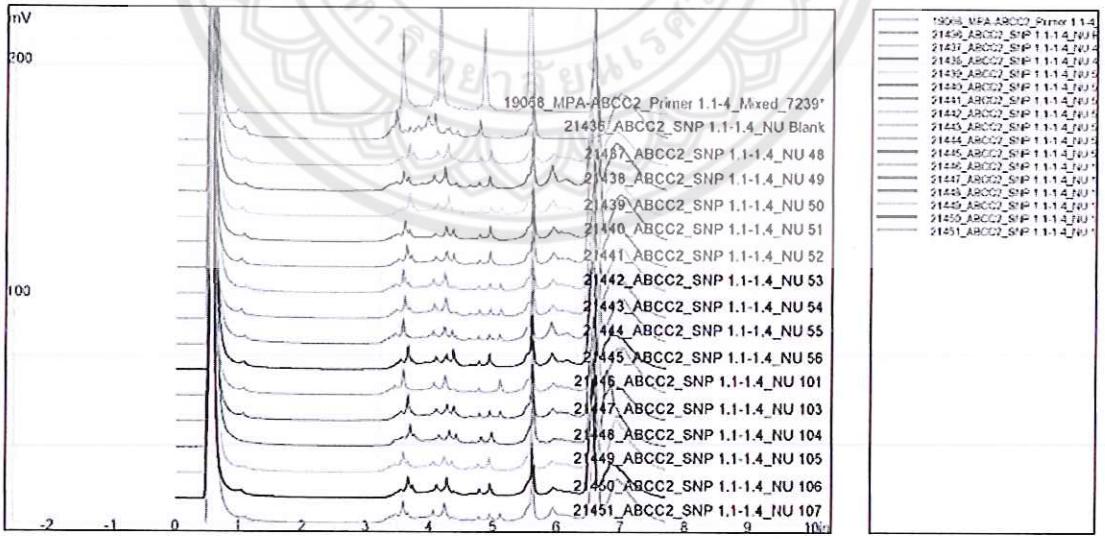
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:20:40 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 1.1-1.4_Method 7239_10-25-45,4-4.7'_NU 48-107_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

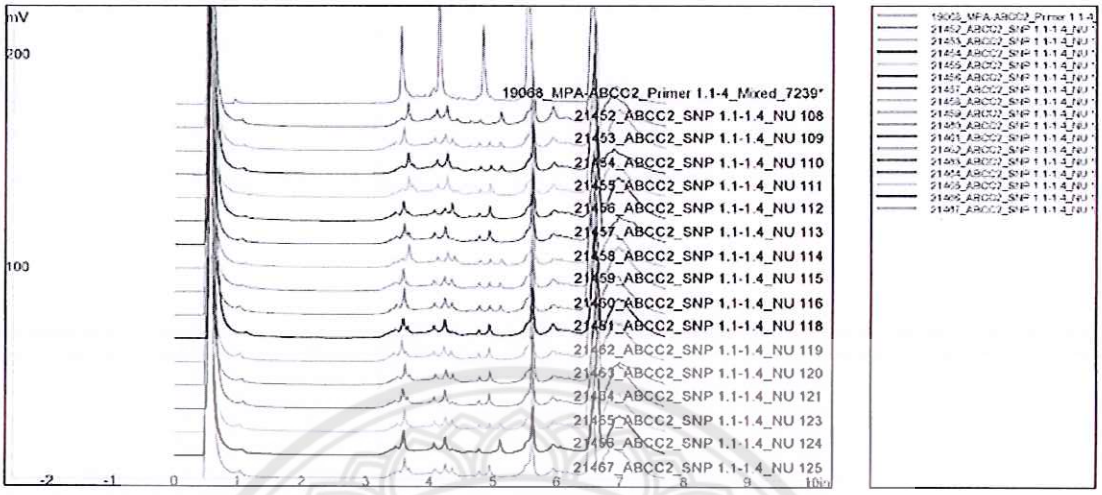
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:23:23 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 1.1-1.4_Method 7239_10-25-45,4-4.7'_NU 108-125_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

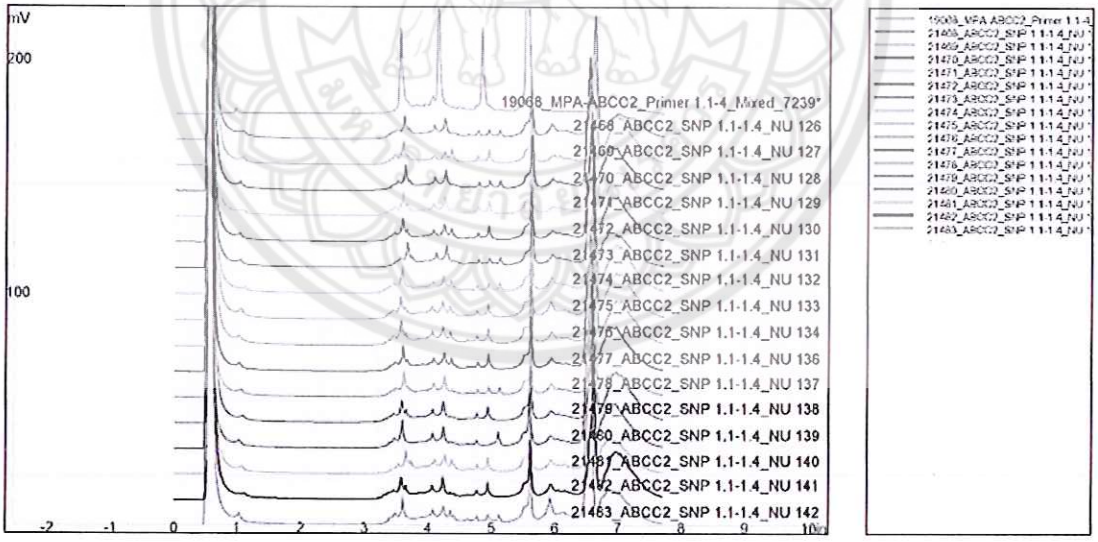
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:25:31 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 1.1-1.4_Method 7239_10-25-45,4-4.7'_NU 126-142_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

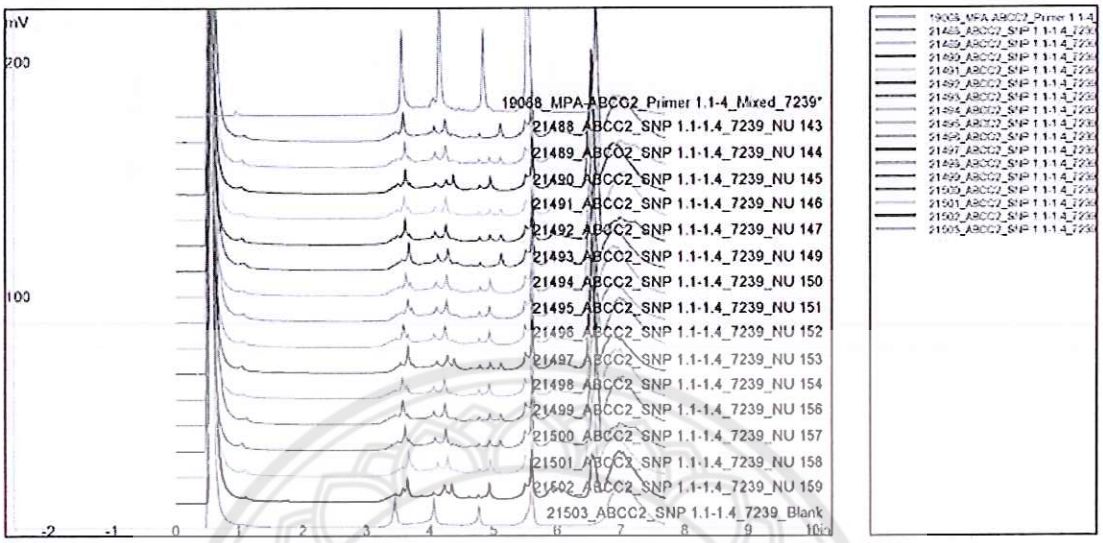
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:27:08 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 1.1-1.4_Method 7239_10-25-45,4-4.7'_NU 143-159_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

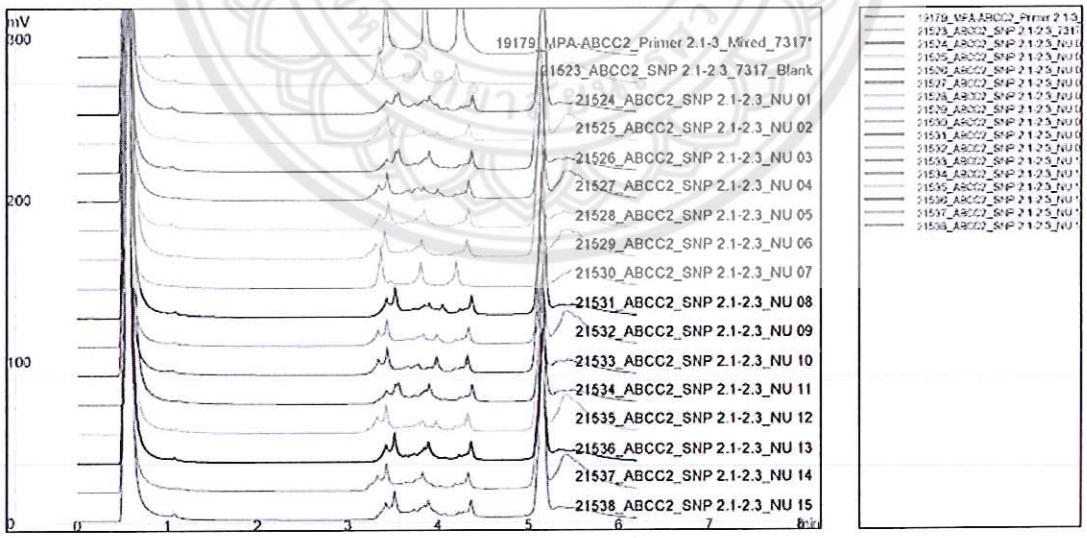
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:29:54 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 2.1-2.3_Method 7317_10-25-45,4-4.7'_NU 01-15_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

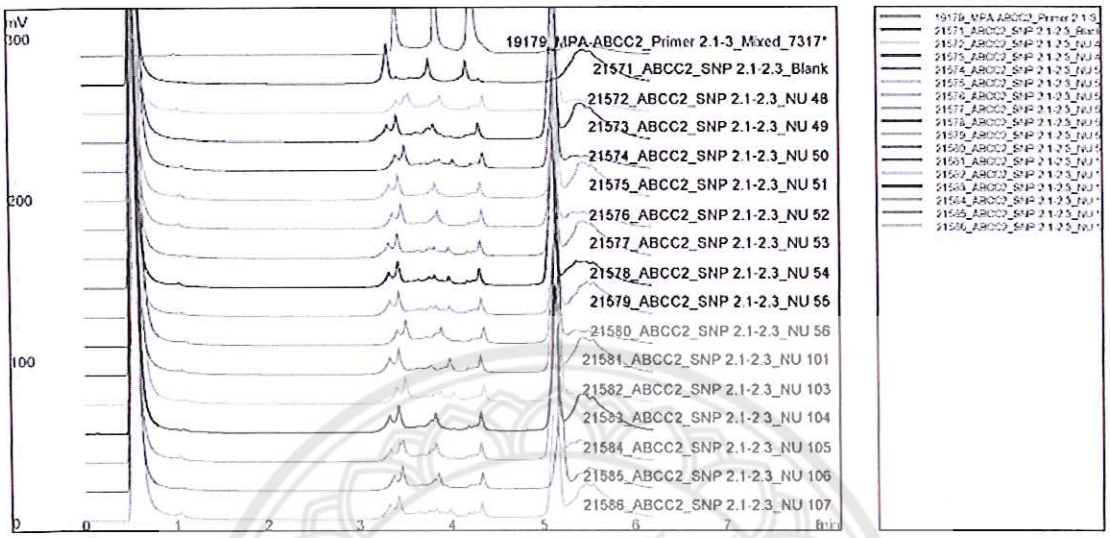
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:54:04 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 2.1-2.3_Method 7317_10-25-45,4-4.7'_NU 48-107_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

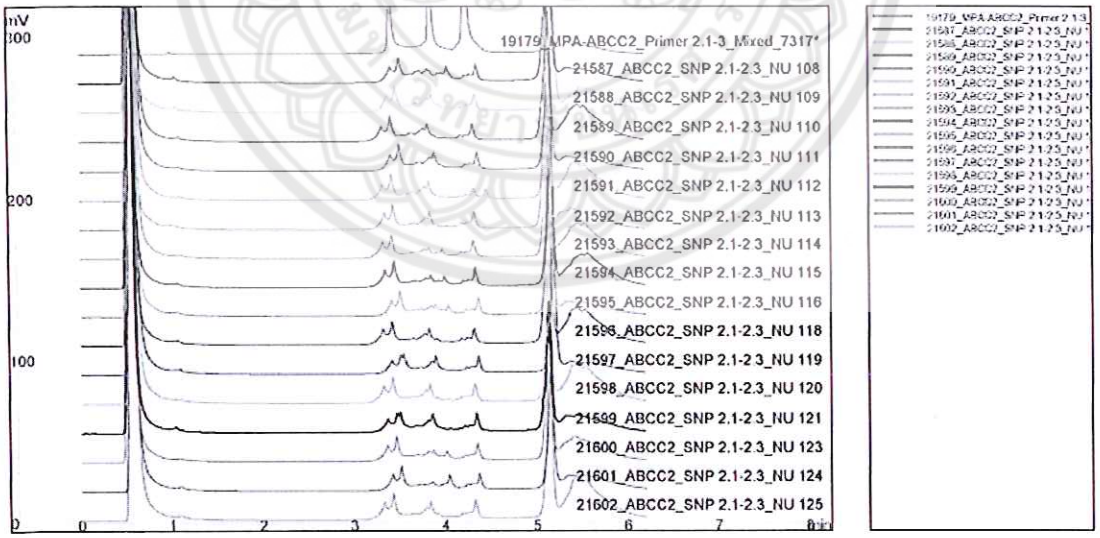
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:59:54 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 2.1-2.3_Method 7317_10-25-45,4-4.7'_NU 108-125_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 20:01:18 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak

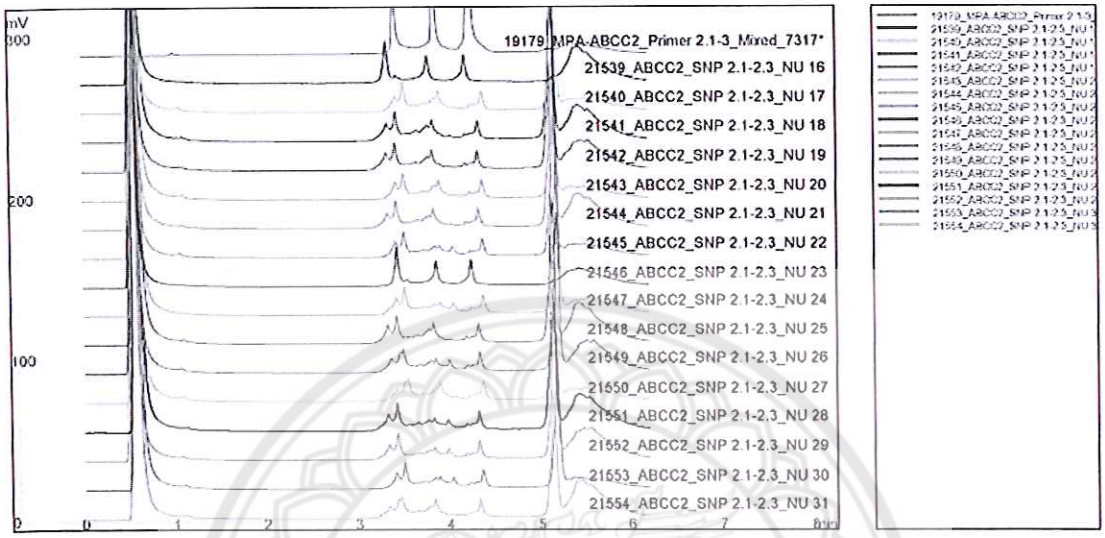


Primer SNPs ชุดที่ 2

ABCC2_SNP 2.1-2.3_Method 7317_10-25-45,4-4.7'_NU 16-31_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

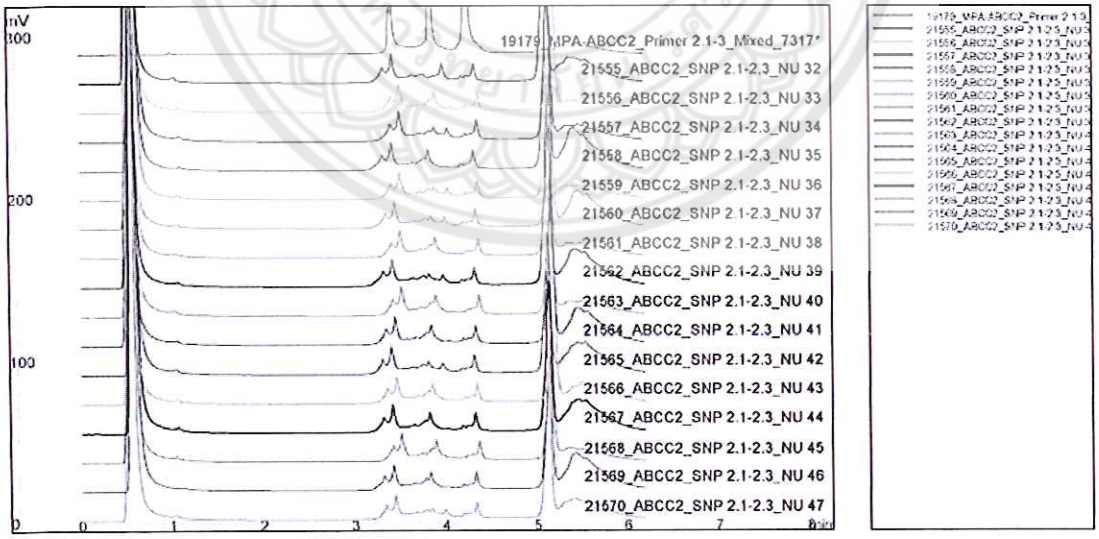
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:55:50 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 2.1-2.3_Method 7317_10-25-45,4-4.7'_NU 32-47_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

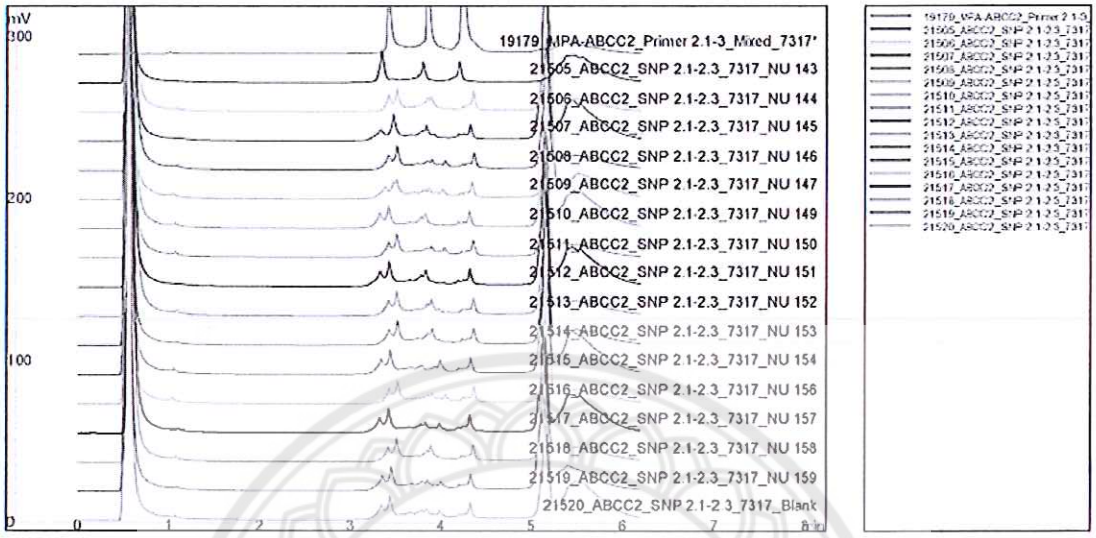
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:58:15 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 2.1-2.3_Method 7317_10-25-45,4-4.7'_NU 143-159_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

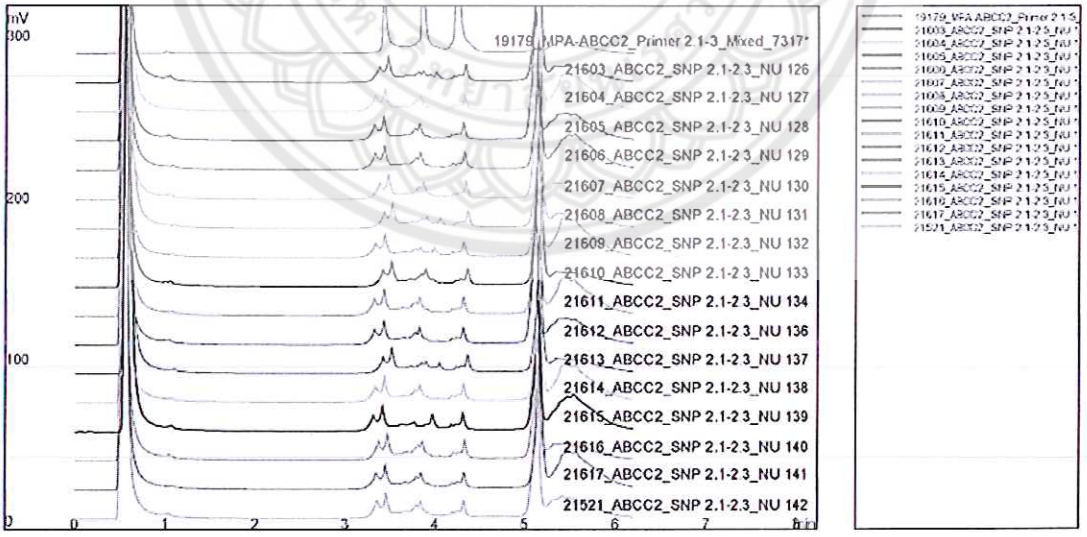
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 20:04:48 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 2.1-2.3_Method 7317_10-25-45,4-4.7'_NU 126-142_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

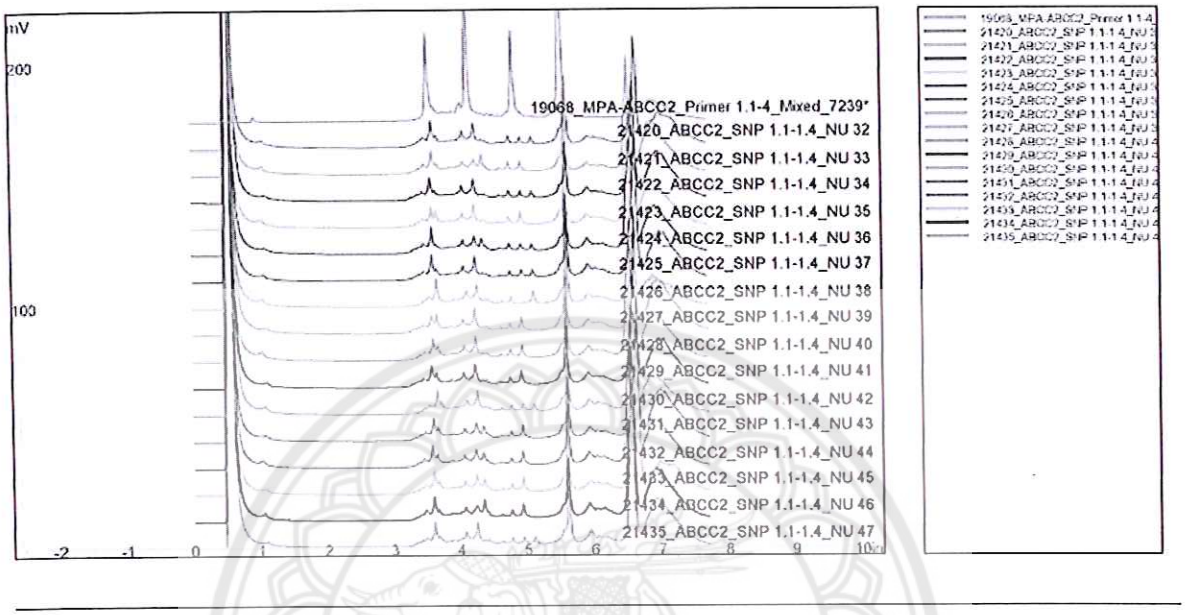
User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 20:03:04 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



ABCC2_SNP 1.1-1.4_Method 7239_10-25-45,4-4.7'_NU 32-47_11-7-56

CONSOLIDATED ANALYSIS REPORT

User: WADMIN
Date: Tue Jul 30 19:20:40 GMT-
Selection: Chromatogram + Peak



Code	1.1 -1019 A>G	1.2 -1023 G>A	1.3 -1549 G>A (-139-1410 A>G)	1.4 -24 C>T	2.1 1249 G>A (21214 A>G)	2.2 61606 A>G	2.3 4544G>A (686933A>G)
NU 022	G G	G G	G A	C C	A A	G A	A A
NU 023	G G	G A	G G	C C	G G	G G	GG
NU 024	G G	G G	G A	C C	A A	G A	A A
NU 025	G A	A A	G G	C C	G G	G G	G G
NU 026	G G	G G	G A	C C	G A	G A	G G
NU 027	G G	G A	G G	C C	A A	G G	A A
NU 028	G A	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 029	G G	GA	G A	C C	G G	G A	G G
NU 030	G G	G G	A A	C C	A A	G A	A A
NU 031	G G	G A	G G	C C	G A	G G	G G
NU 032	G G	G G	G A	C C	G G	A A	G G
NU 033	G A	G G	G G	C C	A A	G G	A A
NU 034	G G	G G	G A	C C	A A	G A	A A
NU 035	G G	G A	G G	C C	G G	G G	G G
NU 036	G A	GA	G A	C C	A A	G A	A A
NU 037	G G	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 038	G G	A A	A A	C C	A A	G G	A A
NU 039	G G	G A	G G	C C	G G	G A	G G
NU 040	G G	A A	G G	C C	A A	G G	A A
NU 041	G G	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 042	G G	A A	G A	C C	G G	G A	G G
NU 043	G A	G G	G G	C C	A A	G G	G G
NU 044	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 045	G A	G G	G G	C C	A A	G G	A A
NU 046	A A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 047	G G	G G	G A	C C	G G	G A	G G

Code	1.1 -1019 A>G	1.2 -1023 G>A	1.3 -1549 G>A (-139-1410 A>G)	1.4 -24 C>T	2.1 1249 G>A (21214 A>G)	2.2 61606 A>G	2.3 4544G>A (686933A>G)
NU 048	G G	A A	G G	C C	G A	G G	A A
NU 049	G G	A A	G G	C C	G G	G G	G G
NU 050	G G	A A	G A	C C	A A	G A	A A
NU 051	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 052	G A	A A	G G	C C	G G	G G	G G
NU 053	G G	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 054	G G	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 055	G A	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 056	G A	A A	G G	C C	A A	G G	A A
NU 101	G G	G G	A A	C C	G G	A A	G G
NU 103	G A	A A	G A	C C	A A	G A	GG
NU 104	G A	A A	G G	C C	G G	G G	G G
NU 105	G A	G G	G G	C C	G A	G G	G G
NU 106	G G	A A	G G	C C	GG	G G	G G
NU 107	G G	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 108	G G	A A	A A	C C	A A	G A	A A
NU 109	G A	G G	G A	C C	A A	G G	G G
NU 110	G G	A A	G A	C C	G G	G G	G G
NU 111	G G	A A	G G	C C	A A	G G	A A
NU 112	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G A
NU 113	G G	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 114	G A	A A	G A	C C	G G	G A	G G
NU 115	G A	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 116	G A	G G	G A	C C	A A	G A	A A
NU 118	G G	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 119	G A	G G	G G	C C	G A	G G	A A

Code	1.1 -1019 A>G	1.2 -1023 G>A	1.3 -1549 G>A (-139-1410 A>G)	1.4 -24 C>T	2.1 1249 G>A (21214 A>G)	2.2 61606 A>G	2.3 4544G>A (686933A>G)
NU 120	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 121	G G	AA	G G	C C	G A	G G	G G
NU 123	G A	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 124	G G	G G	A A	C C	A A	A A	A A
NU 125	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 126	G G	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 127	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 128	G G	G G	G A	C C	G G	G G	G G
NU 129	G G	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 130	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 131	G G	A A	G A	C C	A A	G A	A A
NU 132	G A	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 133	G A	G G	G G	C C	A A	G G	A A
NU 134	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 136	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 137	G G	G G	G A	C C	A A	G A	A A
NU 138	G G	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 139	G G	G G	A A	C C	G G	A A	G G
NU 140	G A	A A	G G	C C	G G	G G	G G
NU 141	G G	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 142	G A	G G	G A	C C	G G	G G	G G
NU 143	G G	G G	A A	C C		GA	GG
NU 144	G G	G G	G A	C C	GG	G A	A A
NU 145	G A	G G	G G	C C	G G	G G	G G
NU 146	G G	G G	G A	C C	A A	G A	A A
NU 147	G G	G G	G A	C C	GG	G A	G G

Code	1.1 -1019 A>G	1.2 -1023 G>A	1.3 -1549 G>A (-139-1410 A>G)	1.4 -24 C>T	2.1 1249 G>A (21214 A>G)	2.2 61606 A>G	2.3 4544G>A (686933A>G)
NU 149	G G	GG	A A	C C	G G	G G	G G
NU 150	G G	AA	G G	C C	A A	G A	A A
NU 151	G G	G A	G G	C C	G G	G G	G G
NU 152	G G	G G	G G	C C	A A	G G	A A
NU 153	G A	A A	G A	C C	A A	G G	A A
NU 154	G G	G G	G G	C C	G G	A A	G G
NU 156	G G	G G	G A	C C	A A	G A	A A
NU 157	G G	G G	G A	C C	G G	G A	G G
NU 158	G G	A A	G G	C C	A A	G G	A A
NU 159	G A	A A	G G	C C	G G	G A	G G