

ความสัมพันธ์ของยีนกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรสกับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในคนไทย



นางสาวกัญนิกา ประดับแก้ว

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ASSOCIATION OF *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE* GENES AND BLADDER CANCER  
IN THAIS



Miss Kannika Pradabkaew

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

Department of Pharmacology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ของยีนกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรสกับมะเร็ง  
กระเพาะปัสสาวะในคนไทย

โดย

นางสาวกัญญิกา ประดับแก้ว

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา

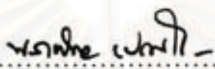
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

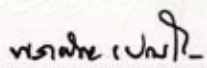
นายแพทย์ ชรินทร์ ลิ้มวงศ์

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

 ..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน)

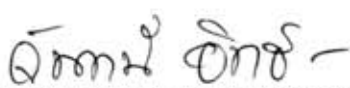
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ พันตำรวจโทหญิง ดร.สมทรง ลาวณิชย์ประเสริฐ)

 ..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน)

 ..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(นายแพทย์ ชรินทร์ ลิ้มวงศ์)

 ..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาน ธรรมอุปกรณ์)

 ..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์จันทน์ อธิพานิชพงศ์)

กัญนิภา ประดับแก้ว : ความสัมพันธ์ของยีนกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรสกับมะเร็งกระเพาะ  
ปัสสาวะในคนไทย. (ASSOCIATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENES AND  
BLADDER CANCER IN THAIS) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน,  
อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.นพ. ชนินทร์ ลิ้มวงศ์, 71 หน้า.

ยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่างกันไปในแต่ละบุคคล และมี  
ผลต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากร งานวิจัยนี้ทำการศึกษา  
ความสัมพันธ์ของยีนกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรสกับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในคนไทย โดยเปรียบเทียบ  
กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 139 คน กับคนปกติ 278 คน ไม่พบความแตกต่างในการเพิ่มความ  
เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในกลุ่มที่มีจีโนไทป์ *GSTM1* homozygous mutant (OR = 0.7414,  
95% CI = 0.2722-2.0195,  $p = 0.5569$ ) และ *GSTT1* homozygous mutant (OR = 1.4706, 95% CI =  
0.8510 - 2.5411,  $p = 0.1659$ ) แต่ในกลุ่มจีโนไทป์ *GSTP1*(Ile/Val) มีความความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งใน  
กระเพาะปัสสาวะน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (OR = 0.5275, 95% CI = 0.3331-0.8353,  $p = 0.0060$ ) และเมื่อ  
ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนสองชนิดต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าความเสี่ยงเพิ่มขึ้น  
เมื่อมีจีโนไทป์ *GSTP1* เป็น wild type และ *GSTT1* เป็น heterozygous mutant (OR = 2.3866, 95% CI =  
1.2410-4.5896,  $p = 0.0083$ ) หรือ homozygous mutant (OR = 2.4421, 95% CI = 1.2175-4.8985,  
 $p = 0.0110$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีจีโนไทป์ *GSTT1* เป็น wild type กับ *GSTP1* (Ile / Val or Val / Val)  
จะลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (OR = 0.5866, 95% CI = 0.3464-0.9932,  $p = 0.0460$ )  
จึงอาจกล่าวได้ว่า *GSTP1* (Ile / Val) genotype มีความเกี่ยวข้องกับการลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง  
กระเพาะปัสสาวะ

## สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ภาสัชวิทยา  
สาขาวิชา ภาสัชวิทยา  
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต ..... กัญนิภา ประดับแก้ว  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ..... พรเพ็ญ เปรมโยธิน  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....



##4976554933 : MAJOR Pharmacology

๑

KEY WORD: PHARMACOGENETICS / POLYMORPHISMS / GLUTATHIONE S-TRANSFERASE /  
BLADDER CANCER

KANNIKA PRADABKAEW : ASSOCIATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENES  
AND BLADDER CANCER IN THAIS. THESIS PRINCIPLE ADVISOR : ASSOC.  
PROF.PORNPEN PRAMYOTHIN,Ph.D, THESIS CO-ADVISOR : CHANIN LIMWONGSE, M.D.

71 pp.

Genes encoding for glutathione S-transferases Mu-1, Pi-1 and Theta-1 (*GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1*) isoforms are polymorphic and reportedly associated with susceptibility to bladder cancer which varied in different populations. This study examined the polymorphisms of *GSTM1*, *GSTP1* and *GSTT1* genes in association with bladder cancer in Thais including 139 bladder cancer patients and 278 control subjects. There was non-significant association in null alleles of *GSTM1* (OR = 0.7414, 95% CI = 0.2722-2.0195,  $p = 0.5569$ ) and *GSTT1* (OR = 1.4706, 95% CI = 0.8510-2.5411,  $p = 0.1659$ ) with risk of bladder cancer. However *GSTP1* (Ile / Val) individuals showed the lesser bladder cancer risk than the control (OR = 0.5275, 95% CI = 0.3331-0.8353,  $p = 0.0060$ ). The combined analysis of *GSTP1* genotype wild type and *GSTT1* heterozygous mutant (OR = 2.3866, 95% CI = 1.2410-4.5896,  $p = 0.0083$ ) and null alleles (OR = 2.4421, 95% CI = 1.2175-4.8985,  $p = 0.0110$ ) demonstrated the increased risk of bladder cancer while the combined *GSTT1* wild type and *GSTP1* (Ile / Val or Val / Val) showed the decrease in risk of bladder cancer (OR = 0.5866, 95% CI = 0.3464-0.9932,  $p = 0.0460$ ). This study suggests that Thai subjects with *GSTP1* (Ile / Val) genotype may associate with decreased risk for bladder cancer.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department      Pharmacology  
Field of Study    Pharmacology  
Academic Year    2007

Student's Signature : .....Kannika Pradabkaew.....  
Principle Advisor's Signature : .....Porpen Pramyothin.....  
Co-advisor's Signature : .....Chanin Limwongse.....

## กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทุกด้าน คำปรึกษาที่ยิ่ง ตลอดจนคำแนะนำ ความรู้และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์นายแพทย์ชนินทร์ ลิ้มวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมจากภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ซึ่งกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.วรรณาทอง นพคุณ หน่วยอนุพันธุศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ซึ่งกรุณาให้คำปรึกษาในการใช้ทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ภญ. เพ็ญรัตน์ สุวรรณศรี และ ภก. อนันต์ชัย อัสวเมชิน ซึ่งกรุณาให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในการใช้ทำวิจัย ขอขอบพระคุณหน่วยอนุพันธุศาสตร์ คุณไกรฤกษ์ ทวีเชื้อ คุณธีระพงษ์ โพธิ์เอี่ยมและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์บัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเภสัชวิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ตลอดการศึกษาระดับปริญญาโท

และท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่ท่านได้ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาและให้กำลังใจและสิ่งที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา รวมทั้งบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวถึง ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ .....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ณ
สารบัญภาพ .....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ .....	5
ความสำคัญของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อความเสี่ยง ในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ .....	7
เอนไซม์ glutathione-S-transferase (GSTs) .....	10
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>glutathione-S-transferase (GST)</i> .....	14
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>glutathione-S-transferase (GST)</i> กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ .....	17
3 วิธีดำเนินการวิจัย	
ประชากร.....	21
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	22
การเตรียม DNA .....	23

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>GSTM1</i> , <i>GSTP1</i> และ <i>GSTT1</i> .....	25
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
ผลการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>GST</i> .....	37
ผลการเปรียบเทียบปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน.....	42
ผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อระดับความรุนแรง ของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ .....	46
ผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>GSTM1</i> , <i>GSTP1</i> และ <i>GSTT1</i> เมื่อแยกตามจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ที่แบ่งตามประวัติการสูบบุหรี่.....	47
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	49
รายการอ้างอิง .....	52
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	58



## สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. การแบ่งระดับและลักษณะของเซลล์เนื้องอกกระเพาะปัสสาวะ.....	5
2. ข้อมูลเบื้องต้นของ GSTs ทั้ง 8 กลุ่ม .....	13
3. แสดงข้อมูลเบื้องต้นของยีน <i>GSTM1</i> , <i>GSTP1</i> และ <i>GSTT1</i> .....	14
4. แสดงค่า odds ratios และ 95% confidence intervals ในการศึกษาความสัมพันธ์ ของ <i>GSTP1</i> null allele กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....	18
5. แสดงค่า odds ratios และ 95% confidence intervals ในการศึกษาความสัมพันธ์ ของ <i>GSTM1</i> genotype กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ .....	19
6. แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ใน PCR .....	26
7. GST genotype ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม .....	41
8. GST genotype ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมเมื่อพิจารณา ยีน <i>GSTM1</i> และ <i>GSTT1</i> โดยดูเฉพาะ present หรือ null allele .....	42
9. การเปรียบเทียบ Double GST genotype ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เมื่อพิจารณา ยีน <i>GSTM1</i> และ <i>GSTT1</i> เป็น present หรือ null และ ยีน <i>GSTP1</i> เป็น <i>GSTP1 (Ile/Ile)</i> และ <i>GSTP1 (Ile/Val Or Val/Val)</i> .....	43
10. การเปรียบเทียบ double GST genotype ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เมื่อพิจารณา ยีน <i>GSTM1</i> และ <i>GSTT1</i> เป็น present หรือ null และ ยีน <i>GSTP1</i> เป็น <i>GSTP1 (Ile/Ile)</i> , <i>GSTP1 (Ile/Val)</i> และ <i>GSTP1(Val/Val)</i> .....	44
11. การเปรียบเทียบ Double GST genotype ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เมื่อพิจารณา ยีน <i>GSTM1</i> และ <i>GSTT1</i> เป็น wild type, Heterozygous allele และ Mutant และ ยีน <i>GSTP1</i> เป็น <i>GSTP1 (Ile/Ile)</i> , <i>GSTP1 (Ile/Val)</i> และ <i>GSTP1(Val/Val)</i> .....	45
12. แสดงผลการคำนวณจากโปรแกรม MDR .....	46
13. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกับ <i>GSTM1</i> genotype.....	46

14. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกับ <i>GSTP1</i> genotype .....	47
15. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกับ <i>GSTT1</i> genotype .....	47
16. แสดงผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>GSTM1</i> , <i>GSTP1</i> และ <i>GSTT1</i> เมื่อแยกตามจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ที่แบ่งตามประวัติการสูบบุหรี่ .....	48



## สารบัญภาพ

ฉ

รูปที่	หน้า
1. ชนิดของ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ที่กระจายตัวอยู่ในส่วนต่างๆ ของยีนมนุษย์ .....	8
2. งานวิจัยทางเภสัชพันธุศาสตร์แบบ candidate gene association study และ genome-wide association study .....	9
3. แสดงการเปลี่ยนแปลงของ benzene โดยเอนไซม์ cytochrome 450 .....	11
4. ยีน <i>GSTM1</i> บนโครโมโซม 1p13.3 .....	15
5. ยีน <i>GSTP1</i> บนโครโมโซม 11q13 .....	16
6. ยีน <i>GSTT1</i> บนโครโมโซม 22q11.2 .....	17
7. แสดงตำแหน่งการจับของ primer A1, A2 และการแปลผล ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>GSTM1</i> จาก band ของ PCR product ที่เกิดขึ้น .....	27
8. แสดงการอ่านผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>GSTM1</i> จากกราฟ DHPLC .....	29
9. แสดงตำแหน่งการจับของ primer E1, E2 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BsmAI</i> และการแปลผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>GSTP1</i> จาก band ของ PCR product ที่เกิดขึ้น .....	32
10. แสดงตำแหน่งการจับของ primer F1, F2 และ G1, G2 และการแปลผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>GSTT1</i> จาก band ของ PCR product ที่เกิดขึ้น .....	35
11. ผล gel electrophoresis ของ <i>GSTM1</i> genotype .....	37
12. ผล gel electrophoresis ของ PCR product จากยีน <i>GSTP1</i> หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BsmAI</i> .....	38
13. ผล gel electrophoresis ของ <i>GSTT1</i> genotype .....	38
14. ผล Real-Time PCR .....	39
15. ผลของ DHPLC .....	40

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	adenine
$\beta$	=	beta
BPDE	=	benzo[ $\alpha$ ]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide
C	=	cytosine
CI	=	confidence interval
DHPLC	=	denaturing high performance liquid chromatography
DNA	=	deoxyribonucleic acid
G	=	guanine
GSTs	=	enzyme glutathione S-transferase
IBC	=	Invasive bladder cancer
Ile	=	isoleucine
Lys	=	lysine
$\mu$ l	=	microlitre
mg	=	milligram
MgCl <sub>2</sub>	=	magnesium chloride
min	=	minute
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
MRP	=	Multidrug-resistance protein
ng	=	nanogram
PAH	=	polycyclic aromatic hydrocarbon
PCR	=	polymerase chain reaction
RBC	=	red blood cell
rpm	=	round per minute
SBC	=	Superficial bladder cancer
SNP	=	Single nucleotide polymorphism
SDS	=	sodium decadocyl sulfate(SDS)

T = thymine  
U = unit  
Val = Valine



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจัดเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับห้าของมะเร็งที่พบในชายไทย (1) และอุบัติการณ์ในการเกิดเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี สาเหตุหลักอย่างหนึ่งของการเกิดมะเร็งชนิดนี้คือการสูบบุหรี่ รองลงมาคือการประกอบอาชีพที่มีความเกี่ยวข้องกับกาได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น การทำงานในโรงงานผลิตสีหรือโรงงานฟอกหนัง เป็นต้น(2) กลไกที่ทำให้ปัจจัยเหล่านี้เป็นสาเหตุหลักเกิดจากการที่บุหรี่และสารพิษเหล่านั้นให้สารประกอบประเภท polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) และสารอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติเป็น electrophilic และมีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ และองค์ประกอบบางชนิดของเซลล์ เช่น DNA ซึ่งจะทำให้ DNA เสียหายสะสมอยู่ในเซลล์ จนเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์ ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของหน้าที่การทำงานของเซลล์ระหว่างการเจริญเติบโต กับการตายที่ถูกกำหนดไว้แล้ว (apoptosis) จนเกิดเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด ทั้งนี้โดยปกติร่างกายจะสามารถจัดการกับสารต่างๆ เหล่านี้ได้โดยการอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในร่างกายทั้ง Phase I และ Phase II biotransformation ในการเปลี่ยนแปลงให้เป็นสารที่มีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้นและขับออกจากร่างกายได้

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Polymorphisms) อาจเกิดจากการเกิดการแทนที่ของลำดับเบส (nucleotide substitutions) การขาดหายไปของยีน (deletion) ซึ่งความแตกต่างเหล่านี้ อาจส่งผลหรือไม่ส่งผลต่อการทำงานของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นก็ได้ ทั้งนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ใน Phase II biotransformation ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการขจัดความเป็นพิษของสารต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายโดยเฉพาะสารก่อมะเร็งนั้น จะส่งผลกระทบต่อการควบคุมและความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะมะเร็งกระเพาะปัสสาวะซึ่งปัจจัยเสี่ยงหลักเกิดจากการสูบบุหรี่และการได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อมดังกล่าว จึงมีหลายงานวิจัยที่ทำการศึกษาความเกี่ยวข้องระหว่างความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงสารพิษต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ใน Phase II biotransformation เช่น เช่น N-acetyltransferase (NAT), Glutathione S-transferases (GSTs), Sulfotransferases (SULTs) และ Myeloperoxidase เป็นต้น รวมทั้งเอนไซม์ใน Phase I

Cytochromes P-450 ก็ถูกนำมาศึกษามากเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะ CYP2D6, CYP2C19 และ CYP2E1(3)

เอนไซม์ GSTs มีบทบาทสำคัญในการขจัดความเป็นพิษของสารต่างๆ หลายชนิดและยังพบปริมาณมากถึง 10% ของ cytosolic enzyme ที่พบในร่างกาย (4) จึงถูกนำมาศึกษาถึงการทำงานและปัจจัยในแง่ต่างๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งหลายชนิด โดยเฉพาะการเกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งเชื่อว่าเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ โดยกลุ่มเอนไซม์ Glutathione S-transferase จะถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีนอย่างน้อย 8 กลุ่ม คือ Alpha, Mu, Pi, Sigma, Omega, Theta, Zeta และ Kappa จากข้อมูลทางด้านโครงสร้างและข้อมูลทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาทำให้ทราบว่าในแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกหลายชนิด และเอนไซม์ที่เกิดขึ้นจะพบในปริมาณที่แตกต่างกันไปในแต่ละเนื้อเยื่อตามการกระจายตัวของยีน เช่น พบเอนไซม์ GSTs ชนิด Mu 1 มากในตับ และพบเอนไซม์ GSTs ชนิด Pi 1 มากในปอด(5) เป็นต้น

มีการศึกษาความเกี่ยวข้องของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน GST กลุ่มต่างๆ กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะซึ่งอาจให้ผลแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มประชากร เช่น การศึกษา meta-regression analysis *GSTP1* (Ile/Val) กับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่ามีความแตกต่างกันของค่า odds ratios ในกลุ่มคนยุโรป อเมริกัน และเอเชีย(6) โดยพบว่าในกลุ่มคนอินเดียให้ผลความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเมื่อมีจีโนไทป์เป็น *GSTP1* (Ile/Val) (7) ในขณะที่การศึกษาในกลุ่มคนจีนไม่พบนัยสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ดังกล่าว(8) ส่วนยีน *GSTM1* จีโนไทป์ homozygous mutant ที่พบความถี่ค่อนข้างสูงในหลายกลุ่มประชากรนั้น จะพบแนวโน้มในการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะค่อนข้างชัดเจน(9) ในขณะที่ *GSTT1* homozygous mutant กลับให้ผลที่ไม่แน่นอนนัก โดยในการศึกษาจะพบแนวโน้มในการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่บางการศึกษาไม่พบนัยสำคัญทางสถิติของผลดังกล่าว (10,11) ซึ่งทั้งนี้อาจเป็นเพราะนอกจากความแตกต่างทางลักษณะทางพันธุกรรมแล้ว ปัจจัยอื่นๆ ก็ยังมีผลต่อการเกิดโรคด้วย เช่น การรับประทานอาหาร และการสัมผัสสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1* ในกลุ่มคนสุขภาพดีพบ *GSTM1* genotype homozygous mutant ร้อยละ 62.7 (12) เพียงหนึ่งยีน และยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในคนไทย งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *Glutathione S-transferase* ทั้ง 3 subtype ได้แก่ *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ซึ่งพบเป็น

ปริมาณสูงในร่างกาย และเป็นกลุ่มหลักในการเปลี่ยนแปลงสารในกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon ที่พบในบุหรี่ ซึ่งการสูบบุหรี่เป็นปัจจัยเสี่ยงหลักในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้จะทำการวิเคราะห์ถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน (gene interaction) ทั้งสามชนิดควบคู่กัน และผลของจีโนไทป์เมื่อเปรียบเทียบกับระดับความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยข้อมูลจากการวิจัยจะเป็นประโยชน์ทั้งในแง่การเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการประเมินปัจจัยเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในกลุ่มคนไทยต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทราบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีนกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* กับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในคนไทย

### ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาแบบ case-control study (unmatched) design ประกอบไปด้วยกลุ่มทดลองมีผู้เข้าร่วมวิจัยจำนวน 139 คน และกลุ่มควบคุมมีผู้เข้าร่วมวิจัยจำนวน 278 คน โดยกลุ่มทดลองคือผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ได้รับการวินิจฉัยและมีการยืนยันโดยผลทางพยาธิวิทยาว่าเป็นเนื้องอกของกระเพาะปัสสาวะชนิดทรานซิชันแนลเซลล์ที่เคยได้รับการรักษาและ/หรือติดตามที่แผนกศัลยกรรมศัลยกรรมโรจวิทยาโรงพยาบาลศิริราช และกลุ่มควบคุมคือผู้มาบริจาคเลือดที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดของโรงพยาบาลศิริราชที่ไม่ได้เป็นมะเร็งและไม่มีความวิตกว่ามีใครในครอบครัวเป็นมะเร็ง โดยจะทำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* และหาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ที่พบในทั้งสองกลุ่มเพื่อเปรียบเทียบและประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

### วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้จะตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. คัดเลือกกลุ่มประชากรทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมที่จะเข้าร่วมในงานวิจัยตามข้อกำหนด และมีจำนวนตามที่ได้จากการคำนวณด้วยโปรแกรม QUANTO ver 1.1
2. นำตัวอย่าง DNA ของผู้เข้าร่วมการวิจัยมาทำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งกลุ่มทดลองจะใช้ดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่เหลืออยู่ จากโครงการวิจัยเรื่อง

ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพี (ซีวายพี) 450 ทุติยิกส์ ในผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นเนื้องอกของกระเพาะปัสสาวะ และกลุ่มควบคุมคือผู้มาบริจาคเลือดที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดของโรงพยาบาลศิริราชที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง และไม่มีประวัติว่ามีคนในครอบครัวเป็นมะเร็ง

3. เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนทั้งสามชนิดคือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่สนใจด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งจะใช้ทั้งหมด 3 เทคนิค คือ multiplex-PCR, PCR-RFLP และ Real-Time PCR รวมทั้งใช้ DHPLC ในการตรวจสอบเพิ่มเติมสำหรับ *GSTM1*

4. บันทึกข้อมูลลงในโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อนำไปคำนวณหาร้อยละความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความแตกต่างของความถี่ของ genotype ที่พบในกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยใช้สถิติ chi-square

5. ทำการวิเคราะห์หาปฏิสัมพันธ์ของยีน (gene interaction or epistasis) *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเนื้องอกของกระเพาะปัสสาวะ โดยใช้โปรแกรม multifactor dimensionality reduction (MDR) สามารถดาวน์โหลดได้จาก <http://sourceforge.net/projects/mdr/>

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับ normal alleles ของยีนกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* สำหรับใช้ในการศึกษาทาง Pharmacogenetic ในคนไทยต่อไป
2. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีนกลูตาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* กับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในคนไทย

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

กระเพาะปัสสาวะเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่เก็บรวบรวมปัสสาวะจากไตก่อนการขับออกจากร่างกาย ชั้นของเซลล์หลายชั้นประกอบขึ้นเป็นผนังกระเพาะปัสสาวะ โดยชั้นในสุดหรือชั้นแรกสัมผัสสัมผัสกับปัสสาวะโดยตรงเรียกว่า urothelial หรือ mucosal layer ชั้นถัดมาคือชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและชั้นกล้ามเนื้อเรียบตามลำดับ ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยใหม่กว่าร้อยละ 70-80 จะพบเนื้องอกในชั้นแรกหรือชั้นที่สองของผนังกระเพาะปัสสาวะ เรียกว่า Superficial bladder cancer (SBC) ส่วนกรณีที่เนื้องอกเจริญบุกรุกเข้าสู่ชั้นของกล้ามเนื้อเรียบจะถูกเรียกว่า Invasive bladder cancer (IBC)(2)

#### ตารางที่ 1 การแบ่งระดับและลักษณะของเซลล์เนื้องอกกระเพาะปัสสาวะ(2)

Stage	Description
Superficial bladder cancer	
Ta	Papillary tumor confined to the urothelium and projecting toward the lumen (noninvasive papillary carcinoma)
T1	Papillary tumor invading the underlying lamina propria (tumor invades subepithelial connective tissue)
Tis	Flat, reddened lesion on cystoscopic appearance. High-grade histologic features confined to the urothelium (carcinoma in situ)
Invasive bladder cancer	
T2	T2a: Tumor invades the inner half of the smooth muscle layer T2b: Tumor invades the outer half of the smooth muscle layer
T3	T3a: Tumor invades the fat layer on microscopic examination T3b: Tumor invades the fat layer on macroscopic examination (a so-called extravesical mass)
T4	T4a: Tumor invades the prostate, ureter or vagina T4b: Tumor invades the pelvic or abdominal wall
N+	Tumor has invaded a local lymph node
M+	Tumor has metastasized and progressed to a distant organ



อุบัติการณ์ในการเกิดโรค และอัตราการตายจากมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีความแตกต่างกันในแต่ละ เชื้อชาติ เพศ และอายุ โดยพบว่าในกลุ่มคนคอเคเซียนจะมีอุบัติการณ์ในการเกิดโรค 17.7 ต่อประชากร 100,000 คน อเมริกัน-แอฟริกัน 9.2 ต่อประชากร 100,000 คน และคนเอเชีย 7.5 ต่อ 100,000 คน ซึ่งในคนไทยพบประมาณ 5 ต่อ ประชากร 100,000 คน(1) โดยเพศชายจะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมกกว่าเพศหญิง 3 เท่า และผู้ที่มีอายุมากกว่า 70 ปี จะมีความเสี่ยงสูงกว่ากลุ่มคนอายุ 55-69 ปี ถึง 3 เท่า(2)

ความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีทั้งปัจจัยจากสภาพแวดล้อมและปัจจัยทางด้านพันธุกรรม ซึ่งปัจจัยเสี่ยงอันดับหนึ่งจากสภาพแวดล้อมคือการสูบบุหรี่ โดยพบว่าผู้ที่สูบบุหรี่จะมีความเสี่ยงสูงกว่าผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ถึงสามเท่า นอกจากนี้การทำงานที่มีความเกี่ยวข้องกับสารเคมีในกลุ่ม benzene derivatives และ arylamines เองก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ โดยพบว่าผู้ป่วยร้อยละ 25 เป็นผู้ที่ต้องสัมผัสกับสารเคมีต่างๆ ระหว่างการทำงานเช่น อุตสาหกรรมยาง สีย้อม หรืออุตสาหกรรมการฟอกหนัง(13) นอกจากนี้มีการศึกษาที่พบว่าผู้หญิงที่ย้อมสีผมเดือนละครั้งจะมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมากกว่าผู้ที่ไม่ย้อมสีผม 2 เท่า และความเสี่ยงจะเพิ่มขึ้นเป็น 3.3 เท่า เมื่อใช้ยาย้อมสีผมติดต่อกันเป็นเวลานานเกิน 15 ปี รวมทั้งผู้ที่ทำงานเป็นช่างทำผมเป็นเวลามากกว่า 10 ปี ก็จะมีความเสี่ยงมากกว่าปกติถึง 3 เท่า(14) นอกจากนี้ยังอาจมีปัจจัยเสี่ยงที่พบเฉพาะในบางประเทศหรือบางพื้นที่ เช่น ปัจจัยเสี่ยงจากการติดเชื้อ *Shistosoma haematobium* ที่พบในทวีปแอฟริกา ซึ่งจะทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังและไปมีผลในการขัดขวางกระบวนการกำจัดความเป็นพิษของสารก่อมะเร็งที่เข้าสู่ร่างกาย รวมทั้งปัจจัยเสี่ยงจากสภาวะแวดล้อมอื่นๆ ที่ถือว่าไม่มีความเกี่ยวข้องกับสารก่อมะเร็ง ได้แก่ การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การฉายรังสีที่อุ้งเชิงกราน การมีผลึกแคลเซียมเกาะในท่อทางเดินปัสสาวะ การได้รับยา chlonaphazine หรือ cyclophosphamide เป็นต้น(2)

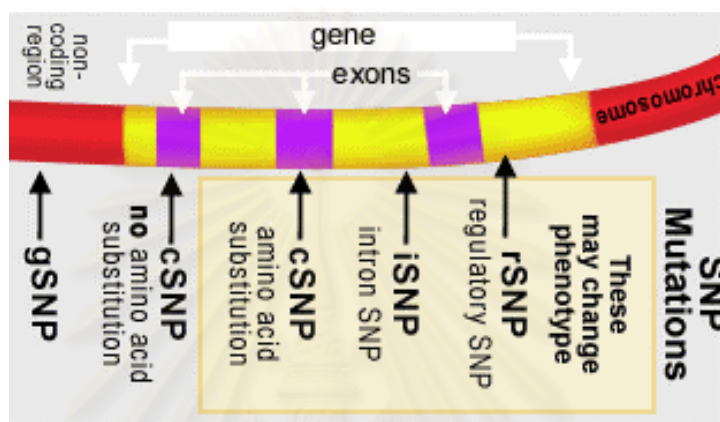
สำหรับปัจจัยเสี่ยงทางด้านพันธุกรรมนั้น พบว่าเมื่อมีการควบคุมปัจจัยด้านการสูบบุหรี่และการได้รับสารจากสภาวะแวดล้อมแล้ว เพศชายจะมีความเสี่ยงสูงกว่าเพศหญิง ทั้งนี้อาจเกิดจากลักษณะและรูปแบบในการสืบทอดมหายใจขณะสูบบุหรี่หรืออาจเกิดจากระยะเวลาในการดำเนินไปของโรคที่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างระหว่างเพศ(2)

## 2.2 ความสำคัญของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะ

ความแตกต่างทางพันธุกรรมของมนุษย์ในแต่ละบุคคล เกิดจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนม ความแตกต่างนี้พบได้ในอัลลีลของยีนโพลีมอร์ฟิสม์ใดโพลีมอร์ฟิสม์หนึ่งที่มีชนิดของอัลลีลมากกว่า 2 ชนิด หากอัลลีลชนิดที่พบน้อยกว่ามีความถี่มากกว่าร้อยละ 1 ของประชากร ความแตกต่างของอัลลีลเหล่านี้เรียกว่า genetic polymorphism และ ยีนในตำแหน่งนี้เรียกว่า polymorphic locus ในจีโนมของมนุษย์มี genetic polymorphism หลายแบบ ได้แก่ restriction fragment length polymorphism (RFLP), variable number of tandem repeats (VNTRs) polymorphism เป็นต้น ชนิดที่พบบ่อย และมีความสำคัญในการศึกษาทางเภสัชพันธุศาสตร์นั้นคือ ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่งที่เรียกว่า single nucleotide polymorphisms (SNPs) SNPs มีการกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม ทั้งส่วนของจีโนมที่สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีน (coding region) และส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน (non-coding region) โดยประมาณการว่าจะพบ SNPs ในทุกๆ หนึ่งพันนิวคลีโอไทด์ แต่จากข้อมูลล่าสุดในฐานข้อมูล SNPs (SNP database; dbSNPs) SNPs สามารถพบได้ทุกๆ 300-500 นิวคลีโอไทด์ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่งอาจส่งผลถึงการแสดงออกของยีน ปริมาณและการทำงานของโปรตีน ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อยา หรืออาจไม่ส่งผลกระทบใดๆ ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ SNPs บนสายดีเอ็นเอ (รูปที่ 1) ดังนี้ คือ(15)

1. ในส่วนที่มีการถอดรหัส (coding SNPs; cSNPs) ถ้าการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งที่เกิดขึ้นใน triplet codon ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ เรียก SNPs นั้นว่า non-synonymous SNPs แต่ถ้า SNPs นั้นไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน จะเรียกว่า SNPs นั้นว่า synonymous SNPs ซึ่ง non-synonymous SNPs จะมีความสำคัญในการทำให้มีความแตกต่างในการตอบสนองต่อยา เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ทำให้ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิในโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของยาผิดปกติไป
2. ในส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัส ได้แก่ 5' untranslated region, 3' untranslated region, promotor region เป็นต้น SNPs นั้นอาจมีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนในการสร้างโปรตีนให้มากขึ้นหรือน้อยลง SNPs นี้เรียกว่า regulatory SNPs SNPs ที่

เกิดขึ้นในบริเวณรอยต่อระหว่าง exon และ intron (splicing site) อาจจะทำให้การตัดต่อ RNA ผิดไปจากเดิม ซึ่งทำให้มีจำนวนกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ผิดไป ส่วนการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ intervening sequence จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน

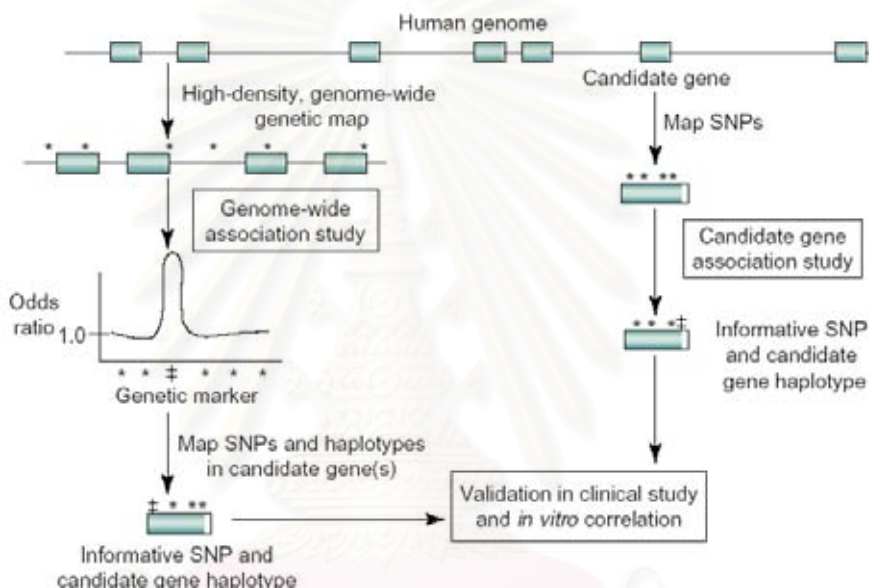


**รูปที่ 1** ชนิดของ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ซึ่งกระจายตัวอยู่ในส่วนต่างๆ ของ ยีนมนุษย์(15)

ความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้เองที่ทำให้ในปัจจุบันมีการนำความรู้ดังกล่าวมา ทำการศึกษาทางเภสัชพันธุศาสตร์ในการตรวจสอบยีนที่เป็นสาเหตุของโรค หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของยา โดยจะเป็นการหาความสัมพันธ์ของ SNPs ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกที่สนใจเทียบกับกลุ่มควบคุม การเปรียบเทียบลักษณะนี้เรียกว่า “genetic association study” งานวิจัยชนิด association study แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. candidate gene association study เป็นการศึกษาความแตกต่างของ SNPs บนยีนที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของโรค (candidate gene) โดยตรง ซึ่งงานวิจัยชนิดนี้จะต้องมีความรู้พื้นฐานทางอณูชีววิทยาที่เกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของโรค หรือการตอบสนองต่อยาเป็นอย่างดี โดยเปรียบเทียบ SNPs ในกลุ่มที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษากับกลุ่มควบคุม จากนั้นทำการจัดกลุ่ม SNPs ที่เป็นตัวแทนให้เป็น SNP haplotype เพื่อใช้ทำนายความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในกลุ่มประชากร

2. genome-wide association study เป็นการศึกษความสัมพันธ์ของ SNPs กับลักษณะบางอย่าง เช่น การหายีนก่อโรค โดยเปรียบเทียบอัลลีลของ SNPs ในกลุ่มทดลองที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษาเทียบกับกลุ่มควบคุม หากพบความแตกต่างของ SNPs ในบริเวณใดบนจีโนม ก็สามารถบอกได้ว่าในบริเวณที่พบความแตกต่างดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่ศึกษา (รูปที่ 2) โดยงานวิจัยดังกล่าวไม่จำเป็นต้องมีความรู้ทางด้านอณูชีววิทยาของลักษณะที่ต้องการศึกษา



รูปที่ 2 งานวิจัยทางเภสัชพันธุศาสตร์แบบ candidate gene association study และ genome-wide association study(15)

ดังที่กล่าวแล้วว่ามะเร็งกระเพาะปัสสาวะนั้นมีปัจจัยเสี่ยงหลักคือการสูบบุหรี่ แต่ทั้งนี้ผู้ที่สูบบุหรี่ทุกคนไม่จำเป็นจะต้องเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ หรือแม้กระทั่งในกลุ่มผู้สูบบุหรี่ที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเองก็ยังมี ความแตกต่างกันในด้าน การพัฒนาและการดำเนินไปของโรค นอกจากนี้อุบัติการณ์ในการเกิดโรคยังมีความแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อชาติ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจมีความเกี่ยวข้องกับ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงและกำจัดความเป็นพิษของสารก่อมะเร็งที่เข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นการศึกษารูปร่างความสัมพันธ์ของยีนเหล่านี้ จึงมีส่วนช่วยให้ทราบถึงความโน้มเอียงและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งจะเป็นข้อมูลส่วนหนึ่งสำหรับการเฝ้าระวังโรคต่อไป

## 2.3 เอนไซม์ glutathione-S-transferase (GSTs)

เอนไซม์ glutathione-S-transferase (GSTs) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการขจัดความเป็นพิษของสารต่างๆ ผ่านการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ glutathione conjugation ซึ่งเป็นกลไกที่ร่างกายพัฒนาขึ้นเพื่อป้องกันการเกิดความเสียหายของเซลล์จากการถูกทำลายโดยสาร electrophilic ที่อาจได้รับโดยตรงจากสภาพแวดล้อม จากภายในร่างกาย (endogenous compound) หรือจากการผ่านการเปลี่ยนแปลงจาก Phase I metabolizing enzyme

glutathione เป็นสารที่ละลายน้ำได้ ประกอบด้วยโมเลกุลของกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ glycine, glutamic acid และ cysteine สังเคราะห์ได้จากกระบวนการ de novo ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำงานโดยการเป็น non-specific reducing agent ที่เชื่อว่าทำให้โปรตีนยังคงสภาพอยู่ในรูปของ reduced thiol form ซึ่งจะป้องกันโมเลกุลของ cysteine ไม่ให้เกิดการ oxidation หรือรวมตัวกับโมเลกุลชนิดอื่นด้วยการ cross-link ผ่าน disulphide bridges (4)

กระบวนการ glutathione conjugation มีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ

1. Displacement reactions: glutathione จะเข้าแทนที่หมู่ electron-withdrawing เช่น halogen, nitriles และ carboxylic acid
2. Addition reactions : glutathione จะถูกเติมเข้าไปตรงตำแหน่งพันธะคู่หรือเติมลงในวงแหวน

ปฏิกิริยาที่พบโดยทั่วไปของกระบวนการ glutathione conjugation คือ

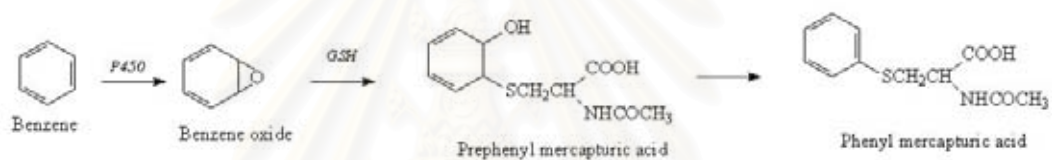


glutathione จะเข้าทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีหมู่ electrophilic โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ glutathione-S-transferase ทำให้เกิดพันธะ thioether ระหว่าง cysteine ในโมเลกุลของ glutathione กับสารประกอบที่มีหมู่ electrophilic จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะได้สารที่มีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้นและสามารถขับออกจากร่างกายได้ แต่อาจมีบางกรณีที่ทำให้ได้สารประกอบที่มีความเป็นพิษมากขึ้นเช่น haloalkanes และ haloalkenes ทั้งนี้สารที่เกิดจากปฏิกิริยาจะยังไม่ใช่จุดสิ้นสุดของกระบวนการ หลังจากนั้นจะถูกขับออกผ่านทางน้ำดีและเปลี่ยน



กลับไปเป็นสารประกอบระหว่าง cysteine กับ mercapturic acid ในลำไส้เล็ก ซึ่งจะถูกลดซึมกลับและมีการเปลี่ยนแปลงต่อไปโดยตับและไต

สารที่ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ glutathione-S-transferase นั้นสามารถรวมถึงมลภาวะจากสิ่งแวดล้อม ยาฆ่าแมลง สารก่อมะเร็ง และสารที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงโดย Phase I ซึ่งทั้งหมดจะมีส่วนประกอบที่เป็น electrophilic ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนี้แล้ว GSTs ยังทำให้สารที่เกิดจากภาวะ oxidative stress บางชนิด เช่น epoxides, aldehydes, quinones, hydroperoxides มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาน้อยลง โดยการใช้ glutathione เป็นตัวให้อิเล็กตรอน



**รูปที่ 3** แสดงการเปลี่ยนแปลงของ benzene โดยเอนไซม์ cytochrome 450 ได้เป็น benzene oxide ซึ่งจะมีการรวมตัวกับ glutathione โดยอาศัย glutathione S-transferase ได้ prephenyl mercapturic acid ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น phenyl mercapturic acid และขับออกทางปัสสาวะ(4)

นอกจากความสำคัญในการขจัดความเป็นพิษของสารต่างๆ ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น GSTs ยังมีความสำคัญสูงเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่พบเป็นปริมาณมากกว่าร้อยละ 10 ของ cytosolic enzyme ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม(4) สามารถอยู่ได้ในหลายรูปแบบ และกระจายตัวอยู่ในเนื้อเยื่อหลายชนิดทั่วร่างกาย เอนไซม์ถูกควบคุมการปลดปล่อยจากเซลล์โดยอาศัยกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานผ่านการกระตุ้น glycoprotein ในกลุ่ม multidrug-resistance protein (MRP) ซึ่ง protein pumps เหล่านี้ถูกเรียกว่า glutathione-S-conjugate pump ซึ่งมีความจำเป็นอย่างมากต่อทำงานของเอนไซม์ ในช่องว่างระหว่างเซลล์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถแบ่งเอนไซม์ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามชนิดของโปรตีน คือ cytosolic, mitochondria และในรูปของ microsome โดยเอนไซม์ที่อยู่ในรูป cytosolic และ mitochondria จะสามารถละลายได้ในน้ำและมีโครงสร้างสามมิติใกล้เคียงกัน ซึ่งจะต่างจากเอนไซม์ที่อยู่ในรูป microsome ทั้งนี้เอนไซม์

ในรูป cytosolic จะมีการนำมาศึกษามากที่สุดเนื่องจากความจำเพาะต่อ substrate และการทราบข้อมูลด้านโครงสร้างทั้งในระดับปฐมภูมิ ตติยภูมิ และในระดับการจำแนกทางภูมิคุ้มกัน

### 2.3.1 การกำหนดชื่อของเอนไซม์

จากการแบ่งตามความคล้ายคลึงกันของลำดับของกรดอะมิโน ทำให้ได้เอนไซม์ GSTs ออกได้เป็น 8 กลุ่ม คือ Alpha, Mu, Pi, Sigma, Omega, Theta, Zeta และ Kappa โดยในปัจจุบันยังไม่มีข้อกำหนดแน่ชัดในการจำแนกกลุ่มย่อยของเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามมีข้อมูลว่าลำดับกรดอะมิโนทั้งหมดระหว่างชนิดของเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกันจะต้องมีความใกล้เคียงกันมากกว่า 60 % (5) ความแตกต่างของโครงสร้างหลักของเอนไซม์ในแต่ละกลุ่มนั้นเชื่อว่าเป็นบริเวณ active site ที่ผิวด้านใน โดยส่วนของ N-terminus มีการนำมาศึกษามากที่สุดซึ่งที่อยู่ในบริเวณนี้จะมีผลต่อการลดค่า pKa ของ glutathione ที่เชื่อว่าเป็นกลไกหลักในการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นของ GSTs ทั้ง 8 กลุ่ม แสดงดังตารางที่ 2

### 2.3.2 การเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์

มีการศึกษาพบว่าสารหลายชนิดมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ GSTs ทั้งสารจากธรรมชาติ ได้แก่ dithiolthiones และสารจากการสังเคราะห์ เช่น barbiturates, polyaromatic hydrocarbons โดยผลของการเหนี่ยวนำทำให้มีการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ จะพบได้ใน ตับ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก ซึ่งกลไกที่ก่อกำเนิดขึ้นอาจเกิดจากการตอบสนองของกายภาพต่อสาร electrophilic เช่น การเพิ่มการทำงานของเอนไซม์เมื่อเกิดภาวะ oxidative stress เป็นต้น นอกจากนี้สารในธรรมชาติเช่นผลไม้บางชนิดก็อาจเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ได้จากการมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล

### 2.3.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

มีสารหลายชนิดที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GSTs เช่น bilirubin, haematin, leukotriene C4 และ bile acid เป็นต้น

ตารางที่ 2 ข้อมูลเบื้องต้นของ GSTs ทั้ง 8 กลุ่ม(5)

Class	Description	Further Information
Alpha	A1-1, A2-2, A3-3, A4-4, hGST5.8 (putative)	GST A1-1 is found in only a few body tissues, including kidney, intestine, lung, and liver. A4-4 has been seen to interact with the cell mitochondria
Kappa		Liver, kidney, stomach, heart. Associated with liver and kidney mitochondria. More widely and uniformly expressed in humans.
Mu	Chromosome region 1p12.3, 6 – M1-M6 members found	GST M1 is mainly expressed in liver, brain, testis, kidney and lung and show enzyme activity towards CDNB; M1-1 has been seen to interact with the cell mitochondria. Mu may be able to exist as monomers through interactions with other proteins
Omega	Unusual proline rich N terminal identified	Mixed disulphide is formed with a cysteine residue
Pi	62 variants found – including P1-1	GST P1-1 has a widespread distribution in most tumour cells and tissues but it is absent in liver. Pi may be able to exist as monomers through interactions with other proteins
Sigma		
Theta	Two distinct heterodimers identified.	Originally overlooked as only contains 7% sequence homology with alpha, mu and pi, and lacks activity with the universal GST substrate “CDNB”. Also, serine, rather than tyrosine in active site.
Zeta		Serine residue at the active site responsible for binding GSH

## 2.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *glutathione-S-transferase (GST)*

จากการที่ GSTs มีบทบาทสำคัญในการกำจัดสารก่อมะเร็งทั้งชนิดที่ได้รับจากสภาพแวดล้อมและจากภาวะ oxidative stress ในร่างกาย ทำให้ยีนนี้ถูกนำมาศึกษาความเกี่ยวข้องของความหลากหลายทางพันธุกรรมและความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ซึ่งกลุ่มเอนไซม์ Glutathione S-transferase จะถูกถอดรหัสและแปลรหัสจากยีนอย่างน้อย 8 กลุ่ม คือ Alpha, Mu, Pi, Sigma, Omega, Theta, Zeta และ Kappa ทั้งนี้กลุ่มยีนที่มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษามากที่สุดถึงความเกี่ยวข้องระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมกับการเกิดโรคต่างๆ คือ *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* เนื่องจากเป็นกลุ่มที่พบเอนไซม์เป็นปริมาณมากกระจายอยู่ในหลายเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย รวมทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นยังส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์

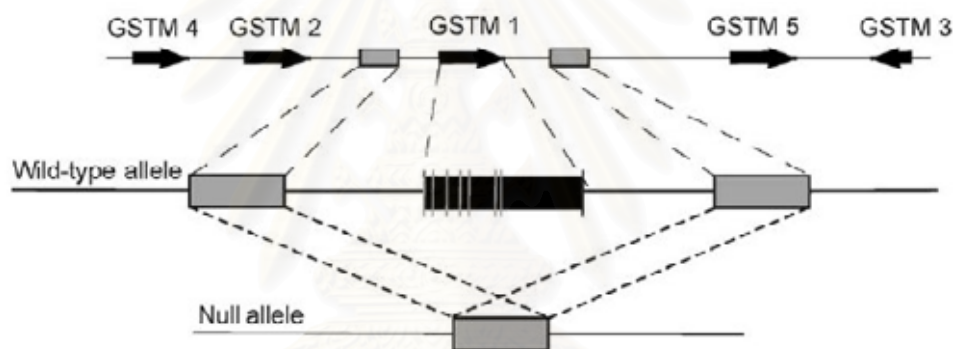
**ตารางที่ 3** แสดงข้อมูลเบื้องต้นของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1*(16)

Gene	<i>GSTM1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>GSTT1</i>
Chromosome location of gene	1p13.3	11q13.3	22q11.23
Length of gene	5.92 kb	2.84 kb	8.09 kb
Number of exons	8	7	5
Position of polymorphism	Deletion	A313G	Deletion
Enzyme activity	Null	Reduced by 30%	Null
Main sites of tissue expression	Liver, kidney and adrenal	Lung	Liver and kidney
Main substrates	Polycyclic aromatic hydrocarbons, aflatoxins	N-acetylbenzoquinone imine, 4-nitroquinoline-1-oxide, polycyclic aromatic hydrocarbons	Hydroxyalkylarenes, butadiene, mono- and dihaloalkanes
Approximate frequencies of polymorphisms in individuals of European continental ancestry/Asians/ African-Americans	50% / 51% / 30%	10% / 2% / 14%	24% / 51% / 25%

### 2.4.1 *GSTM1*

*GSTM1* เป็นยีนหนึ่งในกลุ่มของยีน (gene cluster) บนโครโมโซม 1p13.3 เรียงตัวในลักษณะ 5'-*GSTM4*-*GSTM2*-*GSTM1*-*GSTM5*-*GSTM3*-3'(17,18) (รูปที่ 4) ซึ่งมีบทบาทหลักใน

การกำจัดสารกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbon ที่พบในบุหรี่ เช่น benzo[ $\alpha$ ]pyrene ในปัจจุบันพบความหลากหลายทางพันธุกรรม (polymorphisms) ของ *GSTM1* ทั้งหมด 3 รูปแบบ (alleles) คือ *GSTM1\*A*, *GSTM1\*B* และ *GSTM1\*0* โดย *GSTM1\*A* กับ *GSTM1\*B* มีความแตกต่างกันที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 534 มีการแทนที่เบส C  $\rightarrow$  G ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Lys172Asn ซึ่งเอนไซม์ที่ได้มีประสิทธิภาพในการทำงานเท่ากัน (19) ส่วนแบบ *GSTM1\*0* เป็นการขาดหายไปทั้งยีน (gross deletion) ส่งผลให้ไม่มีการถอดรหัสและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ Glutathione S-transferase (null allele) โดยพบความถี่ของ *GSTM1\*0* allele ในกลุ่มคน Asian และ Caucasian เป็นร้อยละ 53 ส่วนในกลุ่ม African-American พบได้ร้อยละ 27 (20)



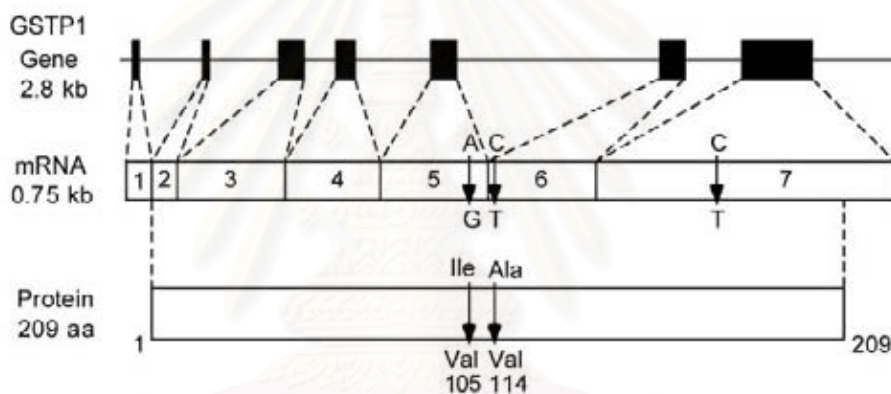
รูปที่ 4 ยีน *GSTM1* บนโครโมโซม 1p13.3 ประกอบด้วย 8 exons ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 36 – 112 bp ในขณะที่ intron มีขนาดอยู่ในช่วง 87 – 2641 bp โดย *GSTM1* ถูกขนานข้างด้วยตำแหน่งที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกัน (homologies identical) ขนาด 4.2 kb โดยการรวมตัวกันของลำดับเบสซ้ำทั้งสองด้าน (recombination) ส่งผลให้เกิดการหายไปของยีน *GSTM1(3)*

#### 2.4.2 *GSTP1*

*GSTP1* อยู่บนโครโมโซม 11q13 มีบทบาทสำคัญในการกำจัดสารก่อมะเร็งที่พบในบุหรี่ เช่น benzo[ $\alpha$ ]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) และ polycyclic aromatic hydrocarbon ชนิดอื่นๆ โดยพบ Polymorphisms แบบ single nucleotide polymorphism (SNP) ในหลายตำแหน่ง ซึ่งจะมี 2 ตำแหน่งที่มีการศึกษาพบความเปลี่ยนแปลงต่อการทำงานของ



เอนไซม์ ตำแหน่งแรกคือที่ลำดับเบส 313 A →G codon 105 เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน Ile→Val พบว่าเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนเป็น Ile จะมีประสิทธิภาพในการทำงานต่ำกว่าเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนเป็น Val ถึง 5 เท่า (21) ส่วนอีกตำแหน่งที่พบได้น้อยกว่า และยังไม่ได้ระบุถึงผลของการเปลี่ยนแปลงหน้าที่การทำงานของเอนไซม์อย่างแน่ชัด คือ C→T เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน Ala→Val ที่ codon 114 ดังนั้นจึงมีการระบุความหลากหลายที่เกิดขึ้นได้เป็นสามแบบ คือ *GSTP1\*A* (105Ile;114Ala), *GSTP1\*B* (105Val; 114Ala) และ *GSTP1\*C* (105Val; 114Val) (3) ในกลุ่มชน Caucasian พบความถี่ *GSTP1\*0* ประมาณร้อยละ 32 ส่วน Asian พบได้ร้อยละ 14 (20)

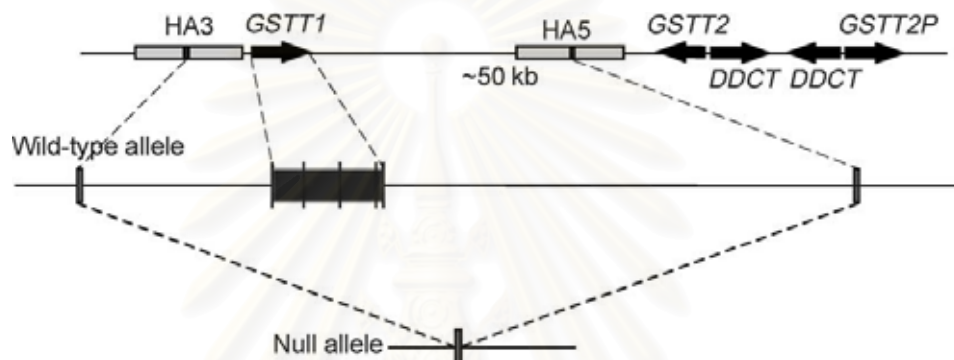


**รูปที่ 5** ยีน *GSTP1* บนโครโมโซม 11q13 มีขนาดประมาณ 2.8 kb ประกอบด้วย 7 exons การเกิด polymorphism ที่ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ codon 105(Ile→Val) และ codon 114 (Ala→Val) ใน exon 5 และ 6 ตามลำดับ(22,23)

### 2.4.3 *GSTT1*

*GSTT1* อยู่บนโครโมโซม 22q11.2 โดย Glutathione S-transferase subtype Theta ประกอบด้วย 2 ยีน คือ *GSTT1* และ *GSTT2* (รูปที่ 6)(24) โดยอยู่ห่างกัน ขนาด 50 kb และมีส่วนของลำดับเบสซ้ำ (repeat) ที่ทำให้เกิดการขาดหายของทั้งยีนโดยเกิดจากการแลกเปลี่ยน (homologous recombination; HA3 and HA5) ขึ้นส่วนของดีเอ็นเอในขบวนการ meiosis ซึ่งเอนไซม์ *GSTT1* มีหน้าที่หลักในการกำจัดพิษของสารในกลุ่ม reactive hydrocarbon ที่มีขนาด

เล็กกว่าในเอนไซม์ GSTM1 ได้แก่ ethylene oxide การเกิดการขาดหายไปของยีน ทำให้เกิด *GSTT1\*0* allele ซึ่งจะไม่มีเอนไซม์มากำจัดสารพิษ มีข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างการขาดหายไปของยีน *GSTT1* พบว่า ส่งผลต่อความเสี่ยงมากขึ้นในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม(25) โดยการศึกษาในกลุ่มชน Caucasian พบความถี่ *GSTT1\*0* ประมาณร้อยละ 20 ส่วน Asian พบร้อยละ 47 – 64 (26)



**รูปที่ 6** ยีน *GSTT1* บนโครโมโซม 22q11.2 ประกอบด้วย 5 exons ขนาดอยู่ระหว่าง 88-195 bp ในขณะที่ intron มีขนาดอยู่ในช่วง 87 – 2641 bp โดย *GSTT1* ถูกขนานข้างด้วยตำแหน่งที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกัน (homologies identical) ขนาด 18 kb (HA3, HA5) โดยการรวมตัวกันของลำดับเบสซ้ำทั้งสองด้าน (recombination) ส่งผลให้เกิดการหายไปของยีน *GSTT1* (3)

## 2.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *glutathione-S-transferase* (*GST*) กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

จากการที่เอนไซม์ GSTs มีบทบาทสำคัญในการกำจัดสารก่อมะเร็งหลายชนิดที่พบในบุหรี่ จึงทำให้มีหลายงานวิจัยนำมาทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งผลจะแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่มประชากร

ในการศึกษา meta-regression analysis *GSTP1* 105(Ile→Val) กับมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เมื่อแยกตามเชื้อชาติ ในกลุ่มคนยุโรป อเมริกัน และเอเชีย จะมีความแตกต่างกันของค่า odds ratios (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงค่า odds ratios และ 95% confidence intervals ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ *GSTP1* genotype กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (6)

	No. of studies analyzed	Unadjusted summary OR*				
		OR	95% CI*	p value	Q†	p value†
<b><i>GSTP1</i> Ile/Val and Val/Val vs. Ile/Ile</b>						
All regions	16	1.44	1.17, 1.77	<0.001	46.21	<0.001
Europe	7	1.23	1.04, 1.57	0.02	10.25	0.11
United States	3	1.09	0.68, 1.77	0.71	5.17	0.07
Asia	6	1.87	1.31, 2.66	<0.001	10.52	0.06
<b><i>GSTP1</i> Ile/Val vs. Ile/Ile</b>						
All regions	13	1.54	1.21, 1.99	<0.001	32.80	<0.001
Europe	6	1.27	1.00, 1.59	0.04	7.78	0.17
United States	1					
Asia	6	1.73	1.17, 2.55	0.006	11.63	0.04
<b><i>GSTP1</i> Val/Val vs. Ile/Ile</b>						
All regions	12	2.17	1.27, 3.71	0.005	41.53	<0.001
Europe	6	1.58	0.88, 2.85	0.13	13.77	0.02
United States	1					
Asia	5	2.97	1.26, 7.03	0.01	11.03	0.03

\* *GSTP1*, glutathione S-transferase P1 genotype; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

†  $\chi^2$  test for heterogeneity.

อย่างไรก็ตาม แม้ผลของการศึกษา meta-regression analysis จะพบแนวโน้มในการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเมื่อเปรียบเทียบระหว่างผู้มีจีโนไทป์ *GSTP1* Ile/Val และ *GSTP1* Val/Val กับ *GSTP1* Ile/Ile แต่เมื่อพิจารณาโดยแยกออกเป็นแต่ละการศึกษา จะพบว่ามีเพียง 4 การศึกษาเท่านั้นที่ผลดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (7, 27-29) นอกจากนี้ยังพบว่ามีหนึ่งงานวิจัยที่ให้ผลตรงกันข้าม นั่นคือการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเมื่อมีจีโนไทป์เป็น *GSTP1* Ile/Ile (30) ส่วนงานวิจัยเฉพาะในกลุ่มคนเอเชียนั้น แม้จะพบว่าในกลุ่มคนอินเดียมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมากขึ้นเมื่อ

มีจีโนไทป์เป็น heterozygous หรือ homozygous mutant (7) แต่การศึกษาในกลุ่มคนจีนกลับไม่พบนัยสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ดังกล่าว(8)

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ความหลากหลายของยีน *GSTM1* กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่า *GSTM1* null alleles มีแนวโน้มในการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะ(9)

ตารางที่ 5 แสดงค่า odds ratios และ 95% confidence intervals ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ *GSTM1* null allele กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (9)

	No. of studies	No. of cases	No. of controls	<i>GSTM1</i> null cases		<i>GSTM1</i> null controls		OR*	95% CI*	<i>O p value</i> *
				No.	%	No.	%			
All studies	17	2,149	3,646	1,264	59	1,813	50	1.44	1.23, 1.68	0.08
Asia	3	398	479	257	65	251	52	1.73	1.66, 1.81	0.95
Europe	10	1,366	1,667	781	57	822	49	1.39	1.09, 1.77	0.02
United States	4	385	1,498	226	59	740	49	1.44	1.38, 1.50	0.71
United States and Europe	14	1,751	3,165	1,007	58	1,562	49	1.38	1.15, 1.65	0.05
Incident cases only†	6	737	964	420	57	480	50	1.33	0.94, 1.88	0.03
Prevalent cases only	3	275	644	164	60	321	50	1.50	1.02, 2.20	0.21
Caucasians	14	1,707	2,514	986	58	1,250	50	1.39	1.16, 1.67	0.05
TCC* cases only	10	1,192	2,415	720	60	1,187	49	1.57	1.23, 2.01	0.05
At least 100 cases and 100 controls‡	8	1,506	2,592	899	60	1,310	51	1.42	1.26, 1.60	0.60
Manuscripts only	14	1,867	3,354	1,082	58	1,660	49	1.42	1.19, 1.70	0.03
Results based on published data from studies included in pooled case-control or case-only analyses										
All studies§, ¶	11	1,620	2,691	952	59	1,345	50	1.40	1.20, 1.64	0.29
Asia	2	286	259	179	63	128	49	1.70	1.67, 1.72	0.75
Europe	6	962	1,003	555	58	513	51	1.32	1.01, 1.73	0.13
United States	3	372	1,429	218	59	704	49	1.44	1.18, 1.75	0.50
United States and Europe	9	1,334	2,432	773	58	1,217	50	1.35	1.13, 1.61	0.24
Studies included in table 4§	9	1,430	1,339	849	59	683	51	1.46	1.20, 1.76	0.21

\* OR, odds ratio; CI, confidence interval; *O p value*, *p* value of the *O* statistic, which assesses homogeneity of study results ( $p < 0.05$  suggests too much heterogeneity for pooling); TCC, transitional cell carcinoma.

† Includes only studies that explicitly indicated restriction to incident cases or identified subgroups of incident cases within studies. Studies of prevalent cases and studies that did not state whether cases were incident or prevalent are not included in these analyses.

‡ Comprised three studies from Asia, three from Europe, and two from the United States.

§ Includes the nine published studies for which the provided data sets contained both cases and controls (115, 116, 118–120, 123, 124, 128, 129).

¶ Includes the two published studies for which the provided data sets contained only cases (117, 125).

สำหรับในประเทศไทยได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *GSTM1* ในกลุ่มคนสุขภาพดีพบ *GSTM1\*0* ร้อยละ 62.7 เพียงหนึ่งยีน(12) และยังไม่มีการศึกษาความสัมพันธ์ของ ความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในคนไทย งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Glutathione S-transferase Gene* ทั้ง 3 subtype ได้แก่ *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ที่เคยมีรายงาน (direct genetic association) ว่า มีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ และยังทำการวิเคราะห์ถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน (gene interaction) ข้อมูลจากการวิจัยจะเป็นประโยชน์ทั้งในแง่การเป็นข้อมูลพื้นฐานและใช้ในการประเมินปัจจัยเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในกลุ่มคนไทยต่อไป



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ประชากร

ประชากรประกอบด้วยสองกลุ่มคือกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองคือผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยตัวอย่างของกลุ่มทดลองในงานวิจัยนี้จะใช้ดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่เหลืออยู่ จากโครงการวิจัยเรื่อง ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนไซโตโครมพี (ซีวายพี) 450 ทุติยภูมิ ในผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นเนื้องอกของกระเพาะปัสสาวะ จำนวน 139 คน กลุ่มควบคุมคือ ผู้มาบริจาคเลือดที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดของโรงพยาบาลศิริราช ซึ่งตัวอย่างของกลุ่มคนปกติในงานวิจัยนี้จะใช้ดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่เหลืออยู่ จากโครงการวิจัยเรื่อง ลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนฮิ2ดี6 ในคนไทยและความสัมพันธ์กับมะเร็งตับและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จำนวน 278 คน

##### 3.1.1 เกณฑ์การคัดเลือกประชากร

3.1.1.1 กลุ่มทดลองเป็นผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ได้รับการวินิจฉัยและมีการยืนยันโดยผลทางพยาธิวิทยาว่าเป็นเนื้องอกของกระเพาะปัสสาวะชนิดทรานซิชันแนลเซลล์ที่เคยได้รับการรักษาและ/หรือติดตามที่แผนกศัลยกรรมศัลยกรรมโรวิทยาโรงพยาบาลศิริราช

3.1.1.2 กลุ่มควบคุมคือ ผู้มาบริจาคเลือดที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดของโรงพยาบาลศิริราช อายุไม่ต่ำกว่า 40 ปี ไม่ได้เป็นมะเร็งและไม่มีประวัติว่ามีคนในครอบครัวเป็นมะเร็ง

##### 3.1.2 การคำนวณกลุ่มตัวอย่าง

จำนวนผู้เข้าร่วมวิจัยในกลุ่มทดลองคำนวณด้วยโปรแกรมเฉพาะทางคือ QUANTO ver 1.1 โดยค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณคือ Odd Ratio 1.9 , Allele Frequency 62.7%, Population Risk 0.005% และ Power 0.8 ส่วนจำนวนผู้เข้าร่วมวิจัยในกลุ่มควบคุมกำหนดให้เป็นสองเท่าของกลุ่มทดลอง



### 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 สารเคมี สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาเป็นสารเคมีชนิด molecular biological grade ซึ่งมีรายการดังนี้คือ

3.2.1.1 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ Quigen<sup>®</sup> hot start Taq polymerase และ buffer, Immulase<sup>®</sup> hot start Taq polymerase และ buffer, dNTPs (Perkin Elmer<sup>®</sup>), LightCycler II CYBR Green (Roche), Triton x-100 (Sigma)

3.2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis ได้แก่ Seakem<sup>®</sup> LE Agarose (FMC Bioproduct), Generuler<sup>®</sup> 100 bp และ 50 bp (Gibco BRL)

3.2.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ DHPLC ได้แก่ Acetonitrile HPLC Grade (LabScan Asia), Tri-ethyl ammonium acetate (Transgenic)

3.2.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA ได้แก่ NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, KHCO<sub>3</sub>, Phenol, 8-hydroxyquinoline, Cholofrom, Isoamyl alcohol, Absolute ethanol (Merck, USA), EDTA (Biobasic, USA), Sodium Decadocyl Sulfate (SDS) (Sigma), ProteinaseK<sup>®</sup> (Amercham, USA)

### 3.2.2 อุปกรณ์

3.2.2.1 Refrigerated water bath

3.2.2.2 Vortex mixer

3.2.2.3 Automatic pipettes (Gilson)

3.2.2.4 GeneAmp PCR system 2400 (Applied Biosystem)

3.2.2.5 Gel electrophoresis apparatus (BIO-RAD)

3.2.2.6 Gel document system (Sysgene, GeneGenuis and Gene Tool Match),

3.2.2.7 WAVE Nucleic Acid Fragment Analysis System 3500 HT  
(Transgenomic)

3.2.2.8 LightCycler LC II System (Roche)

3.2.2.9 Fume hood (ASTEC sensair)

3.2.2.10 Centrifuge (Hermle ZK380)

### 3.3 การเตรียม DNA

#### 3.3.1 การเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตัวอย่างเลือด

นำตัวอย่างเลือดที่มี EDTA มาปั่นที่ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอน lymphocyte

↓  
แยกส่วนของ plasma ออกแล้วล้างด้วย PBS Buffer 2-3 ครั้ง

↓  
เติม RBC lysis ปริมาณ 2-3 เท่าของปริมาณเลือดทั้งหมด

↓  
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง

↓  
ปั่นที่ 1500-2500 rpm 4°C 10 นาที

↓  
แยกส่วนใสด้านบนออกแล้วเติม RBC lysis เพื่อทำขั้นตอนเดิมซ้ำอีกครั้ง

↓  
ล้างเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ด้วย PBS buffer 2 ครั้ง

↓  
กรณีที่ยังไม่นำไปสกัดแยก DNA จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

### 3.3.2 การสกัด DNA จากเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยวิธี Phenol-chloroform

นำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาทำการกระจายตัวใน TE20-5 ปริมาณ 4 ml.

จากนั้นเติม 10% SDS ปริมาณ 200  $\mu$ l. และ Proteinase K ปริมาณ 200  $\mu$ l.

incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เติม Phenol และ chloroform-isoamyl alcohol(24:1) ปริมาณ อย่างละ ½ เท่าของสาร

ทั้งหมดในหลอด

ปั่นที่ 2500 rpm 4°C 10 นาที

ดูดเอาสารในส่วน organic phase ที่ และทำซ้ำในขั้นตอนเติม Phenol และ

chloroform-isoamyl alcohol(24:1) อีก 2 ครั้ง

เติม chloroform-isoamyl alcohol(24:1) ในปริมาณเท่ากับสารทั้งหมดในหลอด ทำการ

ปั่นตกตะกอนและดูดเอา organic phase ที่ โดยทำขั้นตอนนี้ซ้ำกัน 2 ครั้ง

เติม 4 M NaCl ปริมาณ 1/10 ของปริมาตรสารทั้งหมดในหลอด จากนั้นเติม

Absolute alcohol เพื่อทำการตกตะกอน DNA

ปั่นที่ 3000 rpm 4°C 10 นาที

ล้าง DNA ที่ได้ ด้วย 70% ethanol

หลังจากปล่อยให้แห้งแล้ว เติมน้ำกลั่นเพื่อทำละลาย DNA โดยก่อนจะนำไปใช้จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณความเข้มข้นของ DNA ที่ได้

ความเข้มข้นของ DNA  $\mu$ l/ml หรือ ng/ $\mu$ l = OD260 x 50 x dilution factor

### 3.4 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1*

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ทำได้โดยการนำ genomic DNA ของผู้เข้าร่วมวิจัยมาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเฉพาะตำแหน่งของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* โดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีหลักการคือการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณที่ต้องการโดยอาศัยส่วนประกอบสำคัญ ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ดีเอ็นเอสายเริ่มต้น (primer) จำนวนสองสายที่มีลำดับเบสเข้าคู่กับลำดับเบสด้านปลาย 3' ของสายดีเอ็นเอแม่แบบ นิวคลีโอไทด์หรือเบส และ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักคือ

1. การแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบโดยใช้อุณหภูมิสูงเพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยว
2. การจับของสาย primer กับดีเอ็นเอแม่แบบทั้งสองสาย
3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายของ primer ซึ่งอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสในการนำเบส (A, T, C, G) ที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบมาต่อเข้าที่ปลายของสาย primer ทั้งสองข้างเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่

ผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา (PCR product) ตรวจสอบได้ด้วยวิธี gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอในวุ้นอะกาโรสด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ เช่น ethidium bromide ซึ่งมีโมเลกุลที่สามารถสอดแทรกเข้าไปในช่องว่างระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอและมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต ดังนั้นเมื่อนำแผ่นวุ้นที่ผ่านการย้อมสีแล้วไปส่องบนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) จะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอซึ่งทำให้ทราบขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการได้โดยเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน

งานวิจัยในครั้งนี้อาศัยเทคนิคที่มีพื้นฐานจากหลักการดังกล่าวในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ multiplex PCR, Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), Real-time PCR ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป โดยลำดับเบสของ primer สำหรับยีนทั้ง 3 subtype แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ใน PCR

Name	Gene	Sequence	Product size
A1	GSTM1	5'-CTG CCC TAC TTG ATT GAT GGG-3'	273 bp
A2		5'-CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC-3'	
B1	$\beta$ -actin	5'-GGC CCC TCC ATC GTC CAC CG-3'	496 bp
B2		5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3'	
C1	connexin26	5'-TCT TTT CCA GAG CAA ACC GC-3'	286 bp
C2		5'-GAC ACG AAG ATC AGC TGC AG-3'	
D1	dystrophin	5'-TTT TCG GTC TCT CTG CTG GTC AGT G -3'	196 bp
D2		5'-CAA AGC CCT CAC TCA AAC AGT AAG C-3'	
E1	GSTP1	5'-CCA GTG ACT GTG TGT TGA TC-3'	189 bp
E2		5'-CAA CCC TGG TGC AGA TGC TC-3'	
F1	GSTT1 (สายยาว)	5'-CAG TTG TGA GCC ACC GTA CCC-3'	1460 bp
F2		5'-CGA TAG TTG CTG GCC CCC TC-3'	
G1	GSTT1 (สายสั้น)	5'-CCA GCT CAC CGG ATC ATG GCC AG-3'	466 bp
G2		5'-CCT TCC TTA CTG GTC CTC ACA TCT C-3'	

### 3.3.1. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน GSTM1

ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ GSTM1 จะใช้เทคนิค multiplex PCR, Real-time PCR และ Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) เพื่อแยกกลุ่มที่มีจีโนไทป์ wild type, heterozygous mutant และ homozygous mutant ซึ่งในแต่ละเทคนิคมีหลักการและขั้นตอนดังนี้คือ

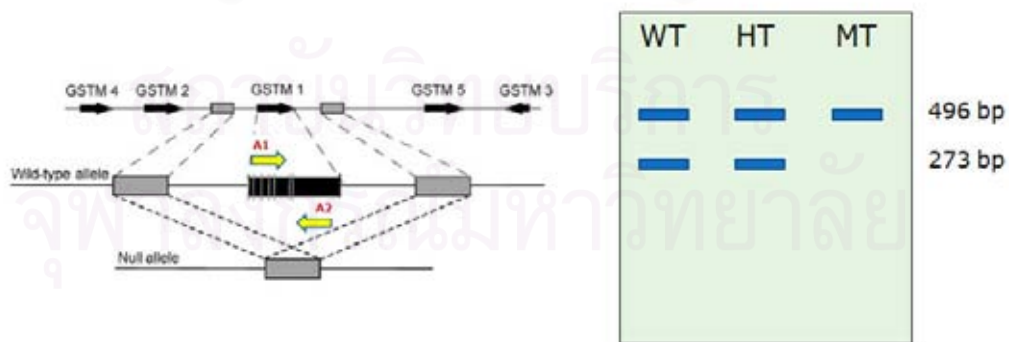
#### 3.3.1.1 Multiplex PCR

Multiplex PCR เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ primer มากกว่า 1 คู่ในปฏิกิริยา ซึ่ง primer แต่ละคู่จะถูกออกแบบให้ได้ PCR product ที่มีขนาดความ

ยาวต่างกัน จึงสามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอแม่แบบได้จากการนำ PCR product ไปทำการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis

ดังที่ได้กล่าวในบทที่ 2 แล้วว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *GSTM1* ที่ต้องการตรวจสอบ เป็นการเกิด deletion ซึ่งเป็นการหายไปทั้งหมดของยีน ดังนั้น primer ที่ใช้จึงถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับลำดับเบสส่วนหนึ่งภายในยีน *GSTM1* ทำให้สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็น wild type หรือ heterozygous mutant และให้ผล PCR product ได้ ในขณะที่ homozygous mutant ซึ่งขาดส่วนของลำดับเบสที่จำเพาะกับ primer จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย primer นี้ ความแตกต่างดังกล่าวสามารถแยกได้โดยนำ PCR product ที่เกิดขึ้นมาทำการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis ตัวอย่างที่พบ PCR product ที่มีขนาดความยาว 273 bp จาก primer ที่จำเพาะต่อลำดับเบสภายในยีน *GSTM1* (A1,A2) จะแปลผลเป็น wild type หรือ heterozygous mutant ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบ band แปลผลเป็น homozygous deletion ทั้งนี้เพื่อยืนยันความถูกต้องของปฏิกิริยา จึงมีความจำเป็นในการใส่ primer ของยีนอีกหนึ่งคู่ที่ไม่เกิด deletion ลงในปฏิกิริยาเดียวกันเพื่อเป็น internal control ซึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน  $\beta$ -actin (B1,B2) โดยจะทำให้ได้ PCR product ขนาดความยาว 496 bp ดังนั้นจะสามารถแปลผลได้ดังแสดงในรูปที่ 7 คือ

1. wild type หรือ heterozygous : พบ band ขนาด 273 จาก primer A1, A2 และ band ขนาด 496 bp จาก primer B1,B2
2. homozygous mutant : พบเฉพาะ band ขนาด 496 bp ที่เกิดจาก primer B1,B2



**WT = Wild type, HT = Heterozygous mutant, MT = Homozygous mutant**

รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งการจับของ primer A1, A2 และการแปลผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1* จาก band ของ PCR product ที่เกิดขึ้น



ด้วยหลักการดังกล่าวนี้ จะยังไม่สามารถแยกแยะระหว่างกลุ่มที่มีจีโนไทป์เป็น wild type กับ heterozygous mutant ได้ จึงจะนำไปตรวจสอบในเทคนิค DHPLC ต่อไป

สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้เป็นดังนี้คือ

Mixture of 25  $\mu$ l PCR reaction

10x PCR buffer	2.5	$\mu$ l
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75	$\mu$ l
2 mM dNTPs	2.5	$\mu$ l
10 pmol/ $\mu$ l primer A1	1.0	$\mu$ l
10 pmol/ $\mu$ l primer A2	1.0	$\mu$ l
10 pmol/ $\mu$ l primer B1	1.0	$\mu$ l
10 pmol/ $\mu$ l primer B2	1.0	$\mu$ l
5U/ $\mu$ l Taq (Immulase)	0.2	$\mu$ l
Sterile distilled water	12.3	$\mu$ l
40 ng/ $\mu$ l genomic DNA	2.5	$\mu$ l
1% Tritanx-100	0.25	$\mu$ l
Total	25	$\mu$ l

Thermal cycle condition

95 °C	10	min	} 30 cycles
95 °C	1	min	
61 °C	30	sec	
72 °C	1	min	
72 °C	7	min	
4 °C	.....		

ทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยการทำ electrophoresis ด้วย 1.5% agarose gel ที่ 110 Volt เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำการย้อมแผ่น gel ด้วย ethidium bromide ล้างน้ำ และนำไปตรวจสอบ band ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV light และแปลผลจาก band ที่พบ

### 3.3.1.2 Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

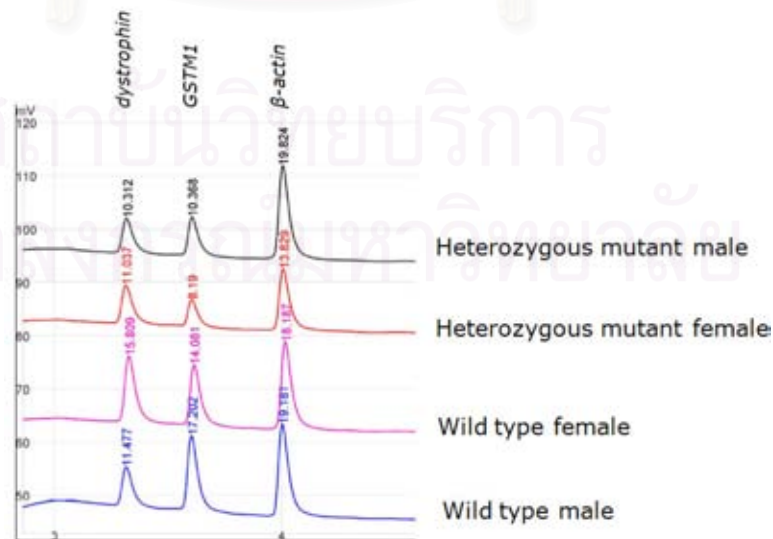
DHPLC เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ในหลายลักษณะ โดยในงานวิจัยนี้จะอาศัยการตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ซึ่งหลักการเบื้องต้นคือ ดีเอ็นเอแม่แบบที่มีจำนวน copy number ของยีนแตกต่างกัน จะทำให้ได้ PCR product ในปริมาณที่ต่างกัน

ในขั้นตอนแรกจะทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ primer 3 คู่ คือ A1, A2 (สำหรับยีน *GSTM1*) B1, B2 (สำหรับยีน  *$\beta$ -actin*) และ D1, D2

(สำหรับยีน *dystrophin*) โดยจะมีการควบคุมความเข้มข้นของ primer ทั้ง 3 คู่ ให้มีความเหมาะสม เพื่อหลังจากนำ PCR product ไปตรวจสอบด้วยวิธี DHPLC แล้วจะได้เส้นกราฟที่มีความสูงเท่ากันเมื่อตัวอย่างนั้นเป็นเพศหญิงที่มีจีโนไทป์ของยีน *GSTM1* เป็น wild type ซึ่งมีหลักการดังนี้คือ

1. สารพันธุกรรมที่เพิ่มด้วยปฏิกิริยา PCR จากยีน *dystrophin* ซึ่งเป็น x-link gene ในเพศหญิงซึ่งมีโครโมโซมเพศเป็น XX จะมีปริมาณเป็นสองเท่าของเพศชายซึ่งมีโครโมโซมเพศเป็น XY
2. สารพันธุกรรมที่เพิ่มด้วยปฏิกิริยา PCR จากยีน *GSTM1* ในดีเอ็นเอแม่แบบที่มีจีโนไทป์เป็น wild type จะมีปริมาณเป็นสองเท่าของดีเอ็นเอแม่แบบที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous mutant
3. สารพันธุกรรมที่เพิ่มด้วยปฏิกิริยา PCR จากยีน  $\beta$ -actin ซึ่งเป็นยีนบนโครโมโซมร่างกายที่ไม่เกิดการ deletion และมีจำนวน copy number เท่ากันในเพศหญิงและเพศชาย จะมีปริมาณคงที่คือเมื่อเป็นเพศหญิงปริมาณสารพันธุกรรมจะเท่ากับที่ได้จากยีน *dystrophin* ในขณะที่เพศชายจะได้ปริมาณสารพันธุกรรมเป็นสองเท่าที่ได้จากยีน *dystrophin*

ด้วยหลักการดังกล่าวหลังจากนำ PCR product ไปทำการตรวจสอบด้วย DHPLC ซึ่งเส้นกราฟที่เกิดขึ้นจะบอกปริมาณสารพันธุกรรมที่ได้ในแต่ละยีน โดยเรียงลำดับตามความยาวของ product คือ *dystrophin* 196 bp, *GSTM1* 273 bp  $\beta$ -actin จะสามารถแปลผลได้ดังแสดงในรูปที่ 8 คือ



รูปที่ 8 แสดงการอ่านผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1* จากกราฟ DHPLC

โดย condition ของ DHPLC สำหรับการประเมิน PCR product คือ อุณหภูมิคงที่ 50 °C gradient ที่ 0.5-4 นาทีอัตราส่วนของ Buffer B เท่ากับ 50-85% ปริมาณสารที่ใช้ฉีด 20 µl ส่วนปฏิกิริยา PCR มีดังนี้คือ

Mixture of 25 µl PCR reaction

10x PCR buffer	2.5	µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75	µl
2 mM dNTPs	2.5	µl
10 pmol/ µl primer A1	1.0	µl
10 pmol/ µl primer A2	1.0	µl
5.5 pmol/ µl primer B1	1.0	µl
5.5 pmol/ µl primer B2	1.0	µl
9.5 pmol/ µl primer D1	1.0	µl
9.5 pmol/ µl primer D2	1.0	µl
5U/ µl Taq (Immurase)	0.2	µl
Sterile distilled water	10.3	µl
40 ng/ µl genomic DNA	2.5	µl
1% Tritanx-100	0.25	µl
Total	25	µl

Thermal cycle condition

95 °C	10	min	} 24 cycles
95 °C	1	min	
61 °C	30	sec	
72 °C	1	min	
72 °C	7	min	
4 °C	.....		

### 3.3.1.3 Real – Time PCR

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real – Time PCR นี้ ในแต่ละตัวอย่าง DNA ที่ต้องทำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมจะถูกนำไปเพิ่มปริมาณโดยทำควบคู่กัน 2 หลอดแยกกันโดยใช้ primer 2 คู่ คือ A1, A2 สำหรับยีน *GSTM1* และ C1, C2 สำหรับยีน *connexin 26* ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความเข้มข้นของ DNA ในแต่ละตัวอย่าง ทั้งนี้ทุกปฏิกิริยาจะมีการนำ DNA จากตัวอย่างที่ทราบ genotype แน่ชอนว่าเป็น wild type และ heterozygote มาเป็นตัวเปรียบเทียบ (calibrator sample) ด้วย

Mixture of 10 µl PCR reaction

10 pmol/ µl primer A1 (หรือ C1)	0.5	µl
10 pmol/ µl primer A2 (หรือ C2)	0.5	µl
CYBR	2.0	µl
Sterile distilled water	4.0	µl
5 ng/ µl genomic DNA	3.0	µl

Thermal cycle condition

95 °C	15	min	} 35 cycles
95 °C	10	sec	
62 °C	5	sec	
72 °C	13	sec	
40 °C	30	sec	

ผลของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะแสดงในรูปของกราฟ exponential และค่า threshold cycle number (Ct) ซึ่งจะสามารถบอกความแตกต่างของจำนวน copy ของยีนได้จากการนำไปคำนวณ ด้วยสูตร

$$\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct \text{ connexin 26 (calibrator sample)} - \Delta Ct \text{ GSTM1(calibrator sample)}] - [\Delta Ct \text{ connexin 26 (unknown sample)} - \Delta Ct \text{ GSTM1(unknown sample)}]$$

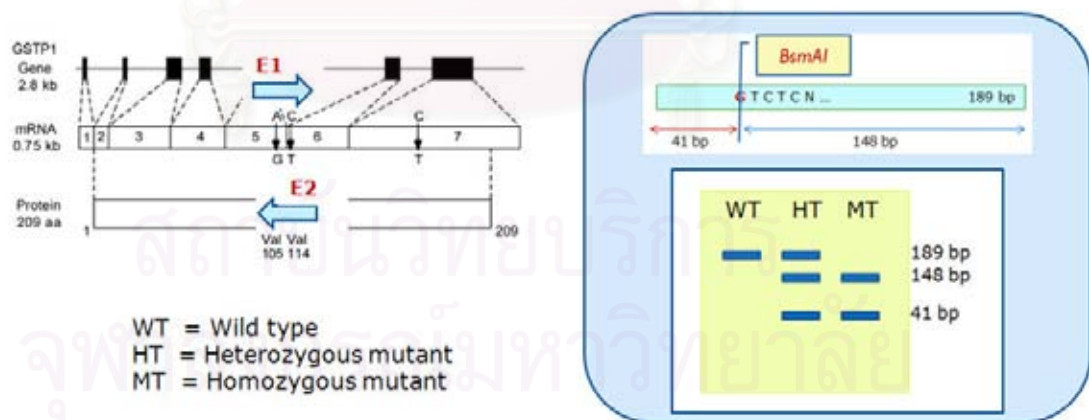
โดยค่าสัมพัทธ์ของจำนวน copy ของยีน จะมีค่าเท่ากับ  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ซึ่งกลุ่มที่เป็น wild type จะได้ค่าตามอัตราส่วนเท่ากับ 1 และกลุ่ม heterozygote จะได้ค่าตามอัตราส่วนเท่ากับ 0.5

จากขั้นตอนการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Real-time PCR จะทราบตัวอย่างที่มี genotype เป็น wild type และ heterozygote สำหรับใช้ในการพัฒนา condition สำหรับการตรวจสอบคัดแยก 2 genotype นี้ ด้วยวิธี DHPLC ต่อไป รวมทั้งยังเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของผลที่ได้จากทั้ง multiplex PCR และ DHPLC

### 3.3.2 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTP1*

ดังที่ได้กล่าวในบทที่ 2 แล้วว่า ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *GSTP1* เป็นลักษณะของการแทนที่เบสที่ตำแหน่ง 105(A→G) การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนนี้จึงใช้เทคนิค RFLP-PCR ซึ่งอาศัยหลักความจำเพาะต่อลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงแม้เพียงเบสเดียวในซันดีเอ็นเอที่สนใจจะเป็นตัวกำหนดว่าเอนไซม์จะสามารถตัดได้หรือไม่

ด้วยหลักการดังกล่าว การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTP1* จะทำได้โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนด้วย primer E1,E2 ซึ่งมีความจำเพาะสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในบริเวณตำแหน่งที่เกิดการแทนที่เบสได้ PCR product ขนาดความยาว 189 bp จากนั้นใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsmAI* ที่จดจำตำแหน่ง GTC TC(N) ในการตัดซันส่วนของ PCR product ที่ได้ เนื่องจากการแทนที่ของเบสเกิดจากการเปลี่ยนแปลง A→G ดังนั้นดีเอ็นเอแม่แบบที่มีจีโนไทป์ *GSTP1* เป็น wild type จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ ในขณะที่จีโนไทป์ heterozygous mutant และ homozygous mutant จะถูกตัดที่ตำแหน่งที่มีการแทนที่เบสได้ ซันส่วนที่ถูกตัดสองซันขนาด 148 bp และ 41 bp ซึ่งจะสามารถแยกกลุ่มจีโนไทป์ทั้งสามออกจากกันได้ด้วยการตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นด้วย gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงตำแหน่งการจับของ primer E1, E2 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsmAI* และการแปลผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTP1* จาก band ของ PCR product ที่เกิดขึ้น

การแปลผลทำได้โดยการดูตำแหน่ง band ที่เกิดขึ้นดังนี้คือ

1. wild type : พบเฉพาะ band ที่ 189 bp ซึ่งไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BsmAI*
2. heterozygous mutant : พบ band ที่ 189, 141 และ 41 bp
3. homozygous mutant : พบ band ที่ 141 และ 41 bp

โดยปฏิกิริยาและขั้นตอนต่างๆ เป็นดังนี้คือ

Mixture of 25 µl PCR reaction

10x PCR buffer	2.5	µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75	µl
2 mM dNTPs	2.5	µl
10 pmol/ µl primer E1	1.0	µl
10 pmol/ µl primer E2	1.0	µl
5U/ µl Taq (Immurase)	0.15	µl
Sterile distilled water	14.6	µl
40 ng/ µl genomic DNA	2.5	µl
Total	25	µl

Thermal cycle condition

95 °C	10	min	} 30 cycles
95 °C	30	sec	
60 °C	30	sec	
72 °C	30	sec	
72 °C	7	min	
4 °C	.....		

ทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยการทำ electrophoresis ด้วย 1.5% agarose gel ที่ 110 Volt เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำการย้อมแผ่น gel ด้วย ethidium bromide ล้างน้ำ และนำไปตรวจสอบ band ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV light นำเฉพาะ amplified DNA ที่พบ band ของ PCR product ที่มีขนาด 189 bp ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ต้องการ ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsmAI* ด้วยปฏิกิริยาดังนี้คือ

Mixture of 50 µl Reaction

10 NE buffer	35	µl
amplified DNA	20	µl
enzyme <i>BsmAI</i>	2	µl
Sterile distilled water	23	µl
Total	50	µl



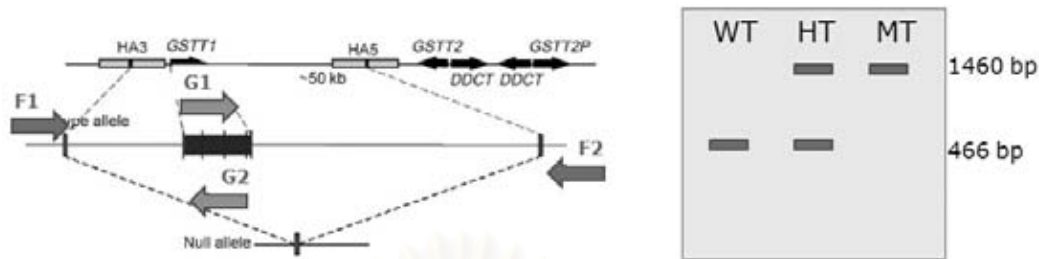
หลังจาก incubate ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะนำไปตรวจสอบ PCR product โดยการทำให้ electrophoresis ด้วย 2.0% agarose gel ที่ 110 Volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide ล้างน้ำ และตรวจสอบ band ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV light

### 3.3.3 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTT1*

เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *GSTT1* ที่ต้องการตรวจสอบ เป็นการเกิด deletion ดังนั้นจึงใช้เทคนิค multiplex เช่นเดียวกันกับยีน *GSTM1* แต่จะเพิ่มเทคนิค Gap-PCR ซึ่ง primer คู่หนึ่งถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อลำดับเบสที่อยู่ด้านนอกที่ปลายทั้งสองด้านของตำแหน่งยีนที่เกิด deletion โดยหลักการคือ เมื่อไม่มีการ deletion ตำแหน่งที่ primer เข้าจับจะอยู่ห่างกันจนไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ในขณะที่เมื่อมี deletion ตำแหน่งทั้งสองจะถูกเลื่อนเข้ามาชิดกันจนสามารถทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้

ด้วยวิธีการนี้ทำให้แยกความแตกต่างของจีโนไทป์ทั้งสามแบบคือ wild type, heterozygous mutant และ homozygous mutant ได้ในปฏิกิริยาเดียว โดยใช้ primer ทั้งหมดสองคู่ คือ F1,F2 และ G1, G2 โดย primer G1, G2 ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับลำดับเบสส่วนหนึ่งภายในยีน *GSTT1* ได้ PCR product ขนาด 466 bp ส่วน F1,F2 ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะกับลำดับเบสบนตำแหน่งด้านข้างของยีน *GSTT1* เมื่อมีการ deletion จะสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ PCR product ขนาด 1460 bp ดังนั้นจะสามารถแปลผลได้ดังแสดงในรูปที่ 10 ดังนี้คือ

- 1.wild type : พบเฉพาะ band ที่ 466 bp
- 2.heterozygote : พบ band ที่ 1460 และ 466 bp
- 3.homozygous mutant : พบ band เฉพาะที่ 1460



WT = Wild type, HT = Heterozygous mutant, MT = Homozygous mutant

รูปที่ 10 แสดงตำแหน่งการจับของ primer F1, F2 และ G1, G2 และการแปลผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน GSTT1 จาก band ของ PCR product ที่เกิดขึ้น

โดยปฏิกิริยาและขั้นตอนต่างๆ เป็นดังนี้คือ

Mixture of 25 µl PCR reaction

10x PCR buffer	2.5	µl
2 mM dNTPs	2.5	µl
10 pmol/ µl primer F1	0.5	µl
10 pmol/ µl primer F2	0.5	µl
10 pmol/ µl primer G1	2.0	µl
10 pmol/ µl primer G2	2.0	µl
5U/ µl Taq (Quigen)	0.2	µl
Sterile distilled water	12.3	µl
40 ng/ µl genomic DNA	2.5	µl
Total	25	µl

<u>Thermal cycle condition</u>		
95 °C	15	min
94 °C	30	sec
68 °C	30	sec
72 °C	1	min
72 °C	7	min
4 °C	.....	

} 35 cycles

ทำการตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยการทำ electrophoresis ด้วย 1.5% agarose gel ที่ 110 Volt เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำการย้อมแผ่น gel ด้วย ethidium bromide ล้างน้ำ และนำไปตรวจสอบ band ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV light

### 3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจะถูกบันทึกลงในโปรแกรม Microsoft Excel เพื่อนำไปคำนวณหาร้อยละความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความแตกต่างของความถี่ของจีโนไทป์ที่พบในกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมโดยใช้สถิติ chi-square และทำการวิเคราะห์หาปฏิสัมพันธ์ของยีน (gene interaction or epistasis) *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยใช้โปรแกรม multifactor dimensionality reduction (MDR) สามารถดาวน์โหลดได้จาก <http://sourceforge.net/projects/mdr/>



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

#### 4.1 ผลการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน GST

จากการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ในกลุ่มทดลองซึ่งเป็นผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 139 คน และกลุ่มควบคุมคือคนปกติจำนวน 278 คน ด้วยเทคนิค multiplex PCR, RFLP - PCR, Real Time PCR และ DHPLC ผลของ product band และกราฟแสดงดังรูปที่ 7- 11



รูปที่ 11 ผล gel electrophoresis ของ PCR product จากยีน *GSTM1*

จากรูปที่ 11 หมายเลข 2,3 และ 4 ที่พบเพียง band ของ PCR product จาก *β-actin* gene ที่มีขนาด 496 bp สามารถแปลผลได้เป็น homozygous mutant ส่วนหมายเลข 1,5 และ 6 ซึ่งพบทั้ง band ของ PCR product จาก *β-actin* gene ขนาด 496 bp และ band ของ PCR product จาก *GSTM1* gene ขนาด 273 bp จะยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น wild type หรือ heterozygous ซึ่งเป็นกลุ่มที่จะถูกนำไปทำการตรวจสอบแยกความแตกต่างดังกล่าวต่อไป

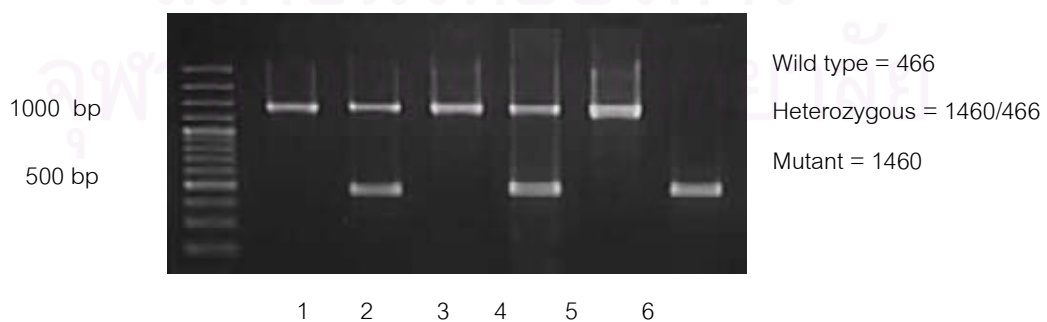
50 bp DNA marker



**รูปที่ 12** ผล gel electrophoresis ของ PCR product จากยีน *GSTP1* หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsmAI*

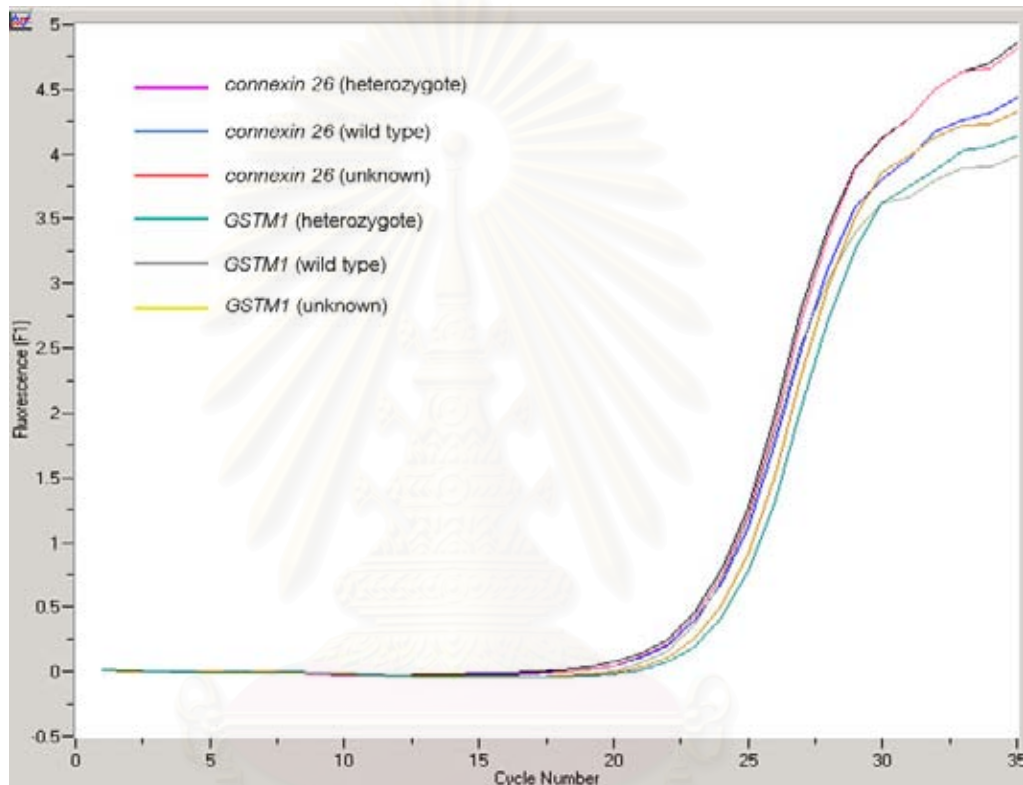
จากรูปที่ 12 คือ band ของ PCR product หลังการถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsmAI* หมายเลข 1 และ 3 ที่พบเพียง band ที่มีขนาด 189 bp ซึ่งหมายถึงการไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ ดังนั้นจึงแปลผลได้เป็น wild type สำหรับหมายเลข 4 และ 5 ซึ่งพบทั้ง band ที่มีขนาด 189 bp และ 141 bp หมายถึงการมีทั้งส่วนที่ถูกตัดและไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ สามารถแปลผลได้เป็นกลุ่ม heterozygous mutant ส่วนหมายเลข 2 ที่พบ band ขนาด 141 ซึ่งหมายถึงการถูกตัดด้วยเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ จึงสามารถแปลผลได้เป็นกลุ่ม homozygous mutant

100 bp DNA marker



**รูปที่ 13** ผล gel electrophoresis ของ PCR product จากยีน *GSTT1*

จากรูปที่ 13 หมายเลข 1, 3 และ 5 ที่พบเพียง band ของ PCR product ขนาด 1460 bp สามารถแปลผลได้เป็น homozygous mutant สำหรับหมายเลข 2 และ 4 ซึ่งพบทั้ง band ขนาด 1460 bp และ 466 bp สามารถแปลผลได้เป็น heterozygous mutant ส่วนหมายเลข 6 ที่พบเพียง band ขนาด 466 สามารถแปลผลได้เป็น wild type

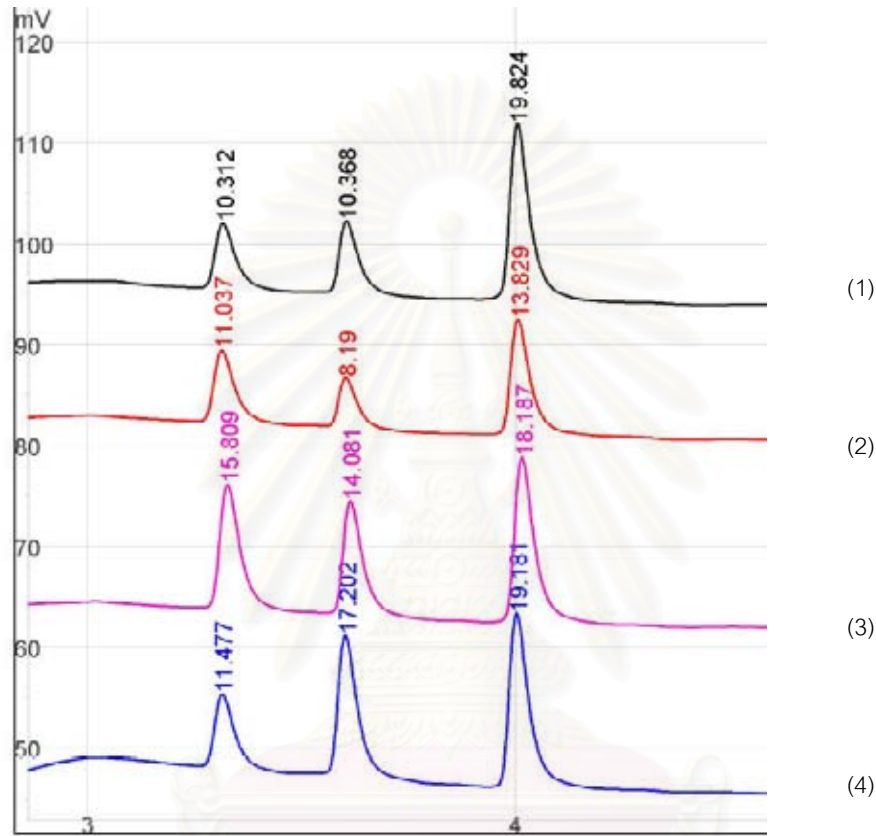


รูปที่ 14 ผลของ Real-Time PCR

จากกราฟรูปที่ 14 พบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างมีความเข้มข้นของ DNA เริ่มต้นเท่ากัน พิจารณาจากเส้นกราฟ PCR product ของยีน *connexin 26* ที่มีค่าเท่ากัน ดังนั้นจึงสามารถทำการเปรียบเทียบผลของ PCR product ของยีน *GSTM1* ได้ ซึ่ง *GSTM1* wild type ที่มียีน 2 copy จะมีการเพิ่มปริมาณได้รวดเร็วกว่ายีนที่เป็น heterozygous mutant และเมื่อนำค่า threshold cycle number (Ct) ของทั้ง 3 ตัวอย่าง คือ ตัวควบคุมที่เป็น heterozygote จะมีค่า Ct ของยีน *connexin 26* และ *GSTM1* เท่ากับ 23.13 และ 23.69 ตามลำดับ ตัวควบคุมที่เป็น wildtype จะมีค่า Ct ของยีน *connexin 26* และ *GSTM1* เท่ากับ 23.13 และ 22.79 และตัวอย่างที่ยังไม่ทราบ genotype ซึ่งมีค่า Ct ของยีน *connexin 26* และ *GSTM1* เท่ากับ 23.13 และ 23.69 มาคำนวณตามสูตร จะ



ได้อัตราส่วนของตัวอย่างที่ไม่ทราบ genotype เท่ากับ 0.5 ดังนั้นจึงแปลผลได้ว่า ตัวอย่างนี้มี genotype เป็น heterozygote



รูปที่ 15 ผลของ DHPLC

จากรูปที่ 15 เป็นกราฟของ DHPLC ที่ได้จากการฉีด amplified DNA จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค multiplex PCR ซึ่งมีการควบคุมความเข้มข้นของ primer แต่ละคู่ให้เหมาะสมจนได้เส้นโค้งทุกเส้นมีความสูงเท่ากัน เมื่อตัวอย่างนั้นเป็นเพศหญิงที่มีจีโนไทป์ของยีน *GSTM1* เป็นแบบ wild type เพื่อแปลผล โดยเส้นโค้งลำดับที่ 1, 2 และ 3 จะแสดงถึงปริมาณของ PCR product ที่ได้จาก primer คู่ที่จำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณของยีน *dystrophin*, *GSTM1* และ  $\beta$ -actin ตามลำดับ และสามารถแปลผลจากกราฟได้ดังนี้คือ (1) ตัวอย่างเป็นเพศชายที่มี genotype ของยีน *GSTM1* เป็น heterozygote (2) ตัวอย่างเป็นเพศหญิงที่มี genotype ของยีน

*GSTM1* เป็น heterozygote (3) ตัวอย่างเป็นเพศหญิงที่มี genotype ของยีน *GSTM1* เป็นแบบ wild type (4) ตัวอย่างเป็นเพศชายที่มี genotype ของยีน *GSTM1* เป็นแบบ wild type

การเปรียบเทียบความถี่ของ *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1 alleles* ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมกับความถี่ในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบว่าในกลุ่มควบคุมจะพบ *GSTM1* และ *GSTT1* ที่เป็น homozygous mutant ร้อยละ 56.83 และ 28.06 ตามลำดับ ส่วน *GSTP1* จะพบ *GST P1 (Ile / Ile)* ร้อยละ 55.04 , *GST P1 (Ile / Val)* ร้อยละ 38.85 และ *GST P1 (Val / Val)* ร้อยละ 6.12 (ตารางที่ 7) โดย Genotype distribution ของกลุ่มทดลองเป็นไปตาม Hardy-Weinberg Equilibrium

ไม่พบความแตกต่างในการเพิ่มความถี่ต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในกลุ่มที่มี genotype เป็น *GSTM1* homozygous mutant (OR = 0.7414, 95% CI = 0.2722-2.0195,  $p = 0.5569$ ) และ *GSTT1* homozygous mutant (OR = 1.4706, 95% CI = 0.8510-2.5411,  $p = 0.1659$ ) ในขณะที่ผู้ที่มี genotype เป็น *GSTP1 (Ile/Val)* จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะน้อยกว่าถึง 0.5275 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (OR = 0.5275, 95% CI = 0.3331-0.8353,  $p = 0.0060$ ) นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มในการเพิ่มความถี่ต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในกลุ่ม *GSTT1* ที่เป็น Heterozygote (OR = 1.1.6471, 95% CI = 0.9907-2.7383,  $p = 0.0534$ ) (ตารางที่ 7)

**ตารางที่ 7** GST genotype ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

GST genotypes	Control (N=278)(%)	Patients (N=139)(%)	Odds ratio (OR)	95% CI	P value
<b><i>GSTM1</i></b>					
<i>GSTM1(+ / +)</i>	10 (3.60%)	7 (5.04%)	1.0 (ref.)	-	-
<i>GSTM1(+ / -)</i>	110 (39.57%)	50 (35.97%)	0.6494	0.2337-1.8046	0.4048
<i>GSTM1(- / -)</i>	158 (56.83%)	82 (58.99%)	0.7414	0.2722-2.0195	0.5569
<b><i>GSTP1</i></b>					
<i>GST P1 (Ile / Ile)</i>	153 (55.04%)	94 (67.63%)	1.0(ref.)	-	-
<i>GST P1 (Ile / Val)</i>	108 (38.85%)	35 (25.18%)	0.5275	0.3331-0.8353	0.0060*
<i>GST P1 (Val / Val)</i>	17 (6.12%)	10 (7.19%)	0.9574	0.4207-2.188	0.9164
<b><i>GSTT1</i></b>					
<i>GST T1(+ / +)</i>	100 (35.97%)	34 (24.46%)	1.0(ref.)	-	-
<i>GST T1(+ / -)</i>	100 (35.97%)	56 (40.29%)	1.6471	0.9907-2.7383	0.0534
<i>GST T1(- / -)</i>	78 (28.06%)	39 (35.25%)	1.4706	0.8510-2.5411	0.1659

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาใน *GSTM1* และ *GSTT1* โดยดูเฉพาะ present หรือ null allele ก็ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติของความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (ตารางที่ 8)

**ตารางที่ 8** GST genotype ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมเมื่อพิจารณาใน *GSTM1* และ *GSTT1* โดยดูเฉพาะ present หรือ null allele

GST genotypes	Control (N=278)(%)	Patients (N=139)(%)	Odds ratio (OR)	95% CI	P value
<i>GSTM1</i>					
Present	100 (43.17%)	57 (41.01%)	1.0 (ref.)	-	-
Null	158 (56.83%)	82 (58.99%)	0.9105	0.5978-1.3867	0.7419
<i>GSTP1</i>					
<i>GST P1 (Ile / Ile)</i>	153 (55.04%)	94 (67.63%)	1.0(ref.)	-	-
<i>GST P1 (Ile / Val)</i>	108 (38.85%)	35 (25.18%)	0.5275	0.3331-0.8353	0.0060*
<i>GST P1 (Val / Val)</i>	17 (6.12%)	10 (7.19%)	0.9574	0.4207-2.188	0.9164
<i>GSTT1</i>					
Present	200 (71.94%)	90 (64.75%)	1.0(ref.)	-	-
Null	78 (28.06%)	49 (35.25%)	1.3960	0.9033-2.1576	0.1639

#### 4.2 ผลการเปรียบเทียบปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน

เมื่อทำการวิเคราะห์โดยรวม genotype ของยีน *GSTP1* ที่เป็น *GST P1 (Ile / Val)* และ *GST P1 (Val / Val)* เข้าเป็นกลุ่มเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบกับยีน *GSTT1* และ *GSTM1* ที่มีการรวม wild type และ Heterozygous alleles เข้าด้วยกัน พบว่าในกลุ่มที่มี genotype เป็น *GSTT1* wild type และ/หรือ Heterozygote กับ *GSTP1* ที่เป็น *GST P1 (Ile / Val)* และ *GST P1 (Val / Val)* จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติถึง 0.5866 เท่า (OR = 0.5866, 95% CI = 0.3464-0.9932,  $p = 0.00460$ ) (ตารางที่ 9)

เมื่อแยกยีน *GSTP1* ออกเป็น *GST P1 (Ile / Ile)*, *GST P1 (Ile / Val)* และ *GST P1 (Val / Val)* จะพบว่ากลุ่มที่มี genotype เป็น *GSTT1* wild type และ/หรือ *GSTT1*

Heterozygous allele กับ *GST P1 (Ile / Val)* จะมีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ 0.4971 เท่า (OR = 0.4971, 95% CI = 0.2802-0.8819,  $p = 0.00158$ ) (ตารางที่ 10)

แต่ทั้งนี้เมื่อแยกทั้ง *GSTM1* และ *GSTT1* ออกเป็น wild type, Heterozygous alleles และ Homozygous alleles พบว่ากลุ่มที่มี genotype เป็น *GSTT1* Heterozygous allele และ *GST P1 (Ile / Ile)* มีความเสี่ยงมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ 2.3866 เท่า (OR = 2.3866, 95% CI = 1.2410-4.5896,  $p = 0.0083$ ) (ตารางที่ 11) นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นถึง 2.4421 เท่า เมื่อมี genotype เป็น *GSTT1* Homozygous allele กับ *GST P1 (Ile / Ile)* (OR = 2.4421, 95% CI = 1.2175-4.8985,  $p = 0.0110$ ) (ตารางที่ 11)

**ตารางที่ 9** การเปรียบเทียบ Double GST genotype ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเมื่อพิจารณา ยีน *GSTM1* และ *GSTT1* เป็น present หรือ null และ ยีน *GSTP1* เป็น *GSTP1 (Ile/Ile)* และ *GSTP1 (Ile/Val Or Val/Val)*

Double GST genotypes	Control (N=278)(%)	Patients (N=139)(%)	Odds ratio (OR)	95% CI	P value
<i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i>					
Both present	91 (32.73%)	37 (26.62%)	1.0		
Either Null	138 (49.64%)	73 (52.52%)	1.3010	0.8083-2.0940	0.2779
Both Null	49 (17.63%)	29 (20.86%)	1.4556	0.8009-2.6454	0.2170
<i>GSTM1</i> and <i>GSTP1</i>					
<i>M1(+ / +)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	68 (24.46%)	38 (27.34%)	1.0		
<i>M1(+ / +)</i> and <i>P1 (Ile / Val or Val / Val)</i>	52 (18.71%)	19 (13.67%)	0.6538	0.3384-1.2632	0.2046
<i>M1(- / -)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	85 (30.58%)	56 (40.29%)	1.1789	0.7002-1.9849	0.5350
<i>M1(- / -)</i> and <i>P1 (Ile / Val or Val / Val)</i>	73 (26.26%)	26 (18.71%)	0.6373	0.3504-1.1594	0.1385
<i>GSTT1</i> and <i>GSTP1</i>					
<i>T1(+ / +)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	113 (40.65%)	62 (44.60%)	1.0		
<i>T1(+ / +)</i> and <i>P1 (Ile / Val or Val / Val)</i>	87 (31.29%)	28 (20.14%)	0.5866	0.3464-0.9932	0.0460*
<i>T1(- / -)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	40 (14.39%)	32 (23.02%)	1.4581	0.834-2.5491	0.1847
<i>T1(- / -)</i> and <i>P1 (Ile / Val or Val / Val)</i>	38 (13.67%)	17 (12.23%)	0.8154	0.4255-1.5625	0.5381

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบ double GST genotype ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เมื่อพิจารณายีน *GSTM1* และ *GSTT1* เป็น present หรือ null และ ยีน *GSTP1* เป็น *GSTP1 Ile/Ile*, *GSTP1 (Ile/Val)* และ *GSTP1(Val/Val)*

Double GST genotypes	Control (N=278)(%)	Patients (N=139)(%)	Odds ratio (OR)	95% CI	P value
<i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i>					
Both present	91 (32.73%)	37 (26.62%)	1.0		
Either Null	138 (49.64%)	73 (52.52%)	1.3010	0.8083-2.094	0.2779
Both Null	49 (17.63%)	29 (20.86%)	1.4556	0.8009-2.6454	0.2171
<i>GSTM1</i> and <i>GSTP1</i>					
<i>M1</i> (+ / +) and <i>P1</i> ( <i>Ile</i> / <i>Ile</i> )	68 (24.46%)	38 (27.34%)	1.0		
<i>M1</i> (+ / +) and <i>P1</i> ( <i>Ile</i> / <i>Val</i> )	46 (16.55%)	16 (11.51%)	0.6224	0.3110-1.2455	0.1786
<i>M1</i> (+ / +) and <i>P1</i> ( <i>Val</i> / <i>Val</i> )	6 (2.16%)	3 (2.16%)	0.8947	0.2116-3.7827	0.8794
<i>M1</i> (- / -) and <i>P1</i> ( <i>Ile</i> / <i>Ile</i> )	85 (30.58%)	56 (40.29%)	1.1789	0.7002-1.9849	0.5355
<i>M1</i> (- / -) and <i>P1</i> ( <i>Ile</i> / <i>Val</i> )	62 (22.30%)	19 (13.67%)	0.5484	0.2865-1.0498	0.0681
<i>M1</i> (-/-) and <i>P1</i> ( <i>Val</i> / <i>Val</i> )	11 (3.96%)	7 (5.04%)	1.1388	0.4076-3.1816	0.8049
<i>GSTT1</i> and <i>GSTP1</i>					
<i>T1</i> (+/+) and <i>P1</i> ( <i>Ile</i> / <i>Ile</i> )	113 (40.65%)	62 (44.60%)	1.0		
<i>T1</i> (+/+) and <i>P1</i> ( <i>Ile</i> / <i>Val</i> )	77 (27.70%)	21 (15.11%)	0.4971	0.2802-0.8819	0.0158*
<i>T1</i> (+/+) and <i>P1</i> ( <i>Val</i> / <i>Val</i> )	10 (3.60%)	7 (5.04%)	1.2758	0.4627-3.5181	0.6375
<i>T1</i> (-/-) and <i>P1</i> ( <i>Ile</i> / <i>Ile</i> )	40 (14.39%)	32 (23.02%)	1.4581	0.8340-2.5491	0.1847
<i>T1</i> (-/-) and <i>P1</i> ( <i>Ile</i> / <i>Val</i> )	31 (11.15%)	14 (10.07%)	0.8231	0.4075-1.6626	0.5870
<i>T1</i> (-/-) and <i>P1</i> ( <i>Val</i> / <i>Val</i> )	7 (2.52%)	3 (2.16%)	0.7811	0.1950-3.1283	0.7268

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบ Double GST genotype ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เมื่อพิจารณายีน *GSTM1* และ *GSTT1* เป็น wild type, Heterozygous allele และ Mutant และ ยีน *GSTP1* เป็น *GSTP1 (Ile/Ile)*, *GSTP1 (Ile/Val)* และ *GSTP1(Val/Val)*

Double GST genotypes	Control (N=278)(%)	Patients (N=139)(%)	Odds ratio (OR)	95% CI	P value
<i>GSTM1</i> and <i>GSTP1</i>					
<i>M1(+ / +)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	7 (2.52%)	6 (4.32%)	1.0		
<i>M1(+ / +)</i> and <i>P1 (Ile / Val)</i>	3 (1.08%)	1 (0.72%)	0.3889	0.0315-4.7958	0.4520
<i>M1(+ / +)</i> and <i>P1 (Val / Val)</i>	0 (0.00%)	0 (0.00%)	-	-	-
<i>M1(+ / -)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	61 (21.94%)	32 (23.02%)	0.6120	0.1897-1.9746	0.4082
<i>M1(+ / -)</i> and <i>P1 (Ile / Val)</i>	43 (15.47%)	15 (10.79%)	0.4070	0.1179-1.4046	0.1473
<i>M1(+ / -)</i> and <i>P1 (Val / Val)</i>	6 (2.16%)	3 (2.16%)	0.5833	0.1000-3.4024	0.5474
<i>M1(- / -)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	85 (30.58%)	56 (40.29%)	0.7686	0.2455-2.4068	0.6507
<i>M1(- / -)</i> and <i>P1 (Ile / Val)</i>	62 (22.30%)	19 (13.67%)	0.3575	0.1071-1.1936	0.0855
<i>M1(- / -)</i> and <i>P1 (Val / Val)</i>	11 (3.96%)	7 (5.04%)	0.7424	0.1751-3.1482	0.6855
<i>GSTM1</i> and <i>GSTT1</i>					
<i>M1(+ / +)</i> and <i>T1(+ / +)</i>	4 (1.44%)	1 (0.72%)	1.0		
<i>M1(+ / +)</i> and <i>T1(+ / -)</i>	4 (1.44%)	3 (2.16%)	3.0000	0.2111-42.6260	0.4075
<i>M1(+ / +)</i> and <i>T1(- / -)</i>	2 (0.72%)	3 (2.16%)	6.0000	0.3544-101.5728	0.1966
<i>M1(+ / -)</i> and <i>T1(+ / +)</i>	47 (16.91%)	14 (10.07%)	1.1915	0.1230-11.5462	0.8794
<i>M1(+ / -)</i> and <i>T1(+ / -)</i>	36 (12.95%)	19 (13.67%)	2.1111	0.2201-20.2457	0.5090
<i>M1(+ / -)</i> and <i>T1(- / -)</i>	27 (9.71%)	17 (12.23%)	2.5185	0.2592-24.4711	0.4127
<i>M1(- / -)</i> and <i>T1(+ / +)</i>	49 (17.63%)	19 (13.67%)	1.5510	0.1627-14.7814	0.7004
<i>M1(- / -)</i> and <i>T1(+ / -)</i>	60 (21.58%)	34 (24.46%)	2.2667	0.2434-21.1086	0.4611
<i>M1(- / -)</i> and <i>T1(- / -)</i>	49 (17.63%)	29 (20.86%)	2.3673	0.2523-22.2138	0.4381
<i>GSTT1</i> and <i>GSTP1</i>					
<i>T1(+ / +)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	58 (20.86%)	19 (13.67%)	1.0		
<i>T1(+ / +)</i> and <i>P1 (Ile / Val)</i>	38 (13.67%)	12 (8.63%)	0.9640	0.4202-2.2117	0.9333
<i>T1(+ / +)</i> and <i>P1 (Val / Val)</i>	4 (1.44%)	3 (2.16%)	2.2895	0.4696-11.1609	0.2949
<i>T1(+ / -)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	55 (19.78%)	43 (30.94%)	2.3866	1.2410-4.5896	0.0083*
<i>T1(+ / -)</i> and <i>P1 (Ile / Val)</i>	39 (14.03%)	9 (6.47%)	0.7045	0.2890-1.7170	0.4397
<i>T1(+ / -)</i> and <i>P1 (Val / Val)</i>	6 (2.16%)	4 (2.88%)	2.0351	0.5186-7.9860	0.3011
<i>T1(- / -)</i> and <i>P1 (Ile / Ile)</i>	40 (14.39%)	32 (23.02%)	2.4421	1.2175-4.8985	0.0110*
<i>T1(- / -)</i> and <i>P1 (Ile / Val)</i>	31 (11.15%)	14 (10.07%)	1.3786	0.6093-3.1193	0.4401
<i>T1(- / -)</i> and <i>P1 (Val / Val)</i>	7 (2.52%)	3 (2.16%)	1.3083	0.3074-5.5682	0.7153



ทั้งนี้เมื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปฏิสัมพันธ์ของยีนทั้งสามชนิดด้วยโปรแกรม MDR แล้วพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงผลการคำนวณจากโปรแกรม MDR

Model	Training Bal.Acc	Testing Bal. Acc	Sign. Test(p)	CV consistency
X2	0.5695	0.5360	7(0.1719)	8/10
X2X3	0.6061	0.5917	8(0.0547)	10/10
X1X2X3	0.6231	0.5750	8(0.0547)	10/10

#### 4.3 ผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อระดับความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

เมื่อทำการวิเคราะห์โดยรวม genotype ของยีน *GSTP1* ที่เป็น *GST P1 (Ile / Val)* และ *GST P1 (Val / Val)* เข้าเป็นกลุ่มเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบกับยีน *GSTT1* และ *GSTM1* ที่มีการรวม wild type และ Heterozygote เข้าด้วยกัน เพื่อดูผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนทั้งสามกลุ่มต่อระดับความรุนแรงและชนิดของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติระหว่างความแตกต่างของ genotype เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างกันในยีนทั้ง 3 ชนิด ดังตารางที่ 13-15

ตารางที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกับ *GSTM1* genotype

Pathological features	GSTM1		Odd Ratio (OR)	95% CI
	Present no.(%)	Null no.(%)		
Stage				
Stage Low	43 (30.94)	60 (43.17)	1.0 (Ref.)	
StageHigh	14 (10.07)	22 (15.83)	1.1262	0.5183 - 2.4473
Grade				
Low	52 (37.41)	77 (55.40)	1.0 (Ref.)	
High	5 (3.60)	5 (3.60)	0.6753	0.1862 -2.4498

**ตารางที่ 14** แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกับ *GSTP1* genotype

Pathological features	<i>GSTP1</i>		Odd Ratio (OR)	95% CI
	Present no.(%)	Null no.(%)		
Stage				
Stage Low	71 (51.08)	32 (23.02)	1.0 (Ref.)	
StageHigh	23 (16.55)	13 (9.35)	1.2541	0.5647-2.7852
Grade				
Low	87 (62.59)	42 (30.22)	1.0 (Ref.)	
High	7 (5.04)	3 (2.16)	0.8878	0.2185-3.6064

**ตารางที่ 15** แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกับ *GSTT1* genotype

Pathological features	<i>GSTT1</i>		Odd Ratio (OR)	95% CI
	Present no.(%)	Null no.(%)		
Stage				
Stage Low	64 (46.04)	39 (28.06)	1.0 (Ref.)	
StageHigh	26 (18.71)	10 (7.19)	0.6312	0.2750-1.4488
Grade				
Low	82 (58.99)	47 (33.81)	1.0 (Ref.)	
High	8 (5.76)	2 (1.44)	0.4362	0.0889-2.1399

#### 4.5 ผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* เมื่อแยกตามจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่แบ่งตามประวัติการสูบบุหรี่

เนื่องจากการขาดข้อมูลประวัติการสูบบุหรี่ของผู้เข้าร่วมวิจัยในกลุ่มควบคุม จึงไม่สามารถทำการเปรียบเทียบปัจจัยเสี่ยงของการสูบบุหรี่กับความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ อย่างไรก็ตาม ผลของการเปรียบเทียบจีโนไทป์ของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* เมื่อแยกตามจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่แบ่งตามประวัติการสูบบุหรี่จะแสดงได้ดังตารางที่ 16

**ตารางที่ 16** แสดงผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* เมื่อแยกตามจีโนไทป์ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่แบ่งตามประวัติการสูบบุหรี่

Genotype	Smoking status				
	Pack year (%)				
	0	0 to <15	15 to < 30	30 to <45	≥45
<i>GSTM1</i>					
<i>GSTM1</i> (+/+)	5 (3.6)	0 (0)	1 (0.7)	1 (0.7)	0 (0)
<i>GSTM1</i> (+/-)	13 (9.4)	11 (7.9)	10 (7.2)	10 (7.2)	6 (4.3)
<i>GSTM1</i> (-/-)	19 (13.7)	14 (10.1)	23 (16.5)	12 (8.6)	14 (10.1)
<i>GSTP1</i>					
<i>GSTP1</i> (Ile/Ile)	22 (15.8)	16 (11.5)	27 (19.4)	14 (10.1)	15 (10.8)
<i>GSTP1</i> (Ile/Val)	11 (7.9)	6 (4.3)	5 (3.6)	8 (5.8)	5 (3.6)
<i>GSTP1</i> (Val/Val)	4 (2.9)	3 (2.2)	2 (1.4)	1 (0.7)	0 (0)
<i>GSTT1</i>					
<i>GSTT1</i> (+/+)	9 (6.5)	6 (4.3)	7 (5.0)	9 (6.5)	3 (2.2)
<i>GSTT1</i> (+/-)	16 (11.5)	8 (5.8)	14 (10.1)	9 (6.5)	9 (6.5)
<i>GSTT1</i> (-/-)	12 (8.6)	11 (7.9)	13 (9.4)	5 (3.6)	8 (5.8)

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อทราบความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของ ยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* กับการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในคนไทย ซึ่งพบว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (OR = 0.5275, 95% CI = 0.3331-0.8353,  $p = 0.0060$ ) สำหรับผลของการมี จีโนไทป์ *GSTP1* (*Val/Val*) ที่ไม่พบมีนัยสำคัญทางสถิติในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะนั้น อาจเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนซึ่งมีผลจากอิทธิพลของยีน *GSTM1* ที่มีการศึกษาพบว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ *GSTM1* homozygous mutant มีแนวโน้มในการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ(9) เข้ามาเกี่ยวข้อง โดยจากข้อมูลพบว่าผู้เข้าร่วมวิจัยในกลุ่ม ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้ง 10 คนที่มีจีโนไทป์ *GSTP1* (*Val/Val*) มีผู้ที่มีจีโนไทป์ *GSTM1* homozygous mutant ทั้งหมด 7 คน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 70 จึงอาจทำให้เห็นผลในการป้องกันความเสี่ยงไม่ชัดเจนเท่ากับกลุ่มที่มีจีโนไทป์ *GSTP1* (*Ile/Val*) ซึ่งจากทั้งหมด 35 คน นั้นมีผู้ที่มีจีโนไทป์ *GSTM1* homozygous mutant 19 คน ซึ่งคิดเป็นเพียงร้อยละ 54.3 ทั้งนี้เพื่อการยืนยันผลดังกล่าวให้ชัดเจนขึ้น อาจต้องมีการเพิ่มจำนวนประชากรในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ส่วนผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน *GSTP1* กับยีน *GSTT1* พบว่าในกลุ่มที่มีจีโน ไทป์ *GSTT1* present alleles กับ *GSTP1* (*Ile / Val* or *Val / Val*) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิด มะเร็งกระเพาะปัสสาวะน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ(OR = 0.5866, 95% CI = 0.3464-0.9932,  $p = 0.0460$ ) และการมีจีโนไทป์เป็น *GSTT1* heterozygous mutant และ *GST P1* (*Ile / Ile*) พบว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ 2.3866 เท่า (OR = 2.3866, 95% CI = 1.2410-4.5896,  $p = 0.0083$ ) และจะมีความเสี่ยง เพิ่มขึ้นถึง 2.4421 เท่า เมื่อมี genotype เป็น *GSTT1* Homozygous mutant กับ *GST P1* (*Ile / Ile*) (OR = 2.4421, 95% CI = 1.2175-4.8985,  $p = 0.0110$ ) รวมทั้งการมีแนวโน้มในการเพิ่ม ความเสี่ยงเมื่อมีจีโนไทป์เป็น *GSTM1* homozygous mutant และ *GSTP1* (*Val/Val*) จากการที่ กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีความถี่มากกว่ากลุ่มควบคุมแม้ว่าผลดังกล่าวจะไม่มี นัยสำคัญทางสถิติก็ตาม

ทั้งนี้แม้ว่าผลของการลดความเสี่ยงเมื่อมีจีโนไทป์เป็น *GSTP1*(*Ile/Val*) ที่ได้จาก การศึกษาในครั้งนี้จะแตกต่างกับงานวิจัยที่ศึกษาในกลุ่มคนอินเดียที่พบว่าผู้ที่มีจีโนไทป์ *GSTP1*

(*Ile/Val*) มีความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมากกว่าคนปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (OR = 1.98, 95% CI = 1.23 – 3.20,  $p = 0.0050$ ) (7) แต่ก็พบว่ามีการวิจัยที่พบผลเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเมื่อมีจีโนไทป์เป็น *GSTP1* (*Ile/Ile*) (OR = 6.5, 95% CI = 1.01-41.5)(30) รวมทั้งการศึกษาที่พบว่าการศึกษาที่พบว่าการมีจีโนไทป์ *GSTP1* (*Val/Val*) จะทำให้มีเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงสารกลุ่ม *bezo[α]pyrene* มากกว่า 3.4 เท่า และมีประสิทธิภาพต่อการเปลี่ยนแปลงสาร diol epoxide of chrysene และ (+)-anti-1,2-dihydroxy-3,4-Oxy-1,2,3,4-tetrahydrochrysene((+)-anti-CDE) มากกว่าถึง 5.3 เท่า(21) ซึ่งผลต่างๆ เหล่านี้ล้วนสอดคล้องและรองรับผลของการศึกษาที่พบการลดความเสี่ยงเมื่อมีจีโนไทป์เป็น *GSTP1*(*Ile/Val*) ทั้งสิ้น

สำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1* และ *GSTT1* นั้นพบว่าในกลุ่มควบคุมพบ *GSTM1* homozygous mutant เพียงร้อยละ 56.83 ซึ่งน้อยกว่าที่เคยมีการทำการศึกษาในคนไทยสุขภาพดีที่พบถึงร้อยละ 62.7 (12) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณายีน *GSTM1* และ *GSTT1* โดยแยกออกเป็นเฉพาะ present หรือ null allele เพื่อเปรียบเทียบผลกับงานวิจัยชิ้นอื่นๆ ที่มีการแบ่งกลุ่มในลักษณะเดียวกันนี้ พบว่า *GSTM1* และ *GSTT1* null allele มีความถี่สูงกว่าในกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม(*GSTM1* = 58.99% และ *GSTT1* = 35.25%) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาในกลุ่มคนเกาหลี(31) และคนอินเดีย (7)

นอกจากนี้ เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ต่อการนำไปเป็นตัวชี้บ่งที่อาจช่วยทำนายระดับความรุนแรงและการดำเนินของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จึงมีการศึกษาเปรียบเทียบจีโนไทป์ของยีนทั้งสามกลุ่มกับระดับของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยแบ่งตามความรุนแรงของโรคคือ Low stage หรือ Superficial bladder cancer (SBC) และ High stage หรือ Invasive bladder cancer (IBC) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่แสดงถึงนัยสำคัญทางสถิติในการเพิ่มหรือลดความเสี่ยงต่อระดับความรุนแรงของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ แม้จะมีแนวโน้มว่าผู้ที่มี *GSTM1* genotype homozygous mutant จะมีความเสี่ยงในการพัฒนาของเนื้องอกเป็น SBC มากกว่า

สำหรับการศึกษาปัจจัยทางด้านพฤติกรรม การสูบบุหรี่ซึ่งจะส่งผลต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะนั้น เนื่องจากขาดข้อมูลดังกล่าวในกลุ่มควบคุม จึงไม่สามารถนำมาศึกษาผลกระทบจากปัจจัยดังกล่าวได้

อาจกล่าวโดยสรุปได้ว่าผลการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* กับความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในงานวิจัยในครั้งนี้ ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาในกลุ่มคนไทย คือมีแนวโน้มในการเพิ่มความเสี่ยงในกรณีของการมีจีโนไทป์ของ *GSTM1* และ *GSTT1* เป็น homozygous mutant ส่วนการมีจีโนไทป์เป็น *GSTP1* heterozygous mutant นั้นพบว่าจะลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## รายการอ้างอิง

- (1) Santipong, S. Urinary bladder. In Cancer in Thailand, pp.56-58. Bangkok: National Cancer Institute of Thailand, 1997.
- (2) Pashos, C.L.; Botteman, M.F.; Laksin, B.L.; and Redaelli, A. Bladder cancer : Epidemiology, diagnosis and management. Cancer Practice. 6(November 2002): 311-322.
- (3) Franekova, M.; Halasova, E.; Bukovska, E.; Luptak, J.; and Dobrota, D. Gene polymorphisms in bladder cancer. Urologic Oncology: Seminars and original investigations. 26(2008): 1-8.
- (4) Zhang, D.; Zhu, M.; and Humphreys, W.G. Drug metabolism in drug design and development. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007
- (5) Strange, R.C.; Spiteri, M.A.; and Ramachandran, S. Glutathione S-transferase family of enzymes. Mutat. Res. 482(2001): 21-26.
- (6) Eliane, K., et al. Pooled Analysis and Meta-analysis of the Glutathione S Transferase P1 Ile 105Val Polymorphism and Bladder Cancer : A HuGE-GSEC Review. Am. J. Epidemiol. 165(2002): 1221-1230.
- (7) Srivastava, D.S.; Mishra, D.K.; Mandhani, A.; Mittal, B.; Kumar, A.; and Mittal, R.D. Association of genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1, T1, P1 and susceptibility to bladder cancer. European Urology. 48(2005): 339-344.
- (8) Ma, Q.W., et al. Polymorphism of glutathione S-transferase T1, M1 and P1 genes in a Shanghai population: patients with occupational or non-occupational bladder cancer. Biomed Environ Sci. 15(2002): 253-260.
- (9) Engel, L.S., et al. Pooled Analysis and Meta-analysis of Glutathione S-Transferase M1 and Bladder Cancer: A HuGE Review. Am J Epidemiol 156 (2002): 95-109.
- (10) Brocmoller, J.; Cascorbi, I.; Kerb, R.; and Roots, I. Combined analysis of inherited polymorphism in arylamine N-acetyltransferases, glutathione S-transferase M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and CYP 450 enzyme as modulator of bladder cancer risk. Cancer Res. 56(1996): 3915-3925.

- (11) Salagovic, J., et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase M1 and T1 as risk factor in lung and bladder cancer. Neoplasma. 45(1998): 312-317.
- (12) Sangrajrang, S.; Jedpiyawongse, A.; and Srivatanakul, P. Genetic polymorphism of CYP2E1 and GSTM1 in a Thai population. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 7(2006): 415-419.
- (13) Sadetzki, S; Bensal, D.; Blumstein, T.; Novikov, I; and Modan, B. Selected risk factors for transitional cell bladder cancer. Med Oncol. 17(2000): 179-182.
- (14) Dominguez, M; Renganathan, E.; Yuan, J.M.; and Ross, R.K. Use of permanent hair dyes and bladder cancer risk. Int J. Cancer. 91(2001) 575-579.
- (15) อนันต์ชัย อัครเมฆิน. การบริบาลทางเภสัชกรรมคลินิกในยุคหลังจีโนมิกส์. วงการยา 89(2548) : 5-14.
- (16) Song, Z.H; Higgins, J; Pharoah, P; and Danesh, J. Five glutathione S-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. Lung cancer an meta-analysis. 3(2006): 524-534.
- (17) Pearson, W.R.; Vorachek, W.R.; Xu, S.J.; Berger, R.; Hart, J.; Vannais, D; and Patterson, D. Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1–GSTM5 on human chromosome 1p13. Am. J. Hum. Genet. 53(1993): 220–233.
- (18) Xu, S.J.; Wang, Y.P.; Roe, B.; and Pearson, W.R. Characterization of the human class mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. J. Biol. Chem. 273(1998): 3517–3527.
- (19) Widersten, M.; Pearson, W.R.; Engstrom, A.; and Mannervik, B. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and pi. Biochem. J. 276(1991): 519–524.
- (20) Garte, S.; Gaspari, L.; Alexandrie, A.K.; Ambrosone, C.; Autrup, H.; and Aurup, J.L. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev 10(2001) : 1239–1248.
- (21) Sundberg, K.; Johansson, A.S.; and Stenberg, G. et al., Differences in the Catalytic Efficiencies og Allelic varaints of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. Carcinogenesis. 19(1998): 433-436.

- (22) Cowell, I.G.; Dixon, K.H.; Pemble, S.E.; Ketterer, B.; and Taylor, J.B. The structure of the human glutathione S-transferase pi gene, Biochem. J. 255(1988): 79–83.
- (23) Morrow, C.S.; Cowan, K.H.; Goldsmith, M.E. Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene, Gene 75(1989): 3–11.
- (24) Pemble, S.E.; Taylor, J.B. An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. Biochem. J. 287 (1992): 957-963.
- (25) Landi, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. Mutation Res 463(2000) : 247–283.
- (26) Nelson, H.H.; Wiencke, J.K.; Christiani, D.C.; Cheng, T.J.; Zuo, Z.F.; and Schwartz, B.S. et al. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. Carcinogenesis 16(1995): 1243–1245.
- (27) Harries, L.W.; Stubbins, M.J.; and Forman, D et al. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. Carcinogenesis. 18(1997): 641–644.
- (28) Mittal, R.D.; Srivastava, D.S.; and Mandhani, A. et al. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes (CYP2E1, GSTP1) and susceptibility to bladder cancer in North India. Asian Pac J Cancer Prev. 6(2005): 6–9.
- (29) Toruner, G.A.; Akyerli, C.; and Ucar, A. et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and bladder cancer susceptibility in the Turkish population. Arch Toxicol. 75(2001): 459–464.
- (30) Cao, W.; Cai, L.; and Rao, J.Y. et al. Tobacco smoking, GSTP1 polymorphism, and bladder carcinoma. Cancer. 104(2005): 2400–2408.
- (31) Jeong, H.J. et al. Association between glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and increased risk for bladder cancer in Korean smokers. Cancer Letters. 202(2003): 193-199.

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกัญนิกา ประดับแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 19 พฤษภาคม 2522 ที่อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีเกศาสตรบัณฑิต คณะเกศาสตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2546. และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรเกศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเกศาสตรวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2549.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย