

การตรวจหาภาวะขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลันหลังการเสียชีวิต โดยใช้ miR-155

miR-210 และ miR-373



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POSTMORTEM DETECTION OF ACUTE HYPOXIA USING miR-155, miR-210 AND miR-373



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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาภาวะขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลันหลังการ เสียชีวิต โดยใช้ miR-155 miR-210 และ miR-373
โดย	นางสาวรุ่งทิพย์ มาติ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ นายแพทย์ กรวิก มีศิลป์วิภักย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชร ลิ้มปนสีทิทธิกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ นายแพทย์ กรวิก มีศิลป์วิภักย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ซาลิสยา หลุยเจริญ ชีพสุนทร)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค)

รุ่งทิพย์ มาดี : การตรวจหาภาวะขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลันหลังการเสียชีวิต โดยใช้ miR-155 miR-210 และ miR-373 (POSTMORTEM DETECTION OF ACUTE HYPOXIA USING miR-155, miR-210 AND miR-373) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. นพ. กรวิก มี ศิลปวิภักย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. นพ. กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน, หน้า.

การเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลันเป็นสาเหตุการเสียชีวิตพบได้ทั่วไปในทางนิติเวชศาสตร์ แต่บางกรณีจะไม่พบร่องรอยการเสียชีวิตทำให้ยากในการวินิจฉัยหาสาเหตุการเสียชีวิต จุดประสงค์ของงานวิจัยเพื่อศึกษาการแสดงออกของ miR-155 miR-210 และ miR-373 เพื่อนำมาใช้เป็นตัวกำหนดชีวภาพช่วยวินิจฉัยหาสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน โดยศึกษาในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลันและกลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี โดยใช้เทคนิค Real-time qPCR พบว่ามีมีการแสดงออกของ miR-155 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลันสูงเป็น 2.27 เท่า ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ขณะที่พบการแสดงออกของ miR-373 น้อยมากทั้งในกลุ่มเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลันและกลุ่มควบคุม และ miR-210 ต้องใช้ขนาดตัวอย่างจำนวนมาก ผู้วิจัยคาดว่า การแสดงออกของ miR-210 ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปผลการศึกษา miR-155 ที่สามารถนำไปใช้เป็นตัวกำหนดชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยการเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน miR-210 และ miR-373 ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นตัวกำหนดชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยการเสียชีวิตในกรณีดังกล่าว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5774077630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: POSTMORTEM, ACUTE HYPOXIA, MIR-155, MIR-210, MIR-373, REAL TIME PCR

RUNGTIP MADEE: POSTMORTEM DETECTION OF ACUTE HYPOXIA USING miR-155, miR-210 AND miR-373. ADVISOR: KORAVIK MEESILPAVIKKAI, M.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PROF. KORNKIAT VONGPAISARNSIN, M.D., pp.

Acute hypoxic death has been generally determined as a cause of death in forensic examination. There are some circumstances that showed no gross anatomical change and thus increased the difficulty in determining hypoxia as cause of death. Recent studies demonstrated that miRNA could be used as a biomarker for acute hypoxia. We investigated miR-155 miR-210 and miR-373 expressions between acute hypoxic case and control groups by quantitative RT-PCR. miR-155 was significantly higher in acute hypoxic group than control group (2.27-fold, $p < 0.05$). While miR-373 showed very low level of expression in both groups. In addition, calculated sample size of miR-210 is extremely large suggested that the expression of miR-210 probably not statistically significant between both groups. In summary, miR-155 could be a promising tool for determining cause of death in hypoxia case. miR-210 and miR-373 are unsuitable as a diagnosis marker for postmortem acute hypoxia.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2017

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือของอาจารย์ นายแพทย์กรวิก มีศิลป์วิภักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ กรเกียรติ วงศ์ไพศาลสิน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินการวิจัยอีกด้วย ขอขอบคุณพี่ ๆ นิติเซโรวิทยา-พันธุศาสตร์ นิติพยาธิวิทยา และศูนย์อำนวยการชันสูตรพลิกศพ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับคำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจในทุก ๆ ด้าน ขอขอบคุณพี่ๆ แพทย์ประจำบ้านภาควิชานิติเวชศาสตร์ ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อน ๆ น้อง ๆ นิสิต ป.โท นิติวิทยาศาสตร์ทุกคนที่อยู่เคียงข้าง และให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัวที่เปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน ตลอดจนคอยช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	ญ
สารบัญตาราง.....	ฎ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1. บทนำ (Introduction).....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale).....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย.....	2
1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย.....	3
บทที่ 2	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of the related literatures).....	4
2.1 Acute hypoxia.....	4
2.2 การใช้ Immunohistochemistry ในการตรวจวินิจฉัยการเสียชีวิตจากการขาด อากาศแบบเฉียบพลัน	4
2.3 การใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ในการหาสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบ เฉียบพลัน	5
2.4 ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNAs, miRNAs).....	7
2.5 miRNA ที่เกี่ยวข้องกับ acute hypoxia.....	8

2.5.1 Pathway of hypoxia.....	8
2.5.2 miRNA ที่เกี่ยวข้องกับ hypoxia	10
2.5.2.1 miR-155	10
2.5.2.2 miR-210	10
2.5.2.3 miR-373	12
บทที่ 3	15
วิธีดำเนินการวิจัย	15
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design).....	15
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)	15
3.2.1 การหาขนาดตัวอย่างที่เหมาะสม.....	15
3.2.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)	16
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	17
3.3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	17
3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	17
3.3.3 การขอความยินยอมในการเก็บตัวอย่าง	18
3.3.4 การเตรียมตัวอย่างเลือด (Sample preparation).....	18
3.3.5 ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่าง (miRNeasy Serum/Plasma Protocol).....	18
3.3.6 ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA (Reverse Transcription) (TaqMan Small RNA Assays Protocol).....	20
3.3.7 การวัดปริมาณ cDNA (Real-time PCR).....	21
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล	22
บทที่ 4	23
ผลการวิจัย	23

4.1 ลักษณะตัวอย่างของกลุ่ม Acute hypoxia และ กลุ่ม Control.....	23
4.2 คุณภาพและความเข้มข้นของ RNA ที่ได้จากการสกัด	25
4.3 การเลือก Endogenous control ที่เหมาะสม.....	25
4.4 การหาขนาดตัวอย่างที่เหมาะสม	26
4.5 การแสดงออกของ miRNA marker.....	27
บทที่ 5	29
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	29
รายการอ้างอิง.....	32
ภาคผนวก.....	38
ภาคผนวก ก.....	39
ภาคผนวก ข.....	43
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	50

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 Petechial hemorrhages บนผิวหนังบริเวณเยื่อบุเปลือกตา.....	1
รูปที่ 2 แสดงวิธีการสังเคราะห์ miRNAs	7
รูปที่ 3 แสดงการควบคุมการทำงานของ HIF α ในภาวะ normoxia and hypoxia	8
รูปที่ 4 แสดง activity โปรตีน HIF-1 α และ HIF-2 α ในภาวะ hypoxia	9
รูปที่ 5 แสดง miR-210 ที่มีผลต่อระดับ HIF-1 α	11
รูปที่ 6 การแสดงออกของ miR-155 ระหว่างกลุ่ม acute hypoxia และ กลุ่ม control.....	28

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การวินิจฉัยทางคลินิกของ miR-155 miR-210 และ miR-373 ที่เกี่ยวข้องกับ Acute hypoxia	13
ตารางที่ 2 รายละเอียดของ miRNA marker และ endogenous control ที่ใช้ในงานวิจัย	18
ตารางที่ 3 การเตรียม reverse transcription master mix.....	20
ตารางที่ 4 Condition ในการตั้งค่า RT-PCR	21
ตารางที่ 5 การเตรียม Real-Time PCR reaction mix.....	21
ตารางที่ 6 Condition ในการตั้งค่า Real-time PCR.....	22
ตารางที่ 7 แสดงลักษณะของตัวอย่างของกลุ่ม acute hypoxia และ กลุ่ม control	23
ตารางที่ 8 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตในกลุ่ม acute hypoxia และปริมาณของเซลล์ Purkinje	24
ตารางที่ 9 แสดงความเข้มข้นของ RNA ที่ได้จากการสกัดในกลุ่ม acute hypoxia และ กลุ่ม control	25
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบแสดงออกของ endogenous control miR-191 และ miR-126 ในกลุ่ม acute hypoxia และ control.....	26
ตารางที่ 11 สรุปการแสดงออกของ miR-155 และ miR-210 ของกลุ่ม acute hypoxia กลุ่ม control และขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมของแต่ละ miRNA marker	26
ตารางที่ 12 การแสดงออกของ miR-155 ในกลุ่ม acute hypoxia และกลุ่ม control.....	27

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำ (Introduction)

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

การเสียชีวิตจากขาดอากาศ หรือ Asphyxial death เป็นการเสียชีวิตจากการขัดขวางกระบวนการหายใจ ทำให้เนื้อเยื่อขาดออกซิเจน โดยเฉพาะเนื้อเยื่อและเซลล์สมองส่งผลทำให้หมดสติและเสียชีวิต^(1, 2) ภาวะขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน หรือ Acute hypoxia เป็นภาวะที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อของสมองและอวัยวะสำคัญ มีการลดระดับของออกซิเจนลงอย่างเฉียบพลัน ตัวอย่างสาเหตุของการเสียชีวิตจากการขาดอากาศเช่น จมน้ำ แขนงคอ ถูกบีบรัด หรือเสียชีวิตจากการถูกกดทับบริเวณหน้าอก

พยาธิสภาพที่พบได้บ่อยจากการตรวจศพกรณีที่มีการขาดอากาศ^(1, 2) ประกอบด้วย

1. จุดเลือดออก (Petechial hemorrhages) บนผิวหนังบริเวณใบหน้าและเยื่อบุเปลือกตา (รูปที่ 1)
2. การคั่งของเลือดและบวมน้ำ (Congestion and edema) บริเวณใบหน้า
3. ใบหน้าและเยื่อบุตาเขียวคล้ำ (Cyanosis)
4. การคั่งของเลือดในหัวใจห้องขวา (Right side heart engorgement) และความเหลวของเลือดผิดปกติ (Abnormal fluidity of the blood)



รูปที่ 1 Petechial hemorrhages บนผิวหนังบริเวณเยื่อบุเปลือกตา⁽²⁾

ทั้งนี้พยาธิสภาพที่กล่าวมาข้างต้นนั้นไม่ได้เป็นลักษณะเฉพาะของสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดอากาศเพียงอย่างเดียว แต่ยังสามารถตรวจพบได้ในการเสียชีวิตจากสาเหตุอื่น ๆ ด้วยเช่นกัน จึงต้องอาศัยการวัดสัญญาณที่เกี่ยวข้อง และการตรวจสอบสถานที่เกิดเหตุเพื่อเป็นส่วนช่วยประกอบในการวินิจฉัยหาสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดอากาศ

ปัจจุบันการวินิจฉัยที่ใช้เป็นมาตรฐานเพื่อหาสาเหตุของการเสียชีวิต คือการชันสูตรศพ (Autopsy) แต่ในบางกรณีการชันสูตรศพไม่สามารถให้ข้อมูลที่ชัดเจนถึงสาเหตุการเสียชีวิตได้ โดยเฉพาะกรณีขาดอากาศ เช่น ในกรณีการจมน้ำเสียชีวิต ทางผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการหา Biomarker สำหรับการตรวจวิเคราะห์ เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการหาสาเหตุของการเสียชีวิต โดยการนำไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA) มาใช้เป็นตัวบ่งชี้สาเหตุการเสียชีวิตจากภาวะขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน

miRNA เป็น RNA สายสั้นๆ ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโดยจับกับ mRNA เพื่อยับยั้งกระบวนการ translation⁽³⁾ นอกจากนี้ miRNA สามารถตรวจพบได้ในเลือด⁽⁴⁾ ทำให้งานต่อการเก็บตัวอย่างเหมาะสมที่จะนำมาเป็น biomarker ในงานด้านนิติเวชศาสตร์ จากการศึกษาของ Holmquist-Mengelbier และคณะ⁽⁵⁾ พบว่า Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1 α) เป็น transcription factor หลักในการตอบสนองต่อภาวะขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน ผู้วิจัยจึงเลือก miRNA ที่ถูกกระตุ้นด้วย HIF-1 α ซึ่งประกอบด้วย miR-155 miR-210 และ miR-373 โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNA marker ในเลือดของผู้เสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน กับคนปกติที่มีสุขภาพดี โดยใช้เทคนิค real-time PCR และยังไม่มีการวิจัยใดที่ใช้ miRNA ดังกล่าว เป็น Biomarker ตรวจหาสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลันมาก่อน

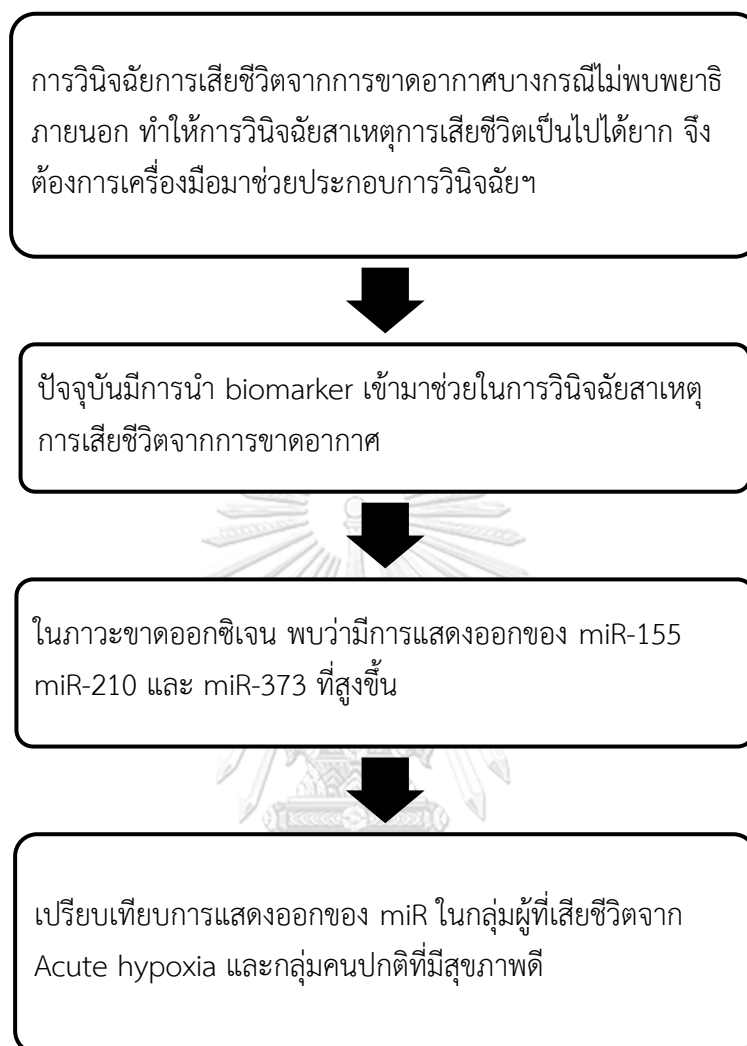
1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของ miR-155 miR-210 และ miR-373 ในผู้เสียชีวิตจาก Acute hypoxia
2. เพื่อศึกษาความคงสภาพของ miRNA ในเลือดหลังการเสียชีวิต

1.3 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

สามารถนำ miR-155 miR-210 และ miR-373 มาประยุกต์ใช้ในการทำนายหาสาเหตุของการเสียชีวิตในกลุ่ม Acute hypoxia ได้

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review of the related literatures)

2.1 Acute hypoxia

acute hypoxia เป็นภาวะที่เนื้อเยื่อมีการขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน เป็นระยะเวลาสั้นกว่า 3 ชั่วโมง ส่งผลให้ร่างกายขาดอากาศและเสียชีวิต การเสียชีวิตจาก acute hypoxia อาทิ กลุ่มที่เสียชีวิตจากการขาดอากาศ (asphyxia) เช่น ทางเดินหายใจอุดตัน (airway obstruction) เลือดออกเฉียบพลัน (acute hemorrhage) การอุดตันของถุงลมโดยการบวมน้ำหรือการอักเสบจากการติดเชื้อ (blockage of alveoli by edema or infectious exudate) และระบบหัวใจล้มเหลวเฉียบพลัน (abrupt cardiorespiratory failure)^(6, 7)

2.2 การใช้ Immunohistochemistry ในการตรวจวินิจฉัยการเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน

ในปี 2005 การศึกษาของ Kuhn J. และคณะ⁽⁸⁾ ได้มีการศึกษาการแสดงออกของ Microtubule-associated protein 2 (MAP2) ในเนื้อเยื่อสมองส่วน hippocampus (areas CA1-CA4) และ frontal cortex (layers II-VI) ที่ได้จากการผ่าชันสูตร แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม control เป็นกลุ่มที่เสียชีวิตอย่างฉับพลัน และกลุ่ม hypoxia-ischemia เป็นกลุ่มที่เสียชีวิตจากการขาดอากาศ พบว่า สมองส่วนของ hippocampus การแสดงออกของ MAP2 จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม hypoxia-ischemia เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ผู้วิจัยคาดว่า MAP2 สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการวินิจฉัยในการเสียชีวิตได้

การศึกษาของ Bartschat S. และคณะ⁽⁶⁾ ในปี 2012 ได้มีการนำ Calbindin-D28k ซึ่งเป็น Calcium-binding protein มาใช้เป็นตัวบ่งชี้จากการเสียชีวิตที่เกิดจาก acute hypoxia โดยนำเนื้อเยื่อของสมองส่วน Cerebellum ของผู้เสียชีวิต แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เสียชีวิตจาก acute hypoxia เช่น เสียชีวิตจากการจมน้ำ (Drowning) หรือจากการขาดอากาศ (Asphyxia) กลุ่มที่ 2 เสียชีวิตจากหัวใจล้มเหลว เช่น Myocardial infarction และกลุ่มสุดท้ายเสียชีวิตจากการได้รับการ

บาดเจ็บที่สมองอย่างรุนแรง พบว่าในกลุ่มที่เสียชีวิตจาก acute hypoxia มีการแสดงออกของ Calbindin-D28k binding protein ใน Purkinje cells (PC) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสียชีวิตจากการได้รับการบาดเจ็บที่สมองอย่างรุนแรง ($p < 0.05$) และกลุ่มที่เสียชีวิตจากหัวใจล้มเหลว ($p < 0.001$) ผู้วิจัยคาดว่าจะสามารถใช้ Calbindin-D28k เป็นตัวบ่งชี้ใช้เป็นข้อมูลช่วยประกอบในการหาสาเหตุของการเสียชีวิตที่เกิดจาก acute hypoxia ได้

อย่างไรก็ตาม การใช้ Immunohistochemistry เป็น biomarker ในการตรวจหาสาเหตุของการเสียชีวิตมีข้อจำกัด เนื่องจากมีขั้นตอนยุ่งยากในการเตรียมเนื้อเยื่อและใช้เวลานาน 5-7 วัน

2.3 การใช้เอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ในการหาสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน

การศึกษาของ Ishida K. และคณะ⁽⁹⁾ ในปี 2002 ใช้การแสดงออกของ mRNA เป็น biomarker ในผู้เสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน โดยดูอัตราส่วนการแสดงออกของ mRNA ระหว่าง Surfactant-associated protein A1 (SP-A1) และ Surfactant-associated protein A2 (SP-A2) เนื่องจากการแสดงออกของ SP-A mRNA จะถูกควบคุมโดยปัจจัยทั้ง adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP), glucocorticoids, interferon γ (IFN γ) และ tumor necrosis factor α (TNF α) เพื่อตรวจหาระดับการแสดงออกของ SP-A1 และ SP-A2 ในผู้เสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลันที่แตกต่างจากการเสียชีวิตแบบอื่น โดยนำเนื้อเยื่อจากปอดในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน และกลุ่มควบคุมที่เสียชีวิตจาก acute myocardial infarction หรือเสียชีวิตจากการที่สมองได้รับการบาดเจ็บเฉียบพลัน พบว่าอัตราส่วนการแสดงออกของ mRNA ระหว่าง SP-A1 และ SP-A2 จะมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในปี 2006 การศึกษาของ Zhao D. และคณะ⁽¹⁰⁾ ได้ศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออก mRNA Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) Erythropoietin (EPO) และ Vascular endothelial growth factor (VEGF) โดยใช้เทคนิค Quantitative RT-PCR และใช้ mRNA GAPDH เป็น endogenous control ในเนื้อเยื่อไตชั้น cortex ทั้ง 2 ข้างของผู้เสียชีวิตแบ่งเป็น 6 กลุ่มดังนี้

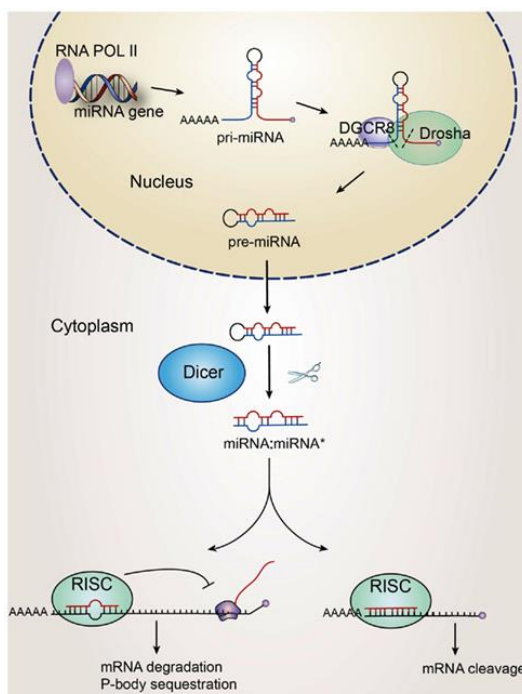
1. fatal blunt/sharp instrument injuries (n = 53/31)
2. asphyxia (n = 28: aspiration, n = 8; strangulation/hanging, n = 20)

3. drowning (n = 27)
4. fire fatality (n = 62)
5. acute myocardial infarction/ischemia (AMI, n = 39)
6. gastrointestinal hemorrhage (n = 5)

พบว่าในผู้เสียชีวิตจากการจมน้ำ (drowning) จะมีการแสดงออกของ HIF-1a และ EPO mRNAs น้อยกว่ากลุ่มอื่น ๆ และในผู้เสียชีวิตจาก acute myocardial infarction พบการแสดงออกของ VEGF mRNA มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่การแสดงออกของ mRNA VEGF จะลดลงในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการขาดอากาศ ผู้วิจัยคาดว่า mRNA VEGF ไม่ sensitive ในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการขาดอากาศ แต่สามารถใช้ mRNA VEGF มาเป็นตัวบ่งชี้ช่วยวินิจฉัยในผู้เสียชีวิตจาก acute myocardial infarction ได้

อย่างไรก็ตาม mRNA ไม่เหมาะที่จะมาใช้เป็น Biomarker เนื่องจาก mRNA จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ ribonuclease ภายหลังการเสียชีวิต⁽¹¹⁾ จึงเริ่มมีการใช้ miRNA มาเป็น biomarker เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจาก miRNA จะสามารถต้านทานต่อการย่อยของเอนไซม์ ribonuclease⁽¹²⁾ เพราะ miRNA ถูกหุ้มด้วย microvesicles (MV) หรือจับกับโปรตีนทำให้ทนต่อการย่อยสลาย และมีความเสถียรอยู่ได้นานถึง 12 ชั่วโมง ภายหลังการเสียชีวิต^(13, 14)

2.4 ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNAs, miRNAs)



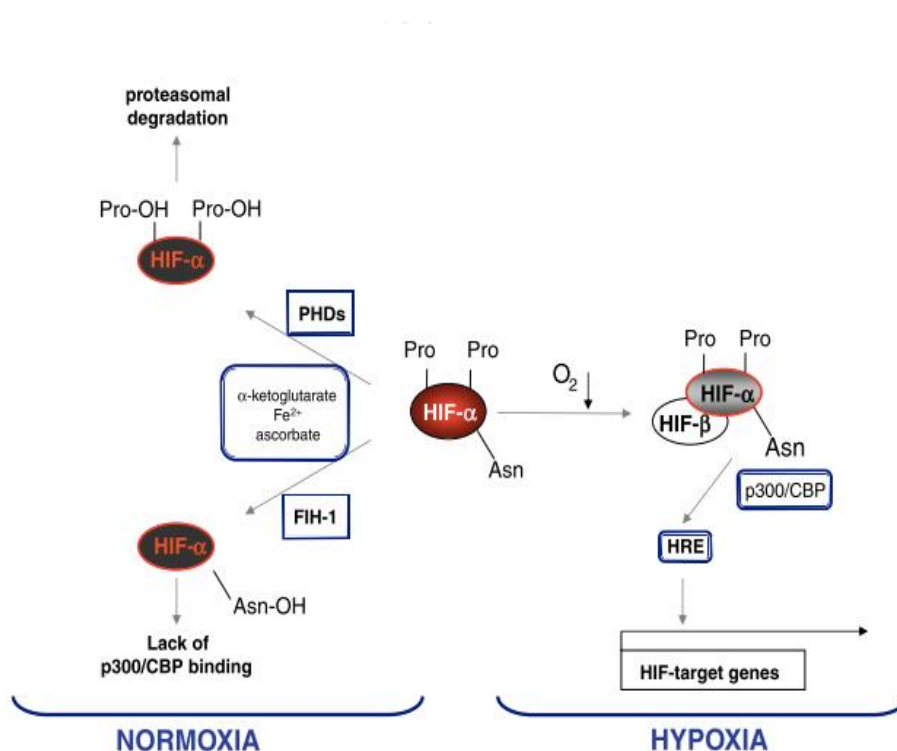
รูปที่ 2 แสดงวิธีการสังเคราะห์ miRNAs⁽³⁾

miRNA เป็น RNA สายสั้น ขนาดความยาวประมาณ 20-23 nucleotides ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยยับยั้งกระบวนการแปลรหัส (translation) หรือทำให้เกิดการย่อยทำลายสาย mRNA โดยขั้นตอนการสังเคราะห์ miRNAs ดังรูปที่ 2 เริ่มจากกระบวนการถอดรหัสยีน miRNA โดย RNA polymerase II ได้เป็น pri-miRNAs จากนั้น pri-miRNAs จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ Drosha เป็น pre-miRNAs และออกนอกนิวเคลียสเข้าสู่ไซโตพลาสซึม โดยผ่านทางโปรตีน Exportin5 เมื่อ pre-miRNAs อยู่ในไซโตพลาสซึมจะถูกเอนไซม์ Dicer ตัดให้สั้นลง เป็น miRNA duplex และแยกออกเป็นสายเดี่ยวเรียกว่า mature miRNA จากนั้น RISC complex จะเข้ามาจับกับ mature miRNA เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีน โดย miRNA จับกับ mRNA แบบไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการการแปลรหัส (translation) หรือ miRNA จับกับ mRNAs เป้าหมายโดยลำดับเบสของ miRNA จะจับแบบสมบูรณ์กับ mRNA เกิดเป็น RNA สายคู่ส่งผลให้เกิดการสลายของสาย mRNA⁽³⁾ นอกจากนี้ mature miRNA สามารถหลั่งออกนอกเซลล์เข้าไปในระบบหมุนเวียนโลหิตเพื่อควบคุมการทำงานของร่างกาย ได้โดยหุ้มด้วย vesicle เป็น microvesicles (MV) หรือจับกับโปรตีน ทำให้ miRNA สามารถป้องกันการย่อยสลาย โดยเอนไซม์ ribonuclease^(4, 15-17)

ในทางการแพทย์มีการใช้ miRNA ใช้เป็น biomarker ในการตรวจหาโรค อาทิ หัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (acute myocardial infarction)⁽¹⁵⁾ ในการคัดกรองมะเร็งต่อมลูกหมาก⁽¹⁸⁾ นอกจากนี้ในทางนิติวิทยาศาสตร์สามารถแยกสารคัดหลั่งของร่างกายโดยอาศัย miRNA profiling เพื่อบอกที่มาชนิดของสารคัดหลั่งในร่างกายได้⁽¹⁹⁾

2.5 miRNA ที่เกี่ยวข้องกับ acute hypoxia

2.5.1 Pathway of hypoxia



รูปที่ 3 แสดงการควบคุมการทำงานของ HIF α ในภาวะ normoxia and hypoxia⁽²⁰⁾

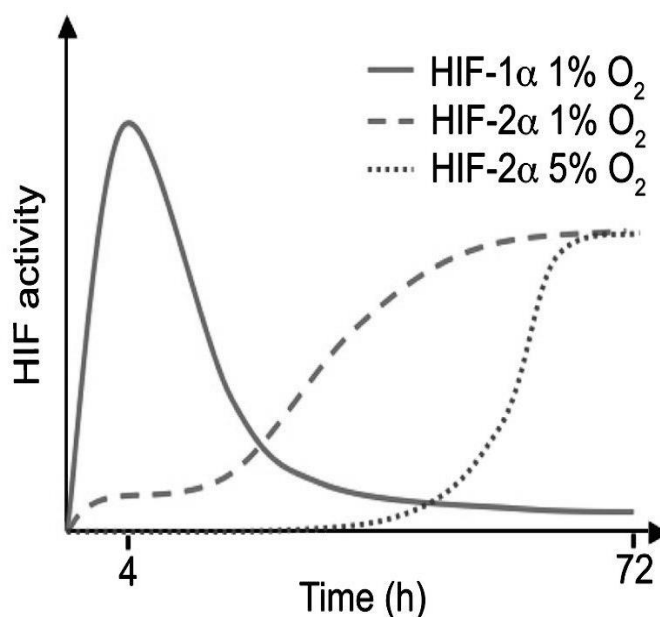
การตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะขาดออกซิเจนจะควบคุมโดย Hypoxia-inducible-factor (HIF) โดย HIF จะประกอบด้วย 2 subunit คือ HIF α และ HIF β จับกันเป็น heterodimer โดยในภาวะที่เซลล์มีออกซิเจนเพียงพอ HIF α จะถูกทำลายโดยผ่านเอนไซม์ Prolyl hydroxylases (PHDs) และ Factor inhibiting HIF (FIH-1) โดยจะป้องกันไม่ให้ cofactor อาทิ p300 หรือ cyclic AMP response element-binding protein (CBP) มาจับกับ HIF α ส่งผลยับยั้งไม่ให้เกิดการถอดรหัสของ

ยีน แต่ในภาวะที่เซลล์ขาดออกซิเจน HIF α และ HIF β จะมาจับกันเป็น heterodimer จะกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของเซลล์ในภาวะที่ขาดออกซิเจน⁽²⁰⁾ ดังรูปที่ 3

ในการศึกษาของ Kulshresht และคณะ⁽²¹⁾ ในปี 2007 พบว่าในภาวะ hypoxia จะมี HIF α เป็น transcription factor หลักในการกระตุ้น miRNA ให้เซลล์มีการตอบสนองต่อภาวะขาดออกซิเจน จะเห็นว่า HIF α เป็นเสมือน sensor ตอบสนองต่อระดับออกซิเจนในเซลล์

HIF α ประกอบด้วย HIF-1 α , HIF-2 α และ HIF-3 α โดยหน้าที่ของ HIF-1 α เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเซลล์ในภาวะ Acute hypoxia และ HIF-2 α จะตอบสนองต่อภาวะ Hypoxia เมื่อมีการขาดออกซิเจนเป็นระยะเวลานาน ส่วน HIF-3 α จะควบคุม HIF α แบบย้อนกลับ (Negative-feedback) ในกรณีที่ HIF α มีการแสดงออกที่มากเกินไป⁽⁵⁾

จากการศึกษาของ Holmquist-Mengelbier⁽⁵⁾ และคณะ ในปี 2006 ได้ทำการเลี้ยงเซลล์ neuroblastoma ให้อยู่ในภาวะ hypoxia โดยดู activity ของ HIF-1 α และ HIF-2 α ที่มีปริมาณออกซิเจน 1% พบว่า activity ของ HIF-1 α สูงขึ้นในชั่วโมงแรกๆ และเริ่มมีปริมาณลดลงหลังจากผ่านไป 4 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4 ในขณะที่ HIF-2 α จะมี activity ที่สูงขึ้นหลังจากมีการขาดออกซิเจนเป็นเวลานานหลายชั่วโมง ซึ่งจะเห็นว่า HIF-1 α จะตอบสนองต่อภาวะ acute hypoxia ขณะที่ HIF-2 α จะตอบสนองต่อภาวะ chronic hypoxia มากกว่า



รูปที่ 4 แสดง activity โปรตีน HIF-1 α และ HIF-2 α ในภาวะ hypoxia⁽⁵⁾

จากการศึกษาของ Holmquist-Mengelbier และคณะ⁽⁵⁾ ในช่วงต้นผู้วิจัยจึงเลือก miR-155 miR-210 และ miR-373 เนื่องจาก miRNA ดังกล่าวจะถูกกระตุ้นการแสดงออกผ่านทาง HIF-1 α นอกจากนี้ยังพบ miR-155 miR-210 และ miR-373 สามารถตรวจพบได้ในกระแสเลือด^(22, 23)

2.5.2 miRNA ที่เกี่ยวข้องกับ hypoxia

miR-424 เกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของ HIF-1 α โดยผ่านทาง PU.1 ซึ่งเป็น transcription factor ตัวหนึ่งที่อยู่บน endothelial cell จะถูกกระตุ้นเมื่อออกซิเจนมีระดับที่ต่ำ จากนั้นก็จะส่งผลต่อให้ miR-424 มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้น อีกทั้ง miR-424 ยังไปกระตุ้น HIF-1 α ให้มีเสถียรภาพที่เพิ่มขึ้น⁽²⁴⁾ miR-21 ในการเลี้ยงเซลล์ cardiac myocytes ของหนู rat พบว่าในภาวะเซลล์ขาดออกซิเจน miR-21 จะไปยับยั้งกระบวนการ apoptosis ผ่านทางยีน PDCD4⁽²⁵⁾ ในภาวะ hypoxia miR-199a มีการแสดงออกที่ลดลง โดยส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแสดงออกของ HIF-1 α ⁽²⁶⁾

2.5.2.1 miR-155

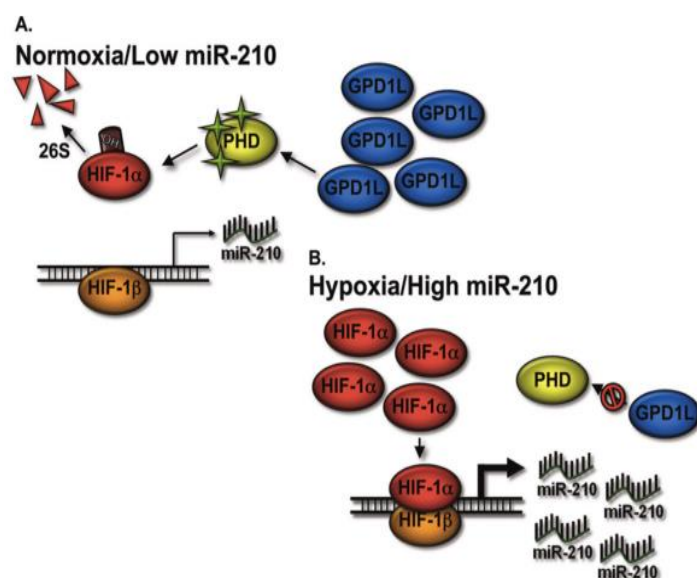
ในภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) miR-155 เกี่ยวข้องกับกระบวนการ glucose metabolism โดยจะไปกระตุ้นเอนไซม์ Hexokinase II (HK2) ส่งผลให้กระบวนการ glycolysis เพิ่มขึ้น⁽²⁷⁾ และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ angiogenesis โดยยับยั้งการแสดงออกของ ELK3⁽²⁸⁾ แต่เมื่อเซลล์มีการขาดออกซิเจนเป็นระยะเวลานาน miR-155 มีผลในการยับยั้งแบบย้อนกลับของ HIF-1 α โดยจะไปยับยั้งการแสดงออกของ HIF-1 α ให้ลดลง⁽²⁹⁾

สำหรับการวิจัยทางคลินิก ในปี 2017 การศึกษาของ Jairajpuri และคณะ⁽³⁰⁾ ดูการแสดงออกของ 84 miRNAs ในพลาสมาของกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษ เปรียบเทียบกับหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะปกติ พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ miR-155 ($p = 0.0034$) ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษ เมื่อเปรียบเทียบกับหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะปกติ และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ miRNAs ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษแบบ severe pre-eclampsia (sPE) และ mild pre-eclampsia (mPE) พบว่ามีรูปแบบการแสดงออกของ miRNAs เช่นเดียวกับกลุ่มที่เปรียบเทียบในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษ กับหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะปกติในหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษ

2.5.2.2 miR-210

miR-210 เป็น miRNA หลักในการควบคุมการตอบสนองของเซลล์ในภาวะ hypoxia โดยยับยั้งทั้งกระบวนการ cell proliferation, mitochondrial metabolism, DNA repair และกระตุ้น

angiogenesis⁽³¹⁾ นอกจากนี้ miR-210 จะมีกลไกกระตุ้น HIF-1 α แบบย้อนกลับ (Positive-feedback)⁽³²⁾ โดยในภาวะ hypoxia จะพบการแสดงออกของ miR-210 สูงขึ้นและ miR-210 ไปยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like (GPD1L) ที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ PHDs ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย HIF-1 α ส่งผลให้ HIF-1 α ไม่ถูกทำลายและมีเสถียรภาพจับกับ HIF-1 β เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนให้ตอบสนองต่อภาวะ hypoxia ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดง miR-210 ที่มีผลต่อระดับ HIF-1 α ⁽³²⁾

การศึกษาด้านคลินิกของ miR-210 ในปี 2012 การศึกษาของ Zhang และคณะ⁽³³⁾ ดูการแสดงออกของ miR-210 ในพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษแบบ mPE และ sPE เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นหญิงตั้งครรภ์มีสุขภาพดี พบว่า miR-210 มีการแสดงออกที่สูงในกลุ่มของหญิงในภาวะครรภ์เป็นพิษ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Biro และคณะ⁽³⁴⁾ การศึกษาของ Whitehead และคณะ⁽³⁵⁾ ใช้เลือดที่ได้จากมารดาเพื่อวินิจฉัยความเสี่ยงในการตั้งครรภ์ต่อภาวะขาดออกซิเจนแบบฉับพลัน (Acute hypoxia during labour) และเรื้อรัง (Chronic Hypoxia in FGR) โดยในภาวะที่ทารกมีขาดออกซิเจนแบบฉับพลันจะพบการแสดงออกของ miR-210 ในเลือดของมารดาครรภ์ต่อภาวะขาดออกซิเจนแบบฉับพลันขณะคลอดเมื่อเทียบกับก่อนคลอด ในปี 2016 การศึกษาของ Munaut และคณะ⁽³⁶⁾ ศึกษาการแสดงออกของ 17 miRNAs โดยใช้ serum ของหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษ เปรียบเทียบกับหญิงตั้งครรภ์มีสุขภาพดี พบว่ามีการแสดงออกของ

miR-210-3p และ miR-210-5p เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษ

2.5.2.3 miR-373

miR-373 เกี่ยวข้องกับการลดลงของ DNA repair โดยจะไปยับยั้งโปรตีน RAD23B⁽³⁷⁾ การศึกษาด้านคลินิกของ miR-373 ในปี 2013 การศึกษาของ Whitehead และคณะ⁽³⁵⁾ ใช้เลือดที่ได้จากมารดาเพื่อวินิจฉัยความเสี่ยงในการตั้งครรภ์ต่อภาวะขาดออกซิเจนแบบฉับพลัน (Acute hypoxia during labour) และเรื้อรัง (Chronic Hypoxia in FGR) โดยในภาวะที่ทารกมีขาดออกซิเจนแบบฉับพลันจะพบการแสดงออกของ miR-373 ลดลงในเลือดของมารดาครรภ์ต่อภาวะขาดออกซิเจนแบบฉับพลันขณะคลอดเมื่อเทียบกับก่อนคลอด รายละเอียดการศึกษาทางคลินิกของ miR-155, miR-210 และ miR-373 ได้สรุปไว้ในดังแสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 การวินิจฉัยทางคลินิกของ miR-155 miR-210 และ miR-373 ที่เกี่ยวข้องกับ Acute hypoxia

miRNAs	Expression	Specimens	Patients	Methods	Normalizer	References
miR-210	Up-regulate	Plasma	Mild pre-eclampsia Severe pre-eclampsia	Real-time qPCR	U6	(33)
miR-210	Up-regulate	Whole blood	Acute hypoxia during labour	Real-time qPCR	RUN-48 RUN-6b	(35)
miR-373	Down-regulate					
miR-210-3p miR-210-5p	Up-regulate	Serum	Pre-eclampsia	Real-time qPCR	RUN6 cel-miR-39	(36)
miR-155 miR-210	Up-regulate	Plasma	Severe pre-eclampsia	Microarray	cel-miR-39	(30)
miR-210	Up-regulate	Plasma	Severe pre-eclampsia	Real-time qPCR	UniSp6	(34)

2.5.6 Endogenous control ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของ miRNA

ในการวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบการแสดงของ miRNA โดยใช้เทคนิค real-time PCR การเลือก endogenous control ที่ดีจะทำให้การวิเคราะห์ผลการวิจัยถูกต้องมากขึ้น endogenous control ที่นิยมนำมาใช้ อาทิ U6 เป็น Small-nucleolar RNA (snRNA) พบการแสดงออกของ U6 คงที่ และไม่มีความสัมพันธ์กับโรคทางคลินิกจึงทำให้ U6 เหมาะที่จะนำมาใช้เป็น endogenous control⁽³⁸⁾ แต่ U6 ไม่เหมาะที่จะเป็น endogenous control ในตัวอย่างเลือด เนื่องจาก U6 เป็น snRNA เมื่อออกมานอกเซลล์จะไม่เสถียรและถูกทำลายด้วย RNase^(39, 40) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ มีการใช้ miRNA เป็น endogenous control ในการวิจัยในตัวอย่างเลือด เนื่องจาก miRNA หุ้มด้วย vesicle ทำให้ miRNA สามารถป้องกันการย่อยสลายโดยเอนไซม์ ribonuclease^(4, 15-17) miRNA ที่นิยมนำมาเป็น endogenous control อาทิ miR-24 miR-126 และ miR-484 มีความเสถียรใน serum⁽⁴¹⁾ miR-16 และ miR-93 เหมาะเป็น endogenous control ในมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ⁽⁴²⁾ miR-191 เหมาะที่จะนำมาใช้เป็น endogenous control ใน serum ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม⁽⁴³⁾ แต่ miR-16 และ miR-93 ไม่เหมาะที่จะเป็น endogenous control เพราะไม่ทนต่อ RNase เช่นเดียวกับ U6⁽³⁹⁾ miR-24 และ miR-484 ไม่เหมาะจะเป็น endogenous control ในงานวิจัยนี้ เนื่องจาก miR-24 และ miR-484 เกี่ยวข้องกับกระบวนการ hypoxia^(44, 45)

งานวิจัยนี้จึงเลือก miR-126 และ miR-191 เพื่อคัดเลือกเป็น endogenous control ที่เหมาะสมในการดูการแสดงออกของ miRNA ในเลือดของผู้เสียชีวิตจากการขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลันต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research Design)

การวิจัยแบบ Analytical cohort study

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

3.2.1 การหาขนาดตัวอย่างที่เหมาะสม

เนื่องจากยังไม่มียานวิจัยใดที่นำ miR-155 miR-210 และ miR-373 มาใช้เป็น biomarker ในตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตมาก่อน ผู้วิจัยจึงได้ทำวิจัยนำร่อง (Pilot study) โดยใช้ตัวอย่างในกลุ่ม acute hypoxia และ control กลุ่มละ 10 ตัวอย่าง เพื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) เพื่อใช้ในการหาขนาดประชากร ดังสูตรต่อไปนี้

$$n = \frac{\left(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta} \right)^2 (\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{\Delta^2}$$

n = ขนาดตัวอย่างที่ต้องการ

α = type I error ผู้วิจัยกำหนดระดับนัยสำคัญ 0.05
(ดังนั้นค่า $Z_{\frac{\alpha}{2}}$ จากการเปิดตาราง two-tailed=1.96)

β = type II error ผู้วิจัยกำหนดความคลาดเคลื่อน 5 % หรือ $\beta = 0.2$
(ดังนั้น Power = 1- β = 80%) ค่า Z_{β} จากการเปิดตาราง = 0.84)

Δ = $\mu_2 - \mu_1$ (ค่าเฉลี่ยของความแตกต่างระหว่างกลุ่ม)

σ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

3.2.2 กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของ miR-155 miR-210 และ miR-373 ในผู้เสียชีวิตจาก acute hypoxia

กลุ่มที่ 1 Acute hypoxia

เกณฑ์คัดเข้า

- ผู้เสียชีวิตทันที สาเหตุจากการแขวนคอ ไม่พบการกู้ชีพ
- รายงานผลการผ่าชันสูตรพลิกศพยืนยันสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดอากาศ
- มีใบยินยอมจากผู้แทนโดยชอบธรรม
- เสียชีวิตไม่เกิน 12 ชั่วโมง
- อายุ 18-40 ปี

เกณฑ์คัดออก

- เสียชีวิตจากสาเหตุอื่น
- มีประวัติโรค ถุงลมโป่งพอง (COPD) หอบหืด (Asthma) หรือมะเร็งเต้านม

เก็บตัวอย่างเลือดจาก Peripheral blood ในหลอดเก็บเลือด EDTA ฝาสีม่วงขนาด 2.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และเก็บสมองส่วน cerebellum เพื่อใช้ในการย้อมด้วย H&E และดูพยาธิสภาพของเซลล์ Purkinje

กลุ่มที่ 2 Control

เข้าถึงอาสาสมัครโดยการติดต่อส่วนตัวกับพนักงานภาควิชานิติเวชศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่เข้ารับการรักษาสุขภาพประจำปี

เกณฑ์คัดเข้า

- อายุระหว่าง 18-40 ปี

เกณฑ์คัดออก

- มีประวัติโรค ถุงลมโป่งพอง (COPD) หอบหืด (Asthma) หรือมะเร็งเต้านม จากเวชระเบียน

เก็บตัวอย่างเลือดจาก Peripheral blood ในหลอดเก็บเลือด EDTA ฝาสีม่วงขนาด 2.5 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. Centrifuge
2. Automatic Pipette
3. GeneAmp PCR System 9700
4. Laminar Flow Hood
5. 7500 Real-time PCR system
6. NanoDrop ยี่ห้อ Thermo scientific 2000

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. miRNeasy Serum/Plasma (50)
2. TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit, 200 rxn
3. TaqMan® MicroRNA Assays, inventoried, small scale miRNA marker
 - miR-155-5p
 - miR-210-5p
 - miR-373-5p
- Endogenous control
 - mir-191-5p
 - mir-126-3p

รายละเอียดของ miRNA marker และ endogenous control ดังแสดง

ในตารางที่ 2

4. TaqMan® Universal PCR Master mix II with UNG, 1x5ml

ตารางที่ 2 รายละเอียดของ miRNA marker และ endogenous control ที่ใช้ในงานวิจัย

miRNA	Mature miRNA sequence (5' → 3')	miRBase*	Assay-ID**
hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUGAAUCGUGAUAGGGGU	MIMAT0000646	2623
hsa-miR-210-5p	AGCCCCUGCCCACCGCACACUG	MIMAT0026475	467276_mat
hsa-miR-373-5p	ACUCAAAAUGGGGGCGCUUCC	MIMAT0000725	562
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	MIMAT0000445	2228
hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	MIMAT0000440	2299

*miRBase: mirBase accession number.

**Assay-ID: TaqMan MiRNA Assays ID.

3.3.3 การขอความยินยอมในการเก็บตัวอย่าง

ทุกกลุ่มตัวอย่างจะมีการอธิบายวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการวิจัย สิทธิในการยกเลิกในการเข้าร่วมโครงการ และการเก็บข้อมูลส่วนตัวในกลุ่มผู้เสียชีวิต และกลุ่มคนปกติคณะผู้วิจัยจะเก็บไว้เป็นความลับ โดยการเก็บตัวอย่างในผู้เสียชีวิตจะขอความยินยอมการใช้ตัวอย่างจากผู้แทนโดยชอบธรรม มีเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมของอาสาสมัคร และเอกสารแสดงยินยอมการใช้ศพเพื่อการศึกษา และการเก็บตัวอย่างในคนปกติจะขอความยินยอมการใช้ตัวอย่างจากอาสาสมัคร มีเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมของอาสาสมัคร และมีเอกสารชี้แจงคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย โดยงานวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมจากจริยธรรมการวิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IRB No. 614/59)

3.3.4 การเตรียมตัวอย่างเลือด (Sample preparation)

เก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำต้นขา (Femoral vein) ในหลอดเก็บเลือด EDTA ฝาสีม่วงขนาด 2.5 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำการวิเคราะห์

3.3.5 ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่าง (miRNeasy Serum/Plasma Protocol)

การสกัด miRNA จากตัวอย่างโดยใช้ชุดสกัด miRNeasy Serum/Plasma ตามเกณฑ์วิธี ดังนี้

1. นำเลือดมาปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติม QIAzol Lysis ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร
3. Vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

4. เติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
5. Vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วปั่นด้วยเครื่อง centrifuge 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
6. ดูดส่วนใส หรือ upper phase ใสในหลอดใหม่ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร
7. เติม 100% ethanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน
8. ดูดสารละลายในข้อ 7 ปริมาตร 700 ไมโครลิตรลงใน miniElute spin column ขนาด 2 มิลลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge โดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ดูดสารกลับ column แล้ว centrifuge เหมือนเดิมอีกครั้ง
9. เติม RWT buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
10. ดูดของเหลวออก
11. เติม RPE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
12. ดูดของเหลวออก
13. เติม 80% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
14. เปลี่ยน collection tube ขนาด 2 มิลลิตร
15. เปิดฝา tube แล้วปั่นด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้ความเร็วสูงสุด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
16. เปลี่ยน collection tube ขนาด 1.5 มิลลิตร
17. เติม RNase-free water ปริมาตร 15 ไมโครลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้ความเร็วสูงสุด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
18. ตรวจสอบปริมาณของ miRNA โดยการวัดการดูดกลืนแสงโดยเครื่อง NanoDrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
19. เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 ถึง -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

3.3.6 ขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA (Reverse Transcription) (TaqMan Small RNA Assays Protocol)

การสังเคราะห์ Single-stranded cDNA จาก Total RNA samples โดย TagMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการดังนี้

1. ผสม RT master mix ใน polypropylene tube ดังแสดงตารางที่ 3
2. ละลาย RT Primer tubes แล้ว spin down ทำการใส่ RT master mix ปริมาตร 12.0 ไมโครลิตร ที่มี total RNA ลงใน polypropylene reaction tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
3. ถ่าย RT primer ปริมาตร 3 ไมโครลิตร จากแต่ละ Assay ลงใน RT reaction tube ปิดฝา และ spin down
4. ตั้ง reaction volume ไปที่ 15.0 ไมโครลิตร
5. นำ reaction tube บรรจุลงใน Thermal cycler เริ่มการ reverse-transcription โดยใช้ condition ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 การเตรียม reverse transcription master mix

Component	1X (μl)
100 mM dNTPs (with dTTP)	0.15
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μl	1.00
10X Reverse Transcription Buffer	1.50
RNase Inhibitor, 20 U/μl	0.19
Nuclease-free water	7.16
5X RT primer	3
RNA sample (10 ng/μl)	2
Total volume	15

ตารางที่ 4 Condition ในการตั้งค่า RT-PCR

Step	Time (min)	Temperature (°C)
Hold	30	16
Hold	30	42
Hold	5	85
Hold	∞	4

3.3.7 การวัดปริมาณ cDNA (Real-time PCR)

1. ทำการผสม PCR reaction mix ดังแสดงในตารางที่ 5
2. ปิเปิด PCR reaction mix ใส่ในหลุมบน MicroAmp® Optical 96 well Reaction plate
3. ปิด plate โดยใช้ Optical Adhesive Cover จากนั้น Spin down เพื่อไล่ฟองอากาศ
4. บรรจุ plate เข้าสู่เครื่อง Real-time PCR
5. ตั้งค่า condition ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 การเตรียม Real-Time PCR reaction mix

Component	1X(μl)
TagMan® Small RNA Assay (20X)	1.00
Product from RT reaction	1.33
Tagman® Universal PCR Master Mix II (2X), no UNG	10.00
Nuclease-free water	7.67
Total volume	20.00

ตารางที่ 6 Condition ในการตั้งค่า Real-time PCR

Step	Optional AmpErase® UNG activity	Enzyme Activation	PCR	
	HOLD	HOLD	CYCLE (40 cycles)	
			Denature	Anneal/extend
Temperature	50°C	95°C	95°C	60°C
Time	2 min	10 min	15 secs	60 secs

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบการแสดงออกของ marker โดยใช้เทคนิค $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method⁽⁴⁶⁾ วิเคราะห์ผลโดย Mann-Whitney Test ในโปรแกรม SPSS statistics 22

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ลักษณะตัวอย่างของกลุ่ม Acute hypoxia และ กลุ่ม Control

ตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ของกลุ่ม acute hypoxia และ กลุ่ม control แสดงรายละเอียดไว้ใน ตารางที่ 7 โดยค่าเฉลี่ยของอายุทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 7 แสดงลักษณะของตัวอย่างของกลุ่ม acute hypoxia และ กลุ่ม control

Characteristics	Acute hypoxia (n=10)	Control group (n=10)
อายุ (Mean(S.D.))	25.5 (5.681)	26.6 (2.914)
เพศ		
ชาย (%)	8 (80%)	5 (50%)
หญิง (%)	2 (20%)	5 (50%)
Post-mortem interval (PMI)		
น้อยกว่า 2 ชั่วโมง	1	
2-4 ชั่วโมง	3	
4-6 ชั่วโมง	1	
6-8 ชั่วโมง	2	
8-12 ชั่วโมง	3	

รายละเอียดการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้เสียชีวิตในกลุ่ม acute hypoxia และผลจากการย้อม H&E ของสมองส่วน cerebellum เพื่อดูพยาธิสภาพของเซลล์ Purkinje แสดงรายละเอียดไว้ใน ตารางที่ 8 พบว่าปริมาณของเซลล์ Purkinje ทั้ง 10 ตัวอย่างมีความหนาแน่นระหว่าง 7 ถึง 14 เซลล์ต่อ 1 mm^3 ซึ่งถือว่าปริมาณของเซลล์ Purkinje เป็นปริมาณปกติในผู้เสียชีวิตจากการขาดออกซิเจน⁽⁴⁷⁾

ตารางที่ 8 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตในกลุ่ม acute hypoxia และปริมาณของเซลล์ Purkinje

Sample	อายุ (ปี)	เพศ	PMI	ปริมาณของเซลล์ Purkinje (cells/1 mm ³)*	เก็บเลือดทันทีในที่เกิดเหตุ
H1	20	ชาย	2-4 ชั่วโมง	11	
H2	25	หญิง	8-12 ชั่วโมง	14	
H5	29	ชาย	4-6 ชั่วโมง	10	/
H6	19	ชาย	2-3 ชั่วโมง	9	/
H7	25	ชาย	0-2 ชั่วโมง	7	/
H8	33	ชาย	2-4 ชั่วโมง	7	/
H9	31	ชาย	8-12 ชั่วโมง	10	
H10	19	ชาย	6-10 ชั่วโมง	9	
H11	33	ชาย	8-12 ชั่วโมง	8	/
H12	21	หญิง	6-8 ชั่วโมง	9	/

*Purkinje-cells density measures (No. cells/1 mm³). counted in magnification 10x.

มากกว่า 7.60 cells/1 mm³ = ปริมาณของเซลล์ Purkinje ปกติในผู้เสียชีวิตจากการขาดออกซิเจน⁽⁴⁷⁾

4.2 คุณภาพและความเข้มข้นของ RNA ที่ได้จากการสกัด

ความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ในกลุ่ม acute hypoxia มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 150.0 ng/ul ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) เท่ากับ 68.477 และในกลุ่ม control ความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 77.1 ng/ul ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) เท่ากับ 28.114 ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงความเข้มข้นของ RNA ที่ได้จากการสกัดในกลุ่ม acute hypoxia และ กลุ่ม control

	A260/A280	A260/A230	RNA (ng/ul)
Acute hypoxia			
Mean (S.D)	1.83 (0.153)	0.86 (0.496)	150.0 (68.477)
Control			
Mean (S.D)	1.72 (0.090)	0.73 (0.490)	77.1 (28.114)

4.3 การเลือก Endogenous control ที่เหมาะสม

endogenous control ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ miR-191 และ miR-126 ค่าเฉลี่ยของ $2^{-Ct \text{ miR-191}}$ ในกลุ่ม acute hypoxia และ กลุ่ม control เท่ากับ 5.9×10^{-6} และ 3.2×10^{-6} ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยของ $2^{-Ct \text{ miR-126}}$ ในกลุ่ม acute hypoxia และ กลุ่ม control เท่ากับ 6.2×10^{-6} และ 3.2×10^{-6} ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ endogenous control ทั้งสอง พบว่า miR-191 มีการแสดงออกในกลุ่ม acute hypoxia 1.82 เท่า ($p = 0.07$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และ miR-126 มีการแสดงออกในกลุ่ม acute hypoxia 1.92 เท่า ($p = 0.03$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control จะเห็นว่าการแสดงออกของ miR-191 ในทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ miR-191 เป็น endogenous control ในการทำการวิจัยต่อไป และค่า 2^{-Ct} ของ endogenous control ทั้งสองดังแสดงในตารางที่ 10 และเนื่องจาก miR-126 มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.03$) ในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากภาวะขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงนำ miR-126 มาคัดเลือกเป็น biomarker ในงานวิจัยนี้ด้วย

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบแสดงออกของ endogenous control miR-191 และ miR-126 ในกลุ่ม acute hypoxia และ control

Endogenous control	Means*	S.D.	p value**
miR-191			0.07
Acute hypoxia	5.9×10^{-6}	4.037×10^{-6}	
Control	3.2×10^{-6}	1.967×10^{-6}	
miR-126			0.03
Acute hypoxia	6.2×10^{-6}	6.609×10^{-6}	
Control	3.2×10^{-6}	4.163×10^{-6}	

* 2^{-C_t} endogenous control

** Mann-Whitney Test

4.4 การหาขนาดตัวอย่างที่เหมาะสม

ผลการคำนวณขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมของ miR-126, miR-155 และ miR-210 เท่ากับ 1808, 3 และ 1273 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11 สำหรับ miR-373 ไม่สามารถคำนวณหาขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมได้ เนื่องจาก miR-373 พบการแสดงออกที่น้อยมากทั้งกลุ่ม acute hypoxia และกลุ่ม control จึงได้ตัด miR-373 ออกจากการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ตารางที่ 11 สรุปการแสดงออกของ miR-155 และ miR-210 ของกลุ่ม acute hypoxia กลุ่ม control และขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมของแต่ละ miRNA marker

	miR-126	miR-155	miR-210
Acute hypoxia			
Mean*	0.3153	6.4431	11.3339
S.D.	0.86607	0.617774	0.525635
Control			
Mean*	0.3827	7.6259	11.2794
S.D.	0.54534	0.278574	0.453792
Sample size	1808	3	1273

* $\Delta C_t = C_{t \text{ miRNA marker}} - C_{t \text{ miR-191}}$

4.5 การแสดงออกของ miRNA marker

การแสดงออกของ miR-155 โดยใช้เทคนิค real-time qPCR ในกลุ่ม acute hypoxia และกลุ่ม control โดยใช้ miR-191 เป็น endogenous control พบว่าค่า ΔC_t ของ miR-155 เท่ากับ 6.44 ± 0.62 และ 7.63 ± 0.23 ในกลุ่ม acute hypoxia และกลุ่ม control ตามลำดับ miR-155 มีการแสดงออกในกลุ่ม acute hypoxia มากกว่ากลุ่ม control อยู่ 2.27 เท่า และพบว่ามี การแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$) ระหว่างกลุ่ม acute hypoxia และกลุ่ม control สรุปดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 6 ไม่สามารถวิเคราะห์ผลการแสดงออกของ miR-126, miR-210 และ miR-373 ได้เนื่องจาก miR-126 และ miR-210 มีข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่าง ขณะที่ miR-373 มีค่า C_t (cycle threshold) มากกว่า 35 cycle ทั้งในกลุ่ม acute hypoxia และกลุ่ม control จึงไม่ได้นำมาวิเคราะห์ผลการแสดงออก

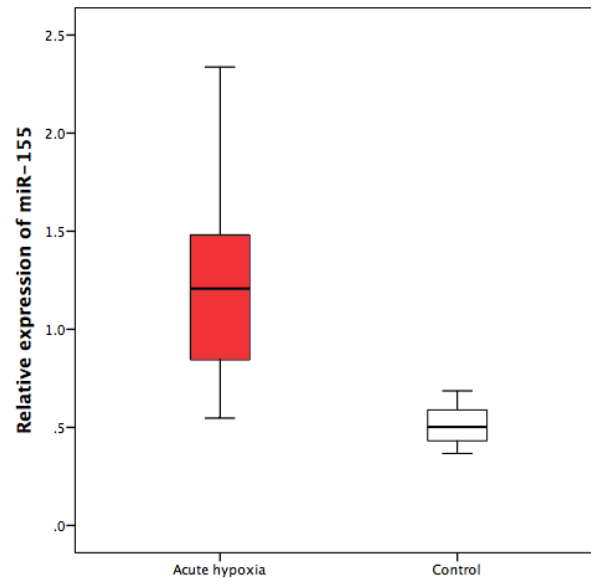
ตารางที่ 12 การแสดงออกของ miR-155 ในกลุ่ม acute hypoxia และกลุ่ม control

miRNA	ΔC_t^a		FC ^b	P ^c
	Acute hypoxia	Control		
miR-155	6.44 ± 0.62	7.63 ± 0.23	2.27	0.001

^a $\Delta C_t = C_{t \text{ miRNA marker}} - C_{t \text{ miR-191}}$, (presented as mean \pm SD).

^b FC: fold change, determined by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ test}} - \Delta C_{t \text{ control}}$).

^c Mann-Whitney test



รูปที่ 6 การแสดงออกของ miR-155 ระหว่างกลุ่ม acute hypoxia และ กลุ่ม control



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

miRNA ในเลือดเป็น biomarker ที่สำคัญในการวินิจฉัยการด้านการแพทย์ รวมถึงการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน ในการวิจัยนี้ดูการแสดงออกของ miR-155 miR-210 และ miR-373 ในเลือดของผู้เสียชีวิตจากการขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคนปกติที่มีสุขภาพดี โดยใช้เทคนิค real-time PCR โดยเก็บตัวอย่างเลือดในหลอด EDTA แต่คุณภาพของ RNA ที่ได้จากการสกัดไม่ดีนัก โดยค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของ A260/A230 ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกการปนเปื้อนของ reagent ที่จะมีผลในการยับยั้งกระบวนการ reverse transcription ในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน และกลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.86 และ 0.73 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 1.8 ทั้ง 2 กลุ่ม ผู้วิจัยคาดว่าเนื่องด้วยชุดสกัด miRNeasy Serum/Plasma ในน้ำยา QIAzol Lysis และ buffer RWT มีส่วนประกอบของ guanidine thiocyanate ซึ่งดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 230 นาโนเมตร ทำให้อัตราส่วนของ A260/A230 ต่ำกว่า 1.8 เพื่อคุณภาพที่ดีของ RNA อาจจะเลือกใช้ชุดสกัด RNA อื่นที่ไม่มีส่วนประกอบของ guanidine thiocyanate และเนื่องด้วยการเก็บตัวอย่างเลือดในรูปแบบ whole blood ในหลอด EDTA ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานก่อนการนำมาวิเคราะห์ผล อาจทำให้ RNA ถูกทำลายไปบางส่วนจึงส่งผลให้ purity ของ RNA ที่สกัดได้ไม่ดีนัก เพื่อคุณภาพที่ดีของ RNA ควรเก็บตัวอย่างเลือดในรูปแบบของ plasma หรือ serum และสกัด RNA ทันที

การดูการแสดงออกของ miRNA โดยใช้เทคนิค real-time PCR การเลือก endogenous control ที่เหมาะสมแต่ละชนิดของตัวอย่างที่ศึกษาทำให้การวิเคราะห์ผลถูกต้องมากขึ้น ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้คัดเลือก endogenous control ที่เหมาะสมในตัวอย่างเลือดของผู้เสียชีวิตจากการขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน คือ miR-126 และ miR-191 พบว่าการแสดงออกของ miR-191 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.07$) miR-191 จึงเหมาะที่จะเป็น endogenous control เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hu และคณะ miR-191 เหมาะที่จะนำมาใช้เป็น endogenous control ในตัวอย่าง serum ของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม⁽⁴³⁾ ขณะที่ miR-126 มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.03$) ในกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน จึงทำให้ miR-126 ไม่เหมาะที่จะเป็น endogenous control ในงานวิจัยนี้ และเนื่องจาก miR-126 พบว่ามี

การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.03$) จึงได้นำ miR-126 มาคัดเลือกเป็น miRNA marker ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

ในภาวะ hypoxia miR-155 เกี่ยวข้องกับเพิ่มกระบวนการ glucose metabolism⁽²⁷⁾ และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ angiogenesis⁽²⁸⁾ สำหรับการวินิจฉัยทางคลินิกในหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษ miR-155 ลดการแสดงออกของ Vascular endothelial growth factor (VEGF) ผ่าน Cysteine-rich protein 61 (CYR61) ส่งผลทำให้กระบวนการ angiogenesis ลดลง^(30, 48, 49) สำหรับภาวะขาดอากาศแบบเรื้อรัง (chronic hypoxia) miR-155 จะพบการแสดงออกที่ลดลงในกลุ่มคนไข้โรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้⁽⁵⁰⁾ และ miR-155 เกี่ยวข้องกับโรคหอบหืดโดยจะกระตุ้น T_H2 ให้ตอบสนองต่อสารที่ก่อภูมิแพ้⁽⁵¹⁾

miR-210 เป็น miRNA หลักในการควบคุมการทำงานของเซลล์ให้ตอบสนองต่อภาวะ hypoxia โดยจะยับยั้งทั้งกระบวนการ cell proliferation, mitochondrial metabolism, DNA repair และกระตุ้น angiogenesis⁽³¹⁾ ในทางคลินิก miR-210 พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในหญิงตั้งครรภ์ที่มีภาวะครรภ์เป็นพิษ^(30, 33, 49) โดย NF- κ B p50 ซึ่งเป็น transcription factor จะกระตุ้น miR-210 ให้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น⁽³³⁾ ในภาวะ chronic hypoxia พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ miR-210 ใน serum ของคนไข้มะเร็งปอดชนิด Non small cell lung cancer หรือ NSCLC⁽⁵²⁾ และใน plasma ของคนที่อยู่ในสภาพแวดล้อมบนภูเขาสูง (ระดับความสูง 3560 เมตร)⁽⁵³⁾

จากการศึกษาก่อนหน้านี้อาศัยเทคนิค Immunohistochemistry โดยใช้ MAP2⁽⁸⁾ calbindin-D28k⁽⁶⁾ และเทคนิค quantitative RT-PCR โดยดูการแสดงออก mRNA ของ SP-A1 ต่อ SP-A2⁽⁹⁾ HIF-1 และ EPO⁽¹⁰⁾ มาใช้เป็น biomarkers ในการวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน แต่เทคนิค Immunohistochemistry มีข้อจำกัดเนื่องจากมีขั้นตอนยุ่งยากในการเตรียมเนื้อเยื่อและใช้เวลานาน 5-7 วัน และ mRNA ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็น specimen ในทางนิติเวช เนื่องจากมี half-life ที่สั้น⁽¹²⁾ การศึกษาก่อนหน้านี้มีการใช้ miRNA เป็น biomarker มาใช้ช่วยวินิจฉัยสาเหตุการเสียชีวิตในทางนิติเวช จากการศึกษาของ Menathung และคณะ พบว่า miRNA มีเสถียรภาพอยู่ได้นาน 12 ชั่วโมงในเลือดหลังจากการเสียชีวิต⁽¹⁴⁾

จากผลศึกษานี้พบว่า การแสดงออกของ miR-155 ใน peripheral blood ของกลุ่มผู้เสียชีวิตจากการขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลันมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 2.27 เท่า ($p = 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control แต่ก็มีข้อจำกัดในการนำ miR-155 ไปใช้เป็น biomarker เนื่องจาก miR-155 เกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ เช่น โรคเกี่ยวกับเม็ดเลือด

(Hematopoietic disease) การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (Immune response) ปฏิกิริยาการอักเสบ (Inflammatory response) มะเร็ง (Cancers) และ โรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular diseases)^(22, 54, 55) ขณะที่ miR-126 และ miR-210 ต้องใช้ขนาดตัวอย่างมากถึง 1808 และ 1273 ตัวอย่าง จึงคาดว่า การแสดงออก miR-126 และ miR-210 ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่เหมาะที่จะใช้เป็น biomarker ในเลือดของผู้เสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน สำหรับการแสดงออกของ miR-373 จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกที่น้อยมากทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของ Quero และคณะ⁽⁵⁶⁾ โดยไม่พบการแสดงออกของ miR-373 ใน prostate cell lines ชนิด LNCaP DU145 และ PC3 ทั้งในภาวะที่เซลล์ได้รับออกซิเจนปกติและภาวะที่เซลล์ขาดออกซิเจน ผู้วิจัยคาดว่าเนื่องด้วยตัวเก็บตัวอย่างเลือดในรูปแบบ whole blood ในหลอด EDTA เป็นเวลานานหลายเดือนก่อนการนำมาวิเคราะห์ผล อาจทำให้ miRNA ถูกทำลายไปบางส่วน ส่งผลให้พบการแสดงออกของ miR-373 น้อย

miR210 และ miR-373 ไม่เหมาะที่จะเป็น biomarker ขณะที่ miR-155 สามารถใช้เป็น biomarker ช่วยวินิจฉัยหาสาเหตุการเสียชีวิตจากการขาดอากาศแบบเฉียบพลัน และมีความเสถียรในเลือดหลังการเสียชีวิตเหมาะสำหรับงานทางด้านนิติเวช แต่มีข้อควรระวังในผู้เสียชีวิตที่มีโรคประจำตัวเป็นโรคมะเร็งจากภูมิแพ้ และหอบหืดเพราะสามารถพบการแสดงออกของ miR-155 ได้ การศึกษาในอนาคตควรมีการทดสอบความไว และความจำเพาะของ miR-155 เพื่อให้ใช้งานได้จริง

รายการอ้างอิง

1. Payne-James J, Jones R, Karch SB, J. M. Simpson's Forensic Medicine 13th Edition 2011.
2. Pekka Saukko, Bernard Knight. Knight's Forensic Pathology: CRC Press Taylor & Francis Group; 2016.
3. Barca-Mayo O, Lu QR. Fine-Tuning Oligodendrocyte Development by microRNAs. *Front Neurosci.* 2012;6:13.
4. Silva SS, Lopes C, Teixeira AL, Carneiro de Sousa MJ, Medeiros R. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet.* 2015;14:1-10.
5. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell.* 2006;10(5):413-23.
6. Bartschat S, Fieguth A, Konemann J, Schmidt A, Bode-Janisch S. Indicators for acute hypoxia--an immunohistochemical investigation in cerebellar Purkinje-cells. *Forensic Sci Int.* 2012;223(1-3):165-70.
7. Mosby's Medical Dictionary 9th edition [Internet]. Elsevier. 2009. Available from: <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/acute+hypoxia>.
8. Kuhn J, Meissner C, Oehmichen M. Microtubule-associated protein 2 (MAP2)--a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia. *Acta Neuropathol.* 2005;110(6):579-86.
9. Kaori Ishida, Bao-Li Zhu, Hitoshi Maeda. A quantitative RT-PCR assay of surfactant-associated protein A1 and A2 mRNA transcripts as a diagnostic tool for acute asphyxial death. *Legal Medicine.* 2002;4:7-12.
10. Zhao D, Zhu BL, Ishikawa T, Li DR, Michiue T, Maeda H. Quantitative RT-PCR assays of hypoxia-inducible factor-1alpha, erythropoietin and vascular endothelial growth factor mRNA transcripts in the kidneys with regard to the cause of death in medicolegal autopsy. *Leg Med (Tokyo).* 2006;8(5):258-63.

11. Vennemann M, Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci Int.* 2010;203(1-3):71-5.
12. Zen K, Zhang CY. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev.* 2012;32(2):326-48.
13. Benson EA, Skaar TC. Incubation of whole blood at room temperature does not alter the plasma concentrations of microRNA-16 and -223. *Drug Metab Dispos.* 2013;41(10):1778-81.
14. Menathung P, Saengkaeotrakul P, Rasmeepaisarn K, Vongpaisarnsin K. Circulatory microRNA in acute myocardial infarction: A candidate biomarker for forensic investigation. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2017;6:e294-e5.
15. Li C, Pei F, Zhu X, Duan DD, Zeng C. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial infarction. *Clin Biochem.* 2012;45(10-11):727-32.
16. Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet.* 2007;8(2):93-103.
17. Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nature reviews Endocrinology.* 2013;9(9):513-21.
18. Sita-Lumsden A, Dart DA, Waxman J, Bevan CL. Circulating microRNAs as potential new biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(10):1925-30.
19. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):358-69.
20. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other? *Vascul Pharmacol.* 2012;56(5-6):245-51.
21. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2007;27(5):1859-67.
22. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008;141(5):672-5.
23. Corinna Eichelser, Isabel Stückrath, Volkmar Müller, Karin Milde-Langosch, Harriet Wikman, Klaus Pantel, et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. *Oncotarget.* 2014;5.

24. Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, Zhang X, Joshi HP, Basi D, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis. *J Clin Invest*. 2010;120(11):4141-54.
25. Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, et al. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res*. 2010;87(3):431-9.
26. Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, et al. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009;104(7):879-86.
27. Yao M, Wang X, Tang Y, Zhang W, Cui B, Liu Q, et al. Dicer mediating the expression of miR-143 and miR-155 regulates hexokinase II associated cellular response to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(11):L829-37.
28. Robertson ED, Wasylyk C, Ye T, Jung AC, Wasylyk B. The oncogenic MicroRNA Hsa-miR-155-5p targets the transcription factor ELK3 and links it to the hypoxia response. *PLoS One*. 2014;9(11):e113050.
29. Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, Fitzpatrick SF, Cheong A, Scholz CC, et al. MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1alpha activity during prolonged hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2011;31(19):4087-96.
30. Jairajpuri DS, Malalla ZH, Mahmood N, Almawi WY. Circulating microRNA expression as predictor of preeclampsia and its severity. *Gene*. 2017;627:543-8.
31. Chan YC, Banerjee J, Choi SY, Sen CK. miR-210: the master hypoxamir. *Microcirculation*. 2012;19(3):215-23.
32. Kelly TJ, Souza AL, Clish CB, Puigserver P. A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1alpha stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Mol Cell Biol*. 2011;31(13):2696-706.
33. Zhang Y, Fei M, Xue G, Zhou Q, Jia Y, Li L, et al. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J Cell Mol Med*. 2012;16(2):249-59.

34. Biro O, Alasztics B, Molvarec A, Joo J, Nagy B, Rigo J, Jr. Various levels of circulating exosomal total-miRNA and miR-210 hypoxamiR in different forms of pregnancy hypertension. *Pregnancy Hypertens.* 2017;10:207-12.
35. Whitehead CL, Teh WT, Walker SP, Leung C, Larmour L, Tong S. Circulating MicroRNAs in maternal blood as potential biomarkers for fetal hypoxia in-utero. *PLoS One.* 2013;8(11):e78487.
36. Munaut C, Tebache L, Blacher S, Noel A, Nisolle M, Chantraine F. Dysregulated circulating miRNAs in preeclampsia. *Biomed Rep.* 2016;5(6):686-92.
37. Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM. MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer Res.* 2009;69(3):1221-9.
38. Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br J Cancer.* 2011;104(7):1168-77.
39. Song J, Bai Z, Han W, Zhang J, Meng H, Bi J, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci.* 2012;57(4):897-904.
40. Li Y, Zhang L, Liu F, Xiang G, Jiang D, Pu X. Identification of endogenous controls for analyzing serum exosomal miRNA in patients with hepatitis B or hepatocellular carcinoma. *Dis Markers.* 2015;2015:893594.
41. Marabita F, de Candia P, Torri A, Tegner J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform.* 2016;17(2):204-12.
42. Wang L, Liu Y, Du L, Li J, Jiang X, Zheng G, et al. Identification and validation of reference genes for the detection of serum microRNAs by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in patients with bladder cancer. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):615-22.
43. Hu Z, Dong J, Wang LE, Ma H, Liu J, Zhao Y, et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis.* 2012;33(4):828-34.

44. Giuseppina Roscigno, Ilaria Puoti, Immacolata Giordano, Elvira Donnarumma, Valentina Russo, Alessandra Affinito, et al. MiR-24 induces chemotherapy resistance and hypoxic advantage in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(12):19507-21.
45. Wang K, Long B, Jiao JQ, Wang JX, Liu JP, Li Q, et al. miR-484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1. *Nat Commun*. 2012;3:781.
46. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
47. Hausmann R, Seidl S, Betz P. Hypoxic changes in Purkinje cells of the human cerebellum. *Int J Legal Med*. 2007;121(3):175-83.
48. Zhang Y, Diao Z, Su L, Sun H, Li R, Cui H, et al. MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(5):466 e1-7.
49. Harapan H, Andaras M. The role of microRNAs in the proliferation, differentiation, invasion, and apoptosis of trophoblasts during the occurrence of preeclampsia—A systematic review. *Tzu Chi Medical Journal*. 2015;27(2):54-64.
50. Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, Chinchilli VM, Craig TJ, August A, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1423-32.
51. Malmhall C, Alawieh S, Lu Y, Sjostrand M, Bossios A, Eldh M, et al. MicroRNA-155 is essential for T(H)2-mediated allergen-induced eosinophilic inflammation in the lung. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1429-38, 38 e1-7.
52. Zhu W, Zhou K, Zha Y, Chen D, He J, Ma H, et al. Diagnostic Value of Serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 Levels in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153046.
53. Yan Y, Wang C, Zhou W, Shi Y, Guo P, Liu Y, et al. Elevation of Circulating miR-210-3p in High-Altitude Hypoxic Environment. *Front Physiol*. 2016;7:84.
54. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(6):497-505.
55. Marton S, Garcia MR, Robello C, Persson H, Trajtenberg F, Pritsch O, et al. Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia*. 2008;22(2):330-8.

56. Quero L, Dubois L, Lieuwes NG, Hennequin C, Lambin P. miR-210 as a marker of chronic hypoxia, but not a therapeutic target in prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2011;101(1):203-8.



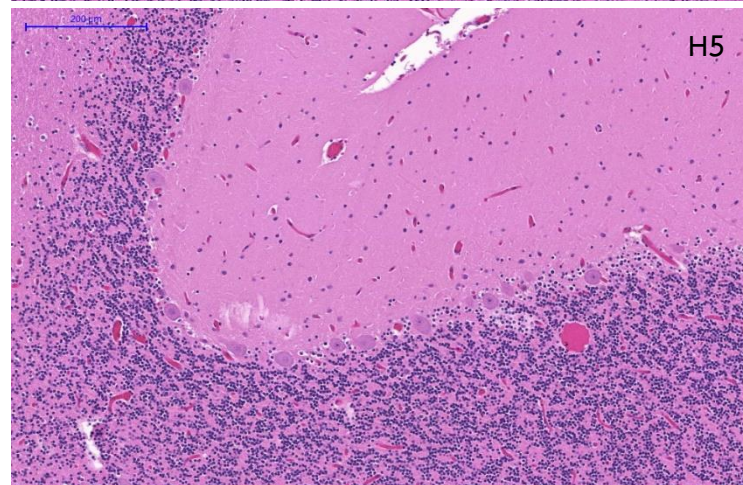
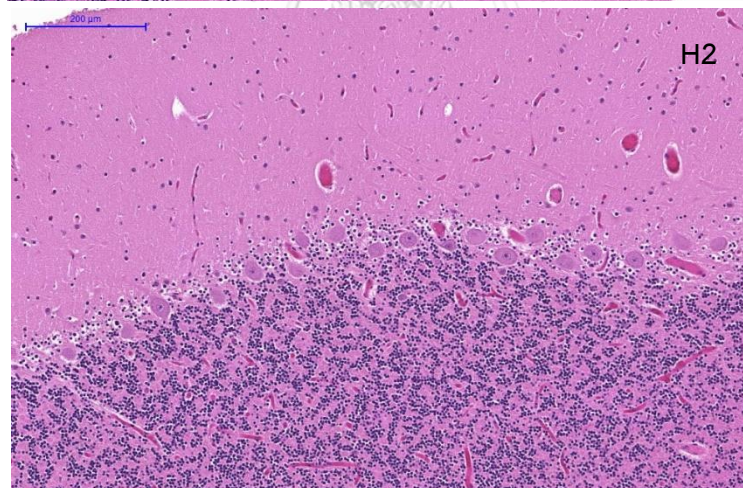
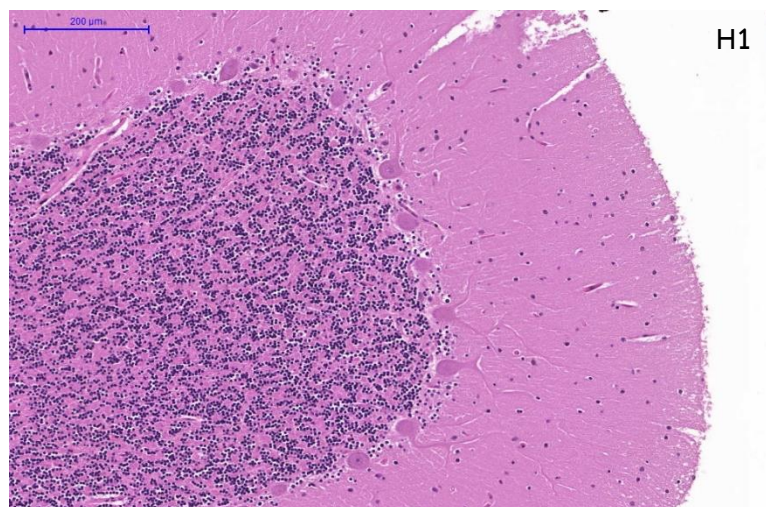


ภาคผนวก

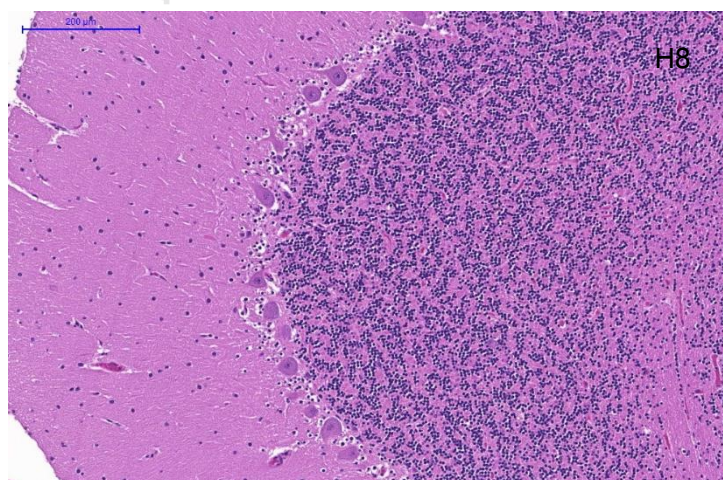
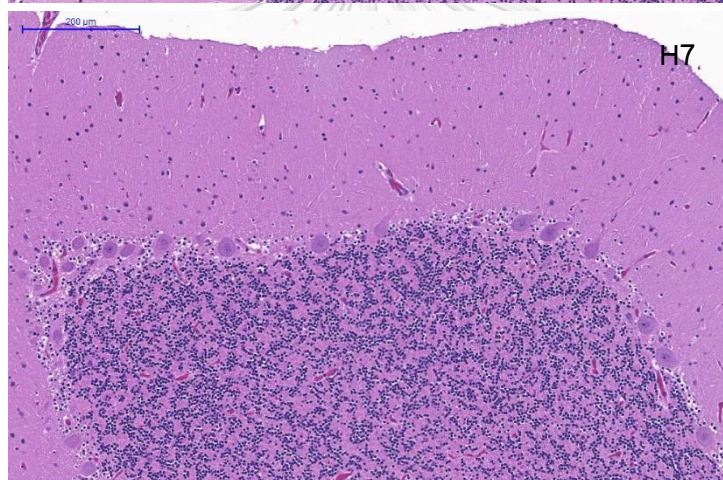
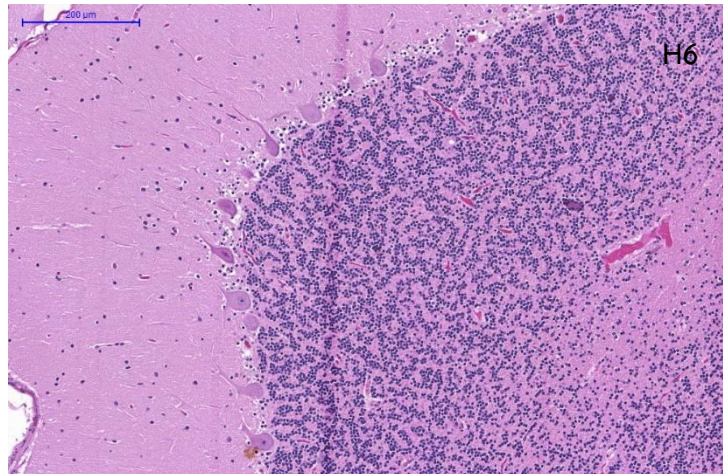
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

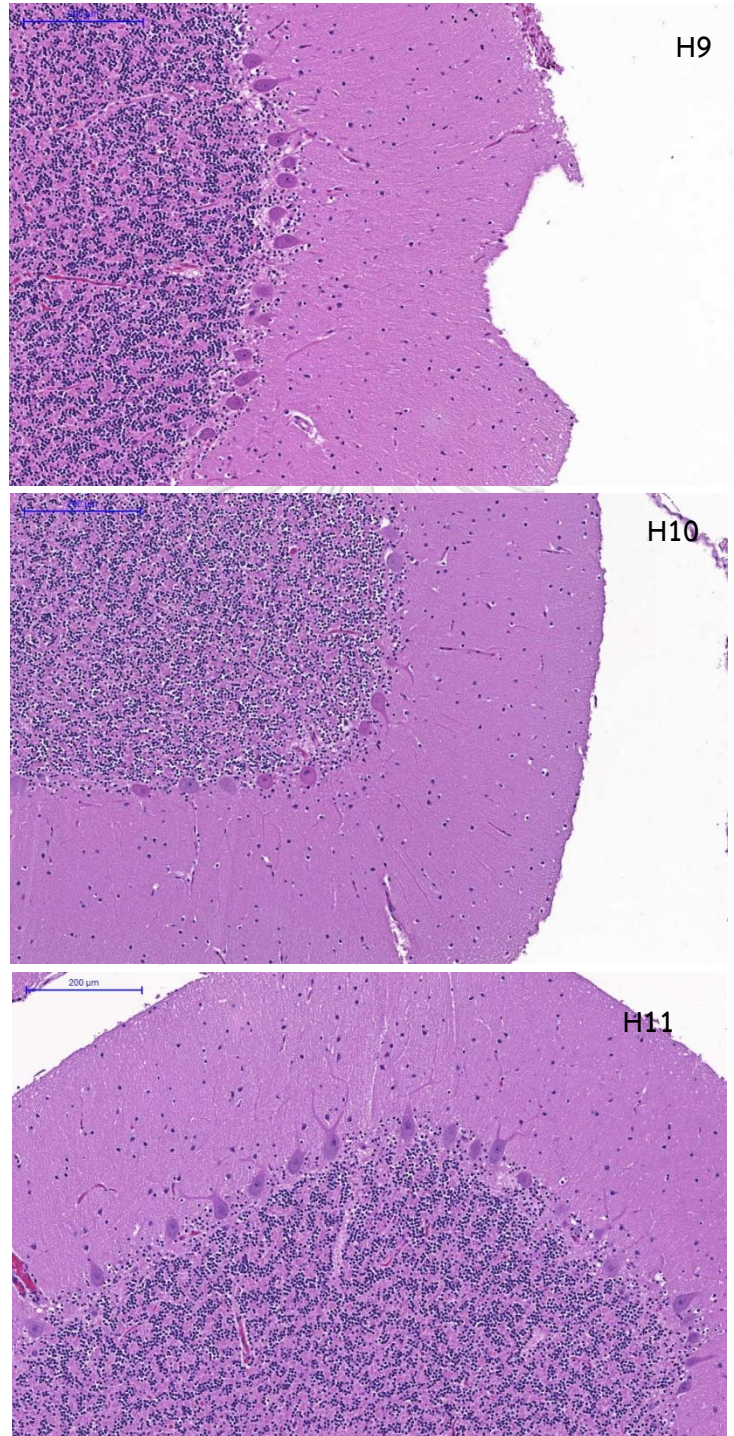
พยาธิสภาพของเซลล์ Purkinje ในเนื้อเยื่อ cerebellum ย้อมด้วย H&E ในกลุ่ม acute hypoxia (*magnification 10x)



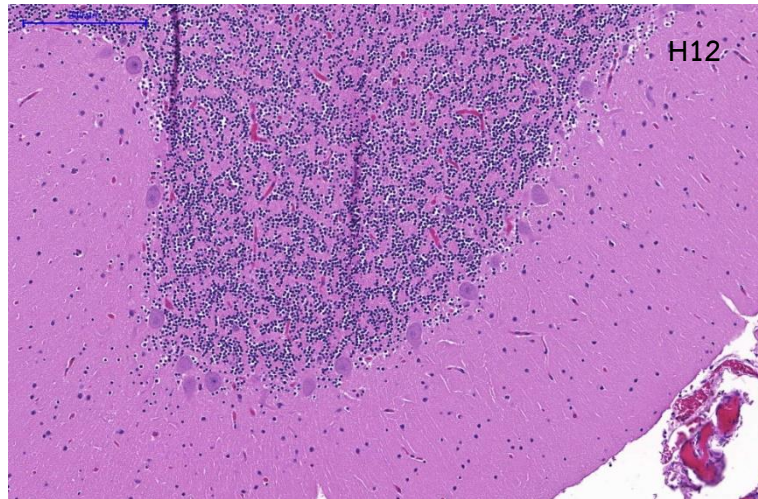
พยาธิสภาพของเซลล์ Purkinje ในเนื้อเยื่อ cerebellum ย้อมด้วย H&E ในกลุ่ม acute hypoxia (*magnification 10x) ต่อ



พยาธิสภาพของเซลล์ Purkinje ในเนื้อเยื่อ cerebellum ย้อมด้วย H&E ในกลุ่ม acute hypoxia (*magnification 10x) ต่อ



พยาธิสภาพของเซลล์ Purkinje ในเนื้อเยื่อ cerebellum ย้อมด้วย H&E ในกลุ่ม acute hypoxia (*magnification 10x) ต่อ



ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 แสดงค่าที่ได้ที่จากเครื่อง NanoDrop ในการสกัด RNA ในกลุ่ม acute hypoxia และกลุ่ม control

<i>Sample</i>	<i>A260/A280</i>	<i>A260/A230</i>	<i>RNA (ng/μl)</i>
<i>H1</i>	1.63	0.25	117.4
<i>H2</i>	1.97	1.55	236.8
<i>H5</i>	1.57	0.66	65.03
<i>H6</i>	1.85	0.34	133.4
<i>H7</i>	1.67	0.57	87.73
<i>H8</i>	1.91	1.11	115.56
<i>H9</i>	1.94	1.31	279.16
<i>H10</i>	1.89	1.07	104.8
<i>H11</i>	1.96	0.27	164.3
<i>H12</i>	1.97	1.42	196
<i>C1</i>	1.64	0.42	63.5
<i>C2</i>	1.78	1.29	72.3
<i>C3</i>	1.65	1.05	54.23
<i>C4</i>	1.68	0.68	70.6
<i>C5</i>	1.95	1.68	144.26
<i>C6</i>	1.7	0.38	71.43
<i>C7</i>	1.73	0.22	63.33
<i>C8</i>	1.72	0.5	59.46
<i>C9</i>	1.68	0.88	109.9
<i>C10</i>	1.67	0.19	62.23

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ real-time PCR ของ miR-126

Sample	Ct* 1	Ct* 2	Ct* 3	Avg Ct*	2^{-Ct} miR-126
H1	18.218	18.189	18.354	18.25367	3.19888×10^{-6}
H2	15.286	15.194	15.774	15.418	2.28412×10^{-5}
H5	19.025	18.694	18.692	18.80367	2.1849×10^{-6}
H6	17.826	17.813	17.768	17.80233	4.37587×10^{-6}
H7	17.967	18.166	17.889	18.00733	3.79623×10^{-6}
H8	17.324	17.694	17.608	17.542	5.24001×10^{-6}
H9	17.884	17.825	18.171	17.96	3.92194×10^{-6}
H10	16.307	16.434	16.238	16.32633	1.21726×10^{-5}
H11	17.905	17.958	17.891	17.918	4.0378×10^{-6}
H12	21.911	21.893	22.041	21.94833	2.46998×10^{-7}
C1	18.303	18.561	18.646	18.50333	2.6918×10^{-6}
C2	15.761	16.071	16.301	16.04433	1.48004×10^{-5}
C3	18.16	18.415	18.591	18.38867	2.91313×10^{-6}
C4	18.445	18.509	18.188	18.38067	2.93136×10^{-6}
C5	19.897	20.572	19.586	20.01833	9.4185×10^{-7}
C6	19.468	19.585	19.771	19.608	1.25142×10^{-6}
C7	20.041	20.381	20.261	20.22767	8.14264×10^{-7}
C8	18.438	18.351	18.461	18.41667	2.85713×10^{-6}
C9	19.713	20.172	20.231	20.03867	9.28239×10^{-7}
C10	18.654	19	18.867	18.84033	2.13106×10^{-6}

* C_t = cycle threshold

** Avg Ct = average C_t

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ real-time PCR ของ miR-191

Sample	Ct* 1	Ct* 2	Ct* 3	Avg Ct*	2^{-Ct} miR-191
H1	18.236	17.852	18.041	18.043	3.70268×10^{-6}
H2	16.248	15.991	16.094	16.111	1.41288×10^{-5}
H5	19.161	18.733	18.978	18.95733	1.96505×10^{-6}
H6	17.354	17.755	18.211	17.77333	4.46472×10^{-6}
H7	18.351	17.606	17.391	17.78267	4.43388×10^{-6}
H8	17.991	16.524	17.253	17.256	6.3889×10^{-6}
H9	17.739	18.077	18.155	17.99033	3.84123×10^{-6}
H10	16.443	16.438	16.528	16.46967	1.10163×10^{-5}
H11	16.903	16.871	17.164	16.97933	7.74126×10^{-6}
H12	19.525	19.476	19.399	19.46667	1.3799×10^{-6}
C1	18.033	18.005	18.222	18.08667	3.59146×10^{-6}
C2	17	16.899	16.977	16.95867	7.85477×10^{-6}
C3	17.849	18.092	18.143	18.028	3.74137×10^{-6}
C4	17.698	18.006	18.125	17.943	3.96843×10^{-6}
C5	18.668	18.632	19.262	18.854	2.11048×10^{-6}
C6	19.571	19.621	19.596	19.596	1.26187×10^{-6}
C7	19.909	19.799	19.492	19.73333	1.14676×10^{-6}
C8	18.007	17.781	18.121	17.96967	3.89485×10^{-6}
C9	19.325	19.317	19.066	19.236	1.61952×10^{-6}
C10	18.157	18.283	18.258	18.23267	3.24579×10^{-6}

*C_t = cycle threshold

** Avg Ct = average C_t

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ real-time PCR ของ miR-155 โดยใช้ miR-191 เป็น endogenous control

Sample	Ct* 1	Ct* 2	Ct* 3	Avg Ct**	ΔCt^{***}	$\Delta\Delta Ct^{****}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
H1	24.176	24.123	24.173	24.15733	6.114333	-1.5116	2.851261
H2	23.229	22.768	23	22.999	6.888	-0.73793	1.667785
H5	24.373	24.389	24.367	24.37633	5.419	-2.20693	4.616928
H6	23.958	23.788	23.807	23.851	6.077667	-1.54827	2.924655
H7	24.25	24.151	24.367	24.256	6.473333	-1.1526	2.223142
H8	24.667	24.468	25.177	24.77067	7.514667	-0.11127	1.080176
H9	23.782	24.253	24.768	24.26767	6.277333	-1.3486	2.546649
H10	23.523	23.508	23.375	23.46867	6.999	-0.62693	1.544279
H11	23.804	23.765	23.777	23.782	6.802667	-0.82327	1.769408
H12	25.198	25.703	25.101	25.334	5.867333	-1.7586	3.383696
C1	25.473	25.724	26.064	25.75367	7.667	0.041067	0.971936
C2	24.724	24.472	24.502	24.566	7.607333	-0.0186	1.012976
C3	25.528	25.664	25.956	25.716	7.688	0.062067	0.957891
C4	26.009	26.048	26.044	26.03367	8.090667	0.464733	0.724605
C5	26.318	26.165	26.486	26.323	7.469	-0.15693	1.114915
C6	26.715	26.794	26.84	26.783	7.187	-0.43893	1.355602
C7	27.027	27.14	27.118	27.095	7.361667	-0.26427	1.201025
C8	25.625	25.798	26.057	25.82667	7.857	0.231067	0.852005
C9	26.526	26.36	27.047	26.64433	7.408333	-0.2176	1.162798
C10	26.129	26.063	26.276	26.156	7.923333	0.2974	0.813718
Control Average				7.625933			

* C_t = cycle threshold

** Avg C_t = average C_t

*** $\Delta C_t = C_{t \text{ sample}} - C_{t \text{ miR-191}}$

**** $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ test}} - \Delta C_{t \text{ control average}}$

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ real-time PCR ของ miR-210 โดยใช้ miR-191 เป็น endogenous control

Sample	Ct* 1	Ct* 2	Ct* 3	Avg Ct**	ΔC_t ***	$\Delta\Delta C_t$ ****	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
H1	30.04	29.742	30.066	29.94933	11.90633	0.6267	0.647656
H2	28	28.126	27.917	28.01433	11.90333	0.6237	0.649004
H5	29.841	29.651	29.669	29.72033	10.763	-0.51663	1.430613
H6	28.414	28.935	28.949	28.766	10.99267	-0.28697	1.220072
H7	28.576	28.435	28.688	28.56633	10.78367	-0.49597	1.410265
H8	28.309	28.624	28.773	28.56867	11.31267	0.033033	0.977363
H9	28.597	28.641	28.436	28.558	10.56767	-0.71197	1.638036
H10	28.403	28.562	28.635	28.53333	12.06367	0.784033	0.580741
H11	28.514	28.465	28.663	28.54733	11.568	0.288367	0.818829
H12	30.627	30.721	30.962	30.77	11.30333	0.0237	0.983707
C1	29.875	29.917	29.956	29.916	11.82933	0.5497	0.683162
C2	28.06	28.304	28.413	28.259	11.30033	0.0207	0.985754
C3	29.276	29.266	29.096	29.21267	11.18467	-0.09497	1.068041
C4	29.136	29.378	29.521	29.345	11.402	0.122367	0.918679
C5	30.612	30.788	30.624	30.67467	11.82067	0.541033	0.687278
C6	30.74	30.94	30.586	30.75533	11.15933	-0.1203	1.086961
C7	30.243	30.308	30.302	30.28433	10.551	-0.72863	1.657069
C8	29.463	29.439	29.494	29.46533	11.49567	0.216033	0.860929
C9	29.725	29.675	29.869	29.75633	10.52033	-0.7593	1.692669
C10	29.66	29.915	29.722	29.76567	11.533	0.253367	0.838936
Control average				11.27963			

* C_t = cycle threshold

** Avg C_t = average C_t

*** $\Delta C_t = C_{t \text{ sample}} - C_{t \text{ miR-191}}$

**** $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ test}} - \Delta C_{t \text{ control average}}$

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ real-time PCR ของ miR-126 โดยใช้ miR-191 เป็น endogenous control

Sample	Ct* 1	Ct* 2	Ct* 3	Avg Ct**	ΔC_t^{***}	$\Delta\Delta C_t^{****}$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
H1	18.218	18.189	18.354	18.25367	0.210667	-0.1722	1.126775
H2	15.286	15.194	15.774	15.418	-0.693	-1.07587	2.107988
H5	19.025	18.694	18.692	18.80367	-0.15367	-0.53653	1.450483
H6	17.826	17.813	17.768	17.80233	0.029	-0.35387	1.277981
H7	17.967	18.166	17.889	18.00733	0.224667	-0.1582	1.115894
H8	17.324	17.694	17.608	17.542	0.286	-0.09687	1.069448
H9	17.884	17.825	18.171	17.96	-0.03033	-0.4132	1.331636
H10	16.307	16.434	16.238	16.32633	-0.14333	-0.5262	1.440131
H11	17.905	17.958	17.891	17.918	0.938667	0.5558	0.68028
H12	21.911	21.893	22.041	21.94833	2.481667	2.0988	0.233452
C1	18.303	18.561	18.646	18.50333	0.416667	0.0338	0.976844
C2	15.761	16.071	16.301	16.04433	-0.91433	-1.2972	2.457515
C3	18.16	18.415	18.591	18.38867	0.360667	-0.0222	1.015507
C4	18.445	18.509	18.188	18.38067	0.437667	0.0548	0.962728
C5	19.897	20.572	19.586	20.01833	1.164333	0.781467	0.581775
C6	19.468	19.585	19.771	19.608	0.012	-0.37087	1.293129
C7	20.041	20.381	20.261	20.22767	0.494333	0.111467	0.925647
C8	18.438	18.351	18.461	18.41667	0.447	0.064133	0.95652
C9	19.713	20.172	20.231	20.03867	0.802667	0.4198	0.747528
C10	18.654	19	18.867	18.84033	0.607667	0.2248	0.855714
Control average				0.382867			

* C_t = cycle threshold

** Avg C_t = average C_t

*** $\Delta C_t = C_{t \text{ sample}} - C_{t \text{ miR-191}}$

**** $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ test}} - \Delta C_{t \text{ control average}}$

ตารางที่ 7 แสดงข้อมูลที่ได้จากการทำ real-time PCR ของ miR-373 โดยใช้ miR-191 เป็น endogenous control

Sample	Ct* 1	Ct* 2	Ct* 3	Avg Ct**	ΔC_t^{***}
H1	34.99	34.68	37.292	35.654	17.611
H2	34.499	34.26	35.282	34.68033	18.56933
C1	37.328	36	38.511	37.27967	19.193
C2	39.578	35.139	38.487	37.73467	20.776

*C_t = cycle threshold

** Avg Ct = average C_t

*** $\Delta C_t = C_{t \text{ sample}} - C_{t \text{ miR-191}}$



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรุ่งทิพย์ มาดี

เกิดวันที่ 21 มีนาคม พ.ศ. 2534

การศึกษาวិทยาศาตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2557

