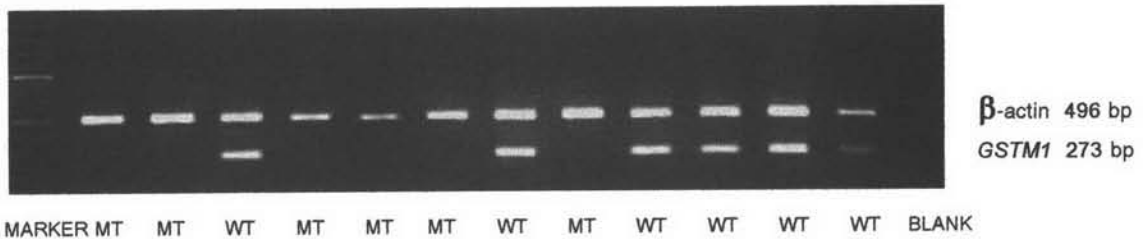


บทที่ 4

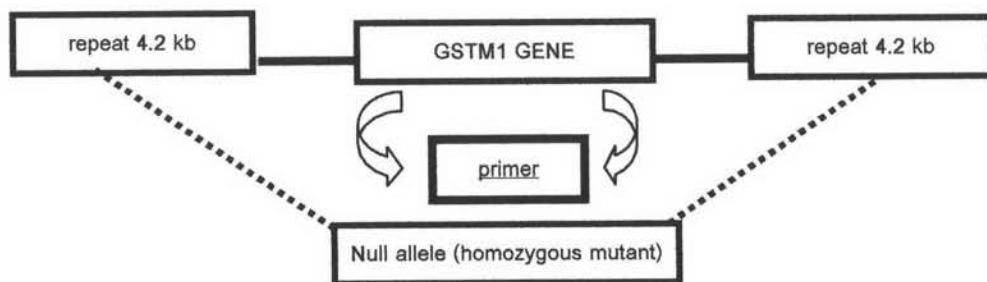
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1. การวิเคราะห์ผลของจีโนไทป์ในยีน *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma และคนปกติ จากผลของ gel electrophoresis

4.1.1. การศึกษาจีโนไทป์ในยีน *GSTM1*



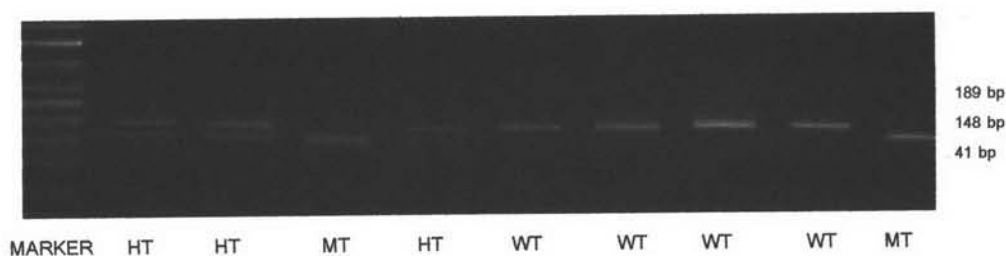
รูปที่ 8. แสดง gel electrophoresis ของยีน *GSTM1*



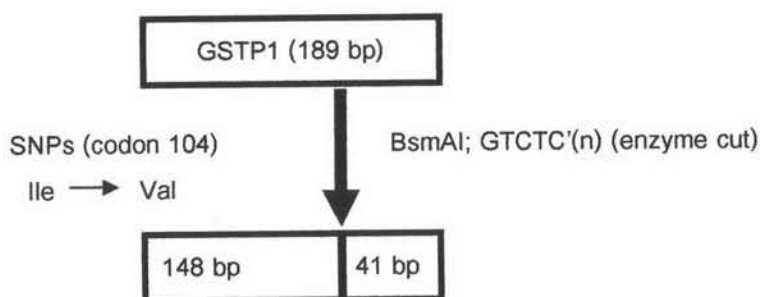
จากรูปที่ 8 เป็นการศึกษายีน *GSTM1* ในยีน *GSTM1* ทำโดยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี multiplex PCR ซึ่งยีน *GSTM1* นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นแบบการขาดหายไปของยีนทั้งยีน จึงใช้ต้อง primer 2 คู่ คือ *GSTM1* และ β -actin ทั้ง forward และ reverse primer โดยในการทดลองนี้ใช้ β -actin เป็น internal control โดยจะปรากฏ band ขึ้นที่ 496 bp และ *GSTM1* เป็นยีนที่ทำการศึกษาถ้าไม่ปรากฏ band ขึ้นที่ 273 bp ในกรณีที่ยีน *GSTM1* มีการขาดหายไปของยีน (homozygous mutant; MT) และจะปรากฏ band ขึ้นที่ 273 bp ในกรณีที่ยีน *GSTM1* ไม่ได้มีการขาดหายไปของยีน wild type (WT) หรือ heterozygous mutant (HT) โดยมี DNA marker (100 bp) เป็นตัวเทียบขนาดของยีน ซึ่งในวิธีของ multiplex PCR นั้นไม่สามารถ

แยกความแตกต่างระหว่าง wild type และ heterozygous mutant จึงต้องใช้ real time-PCR หรือ DHPLC

4.1.2. การศึกษาจีโนไทป์ในยีน *GSTP1*

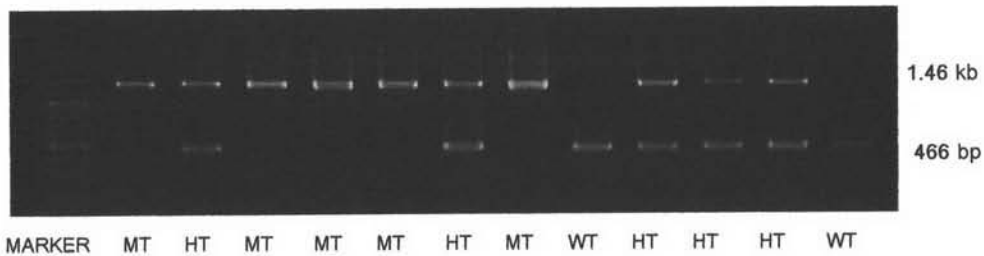


รูปที่ 9. แสดง gel electrophoresis ของยีน *GSTP1*

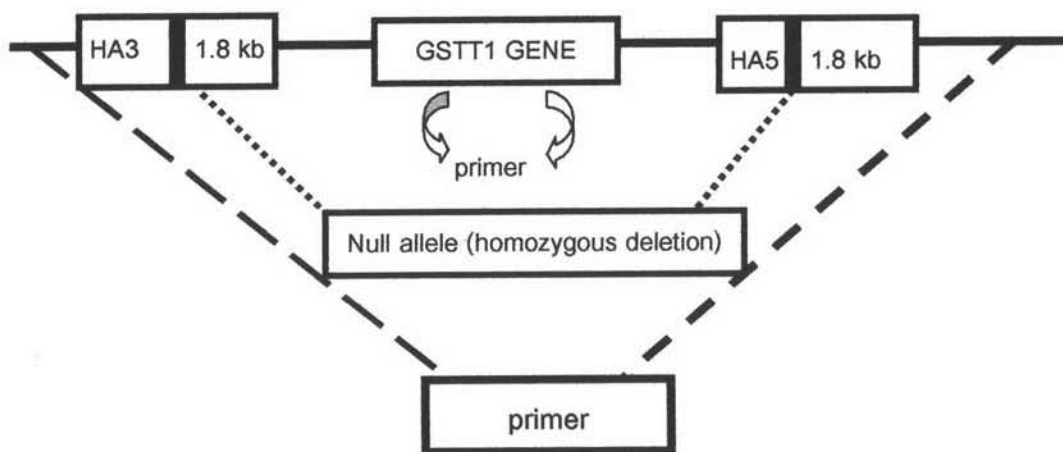


จากรูปที่ 9 เป็นการศึกษาลำดับเบสในยีน *GSTP1* ทำโดยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR-RFLP ซึ่ง *GSTP1* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นแบบการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับเบสเดี่ยว ๆ (SNPs) โดยจะเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Isoleucine เป็น valine ที่ตำแหน่ง 104 ซึ่งใช้ primer 1 คู่ คือ *GSTP1* ทั้ง forward และ reverse primer หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำการตัดจำเพาะด้วยเอนไซม์ *BsmAI* ซึ่งมีความจำเพาะกับลำดับเบส [-GTCTC (N)-] ดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของ SNPs (สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ *BsmAI* ที่ตำแหน่งของลำดับเบส -GTCTC[N]-) จะปรากฏ band ขึ้นที่ 148 กับ 41 bp (heterozygous mutant; HT) แต่ถ้าไม่เกิด SNPs จะปรากฏ band ขึ้นที่ 189 bp (wild type; WT) แต่ถ้าปรากฏ band ที่ 41 bp จะเป็นชนิด homozygous mutant; MT โดยมี DNA marker (100 bp) เป็นตัวเทียบขนาดของยีน

4.1.3. การศึกษาจีโนไทป์ในยีน *GSTT1*

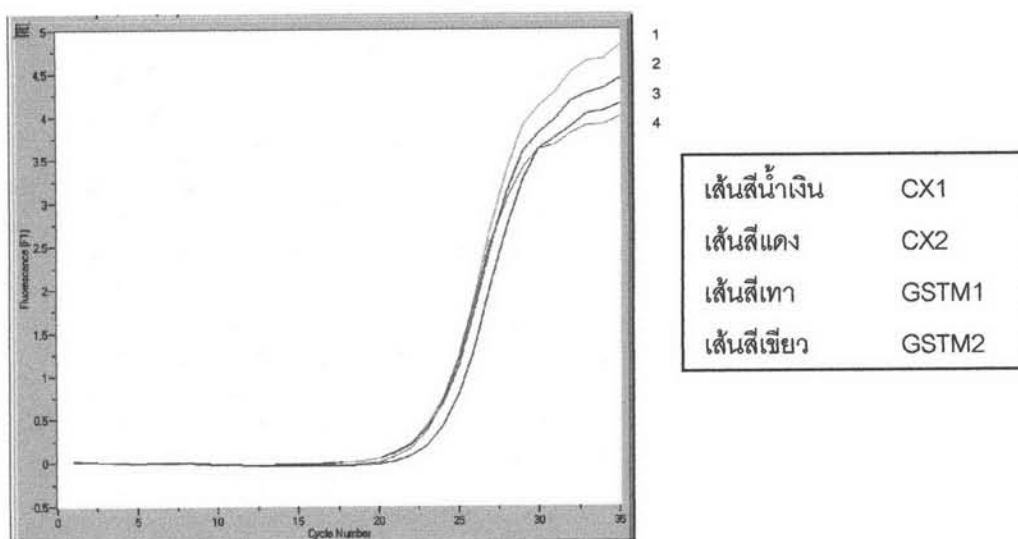


รูปที่ 10. แสดง gel electrophoresis ของยีน *GSTT1*



จากรูปที่ 10 เป็นการศึกษาด้านจีโนไทป์ในยีน *GSTT1* ทำโดยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี multiplex PCR ซึ่ง *GSTT1* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นแบบการเกิดการขาดหายไปของยีนทั้งยีน โดยใช้ primer 1 คู่ คือ *GSTT1* ทั้ง forward และ reverse primer ดังนั้นถ้ายีน *GSTT1* เกิดการขาดหายไป จะปรากฏ band ขึ้นที่ 1.46 kb (homozygous mutant; MT) แต่ถ้าไม่มีการขาดหายไปของยีนทั้งยีน จะปรากฏ band ขึ้นที่ 466 bp (wild type; WT) แต่ถ้าปรากฏ band ขึ้นที่ 1.46 kb และ 466 bp จะเป็นชนิด heterozygous mutant; HT ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ไม่ต้องใช้ internal control เนื่องจากว่าควบคุมกันเองภายใน condition และใช้ DNA marker (100 bp) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของยีน

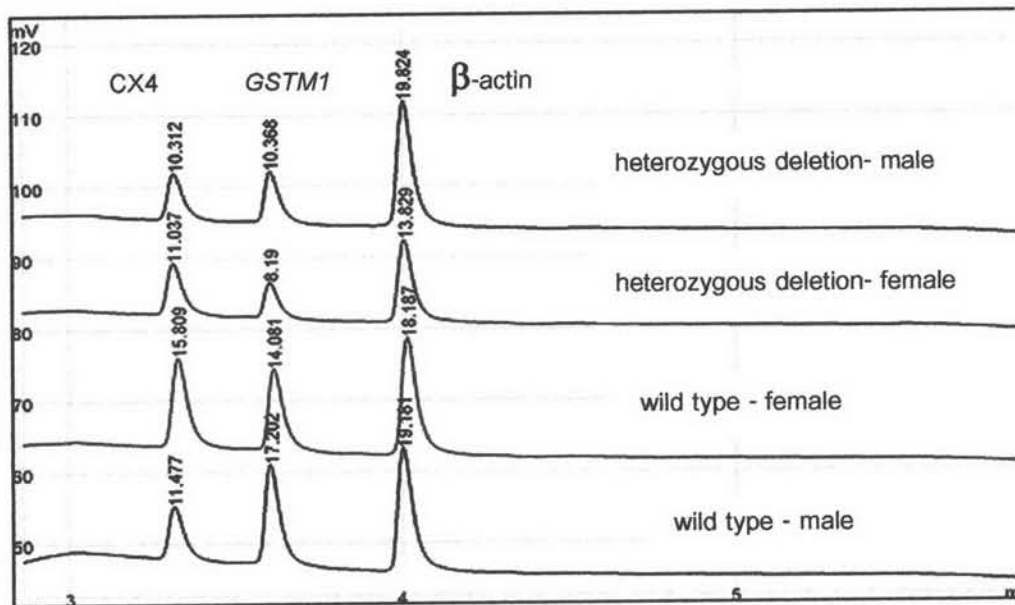
4.1.4. การวิเคราะห์ผลของ real time-PCR ในยีน *GSTM1*



รูปที่ 11. แสดงผลของ real time-PCR ในยีน *GSTM1*

จากการวิเคราะห์ผลจากเส้นกราฟของ real time-PCR นั้น พบว่ากราฟเส้นสีน้ำเงินและเส้นสีแดงเป็นยีน Connexin 26 (CX) ซึ่งเป็น internal control ขึ้นทับกันสนิท แสดงให้เห็นว่าปริมาณของ DNA ตั้งต้นเท่ากัน ส่วนเส้นสีเขียวและเส้นสีเขียวนั้นเป็นยีน *GSTM1* ซึ่งเป็นยีนที่มีการศึกษา ซึ่งพบว่าเส้นสีเขียวขึ้นก่อนเส้นสีเขียวย จึงสามารถบอกได้ว่าเส้นกราฟสีเขียวที่ขึ้นก่อนนั้นเป็น wild type และเส้นกราฟสีเขียวยที่ขึ้นหลังจะเป็น heterozygous mutant และเมื่อนำมาเข้าสู่สูตรจะพบว่าค่าที่ได้จะมีความแตกต่างกันอยู่ 0.5 คือ ชนิด wild type มีค่าเท่ากับ 1 และ heterozygous mutant มีค่าเท่ากับ 0.5

4.1.5. การวิเคราะห์ผลของ DHPLC ในยีน *GSTM1*



รูปที่ 12. แสดง DHPLC ของยีน *GSTM1*

จากรูปที่ 12 เป็นการศึกษาค่าผลของยีน *GSTM1* โดยใช้ DHPLC ในการ quantitate DNA โดยดูจากความสูงของกราฟ (peak height) โดยเส้นกราฟจะเรียงตามขนาดของยีนจากน้อยไปหามาก (จากซ้ายไปขวา) เนื่องจากยีนที่มีขนาดเล็กจะถูก elute ออกมาก่อน ซึ่งในการทดลองนี้ peak ที่ออกมาก่อน คือ CX4 (196 bp), *GSTM1* (273 bp) และ *ACTB* (496 bp) ตามลำดับ โดยที่ CX4 คือ Dystrophin gene ซึ่งเป็นโครโมโซมเพศ (sex chromosome) *GSTM1* คือ GSTs gene ชนิด Mu โดยเป็นยีนที่ทำการศึกษา และ *ACTB* คือ β -actin ซึ่งเป็นโครโมโซมร่างกาย (autosome) โดยได้กำหนดให้ เพศหญิง (XX) ที่เป็น wild type มีความสูงของ peak ในทั้ง 3 ยีน เท่ากันทุก peak แต่ถ้าในเพศหญิงที่เป็น heterozygous mutant พบว่าความสูงของ peak ในยีน *GSTM1* จะลดลงเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับความสูงของยีน *ACTB* และ CX4 ส่วนในเพศชาย (XY) ที่เป็น wild type ความสูงของ sex chromosome จะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับความสูงใน peak ของ *GSTM1* และ *ACTB* แต่ในเพศชายที่เป็น heterozygous mutant พบว่าความสูงของ peak ในยีน *ACTB* จะสูงเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับยีน CX4 และ *GSTM1* ซึ่งการใช้ DHPLC สามารถทำการเปรียบเทียบภายในคนเดียวได้ ไม่จำเป็นต้องทำให้ DNA ตั้งต้นเท่ากันในทุกหลอด ประหยัด สะดวก และรวดเร็วกว่าวิธีของ real time-PCR

4.2. การวิเคราะห์ผลของพีนโทปีโนยีน GSTs ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ

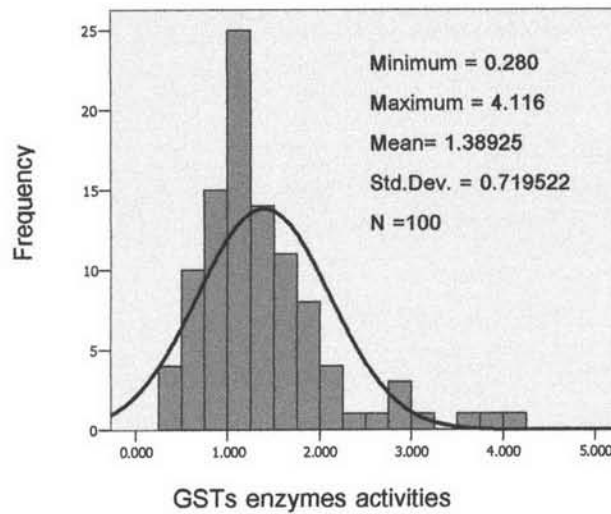
จากผลการวิเคราะห์พีนโทปีโนยีน GSTs ชนิด M1 และ P1 จากชิ้นเนื้อตับจากผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma จำนวน 100 คน (เพศชาย จำนวน 61 คน เพศหญิงจำนวน 39 คน) โดยใช้สารตั้งต้น CDNB ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน GSTs ชนิด M1 และ P1 เท่านั้น จึงนำจีโนไทป์เฉพาะ 2 ยีนนี้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน GSTs ชนิด M1 และ P1 กับผลประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (genotype-phenotype correlation) จากตารางที่ 12 พบว่าในกลุ่มประชากรที่เป็นมะเร็งตับ จะพบการกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน GSTM1 แบบ wild type คิดเป็นร้อยละ 5, heterozygous mutant คิดเป็นร้อยละ 35 และ homozygous mutant คิดเป็นร้อยละ 60 ส่วนการกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีน GSTP1 แบบ wild type คิดเป็นร้อยละ 61 heterozygous mutant คิดเป็นร้อยละ 29 และ homologous mutant คิดเป็นร้อยละ 10

ตารางที่ 12. แสดงจีโนไทป์ของยีน GSTs ชนิด M1 และ P1 ในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma

GENE	Liver cancer n= 100 subjects (%)		
	Wild type	Heterozygous	Homozygous
GSTM1	5 (5)	35 (35)	60 (60)
GSTP1	61 (61)	29 (29)	10 (10)

โดยในการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) นั้นต้องนำค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่วัดได้ มาทำการตรวจสอบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ ก่อนที่จะใช้สถิติขั้นสูงในการทดสอบค่าต่างๆ ซึ่งการตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลมักแสดงออกมาในรูปของ ฮิสโตแกรม (Histogram), แผนภาพลำต้นและใบ (Stem and Leaf), Boxplot, Normal Probability Plot และ Detrended Normal Plot โดยการตรวจสอบทั้งหมด 5 ข้อนี้เป็นการตรวจสอบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติหรือไม่ เนื่องมาจากการใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล นั้น ข้อมูลดังกล่าวต้องมีการแจกแจงแบบปกติ

Histogram of GSTs enzymes activities



รูปที่ 13. แสดงฮิสโตแกรมของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs

จากรูป 13 แขนงนอนเป็นค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs (GSTs enzymes activities) ส่วนความสูงแสดงความถี่หรือจำนวนคนที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ในแต่ละช่วง ถ้าพิจารณาจากฮิสโตแกรมจะพบว่าการแจกแจงของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs มีการแจกแจงใกล้เคียงแบบปกติ หรือค่อนข้างมีความสมมาตร คือ เบ้ขวาเล็กน้อย

ตารางที่ 13. แสดงค่าสถิติเชิงพรรณนาของตัวแปรประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs (GSTs enzymes activities)

N	Valid	100
	Missing	0
Mean		1.38925
Median		1.22300
Mode		0.951 (a)
Skewness		1.593
Std. Error of Skewness		0.24
Kurtosis		3.205
Std. Error of Kurtosis		0.478
Sum		138.925
Percentiles	25	0.93825
	50	1.22300
	75	1.61875

a Multiple modes exist. The smallest value is shown

นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาค่าสถิติจากตารางที่ 13 พบว่ามีค่าต่ำสุด (minimum) เท่ากับ 0.280, ค่าสูงสุด (maximum) เท่ากับ 4.116 และค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 1.38925 ในขณะที่ค่ากลางของข้อมูล (median) เท่ากับ 1.22300 ซึ่งถือว่าใกล้เคียงกัน ถือว่าการแจกแจงค่อนข้างสมมาตร (mean>median)

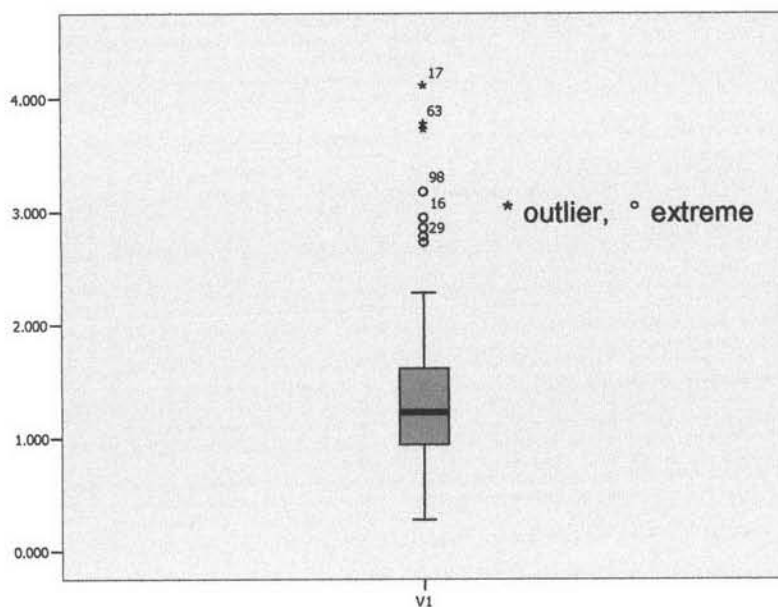
```

3.00  0. 233
3.00  0. 455
10.00 0. 666677777
13.00  0. 888889999999
17.00  1. 000000011111111
19.00  1. 2222222222333333
8.00   1. 4445555
8.00   1. 6666677
6.00   1. 999999
3.00   2. 011
2.00   2. 22
8.00 Extremes (>=2.7)

```

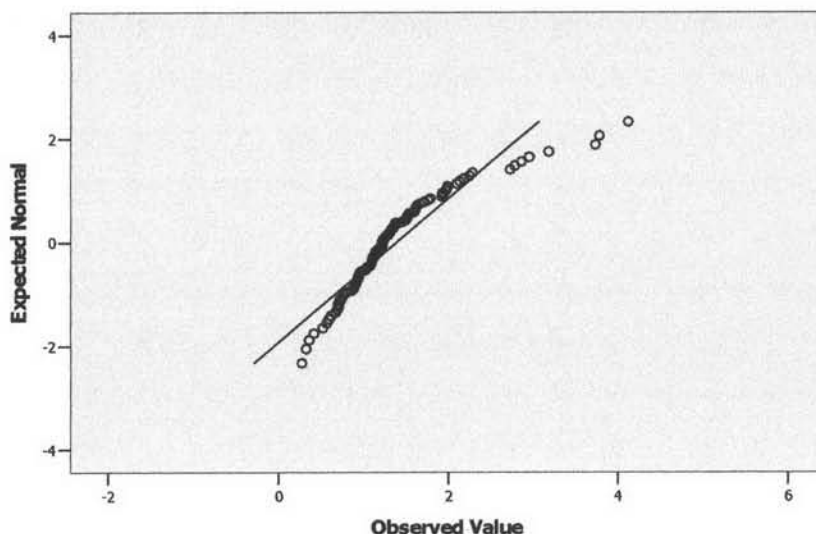
รูปที่ 14. แสดงแผนภาพลำต้นและใบ (Stem-and-Leaf Plot) ของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

จากรูป 14 จากแผนภาพลำต้นและใบจะพบว่า การแจกแจงของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะใกล้เคียงกับการแจกแจงแบบปกติ หรือค่อนข้างสมมาตรจะเบ้ขวาเล็กน้อย



รูปที่ 15. แสดง BoxPlot ของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs

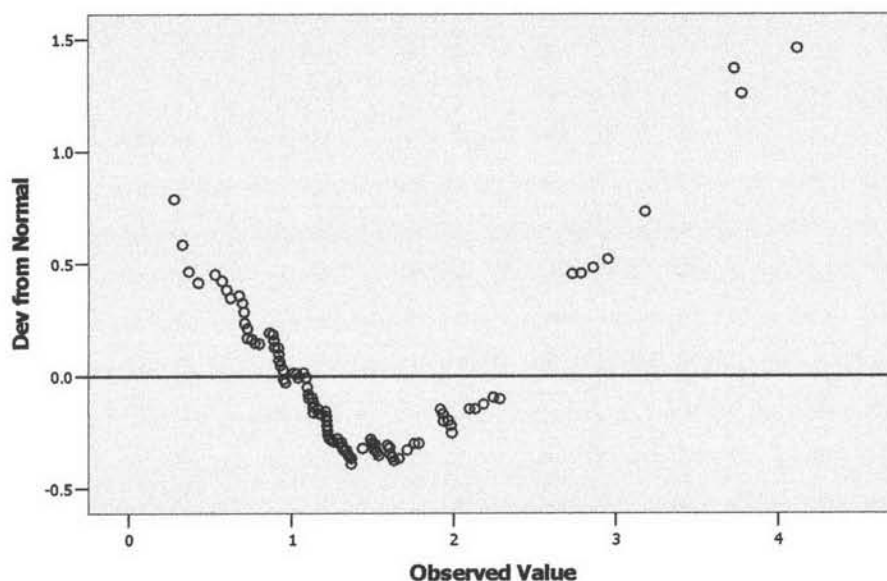
จากรูป 15 แสดงค่ามัธยฐานอยู่มาทางด้านล่างของ box แสดงว่าข้อมูลเบ้ขวา หรือ เบ้ขวา โดยความกว้างของ box มาก แสดงว่าข้อมูลมีการกระจายมาก แต่ถ้ามีค่า outlier และ extremes มาก แสดงว่าหางของการแจกแจงยาว หรือข้อมูลมีการกระจายมาก



รูปที่ 16. แสดง Normal Probability Plot ของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs

Normal Probability plot ซึ่งเป็นกราฟที่พล็อตค่าข้อมูลจริงที่เกิดขึ้นกับค่าที่คาดไว้ (expected Value) เมื่อข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ ถ้าข้อมูลตัวอย่างสุ่มมาจากกลุ่มประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติแล้ว ค่าที่คาดไว้จะเป็นเส้นตรง ดังนั้น ถ้าข้อมูลตัวอย่างมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติ ค่าจริงจะอยู่รอบ ๆ เส้นตรงอย่างสุ่ม

จากรูป 16 จะพบว่าค่าของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs ส่วนใหญ่จะอยู่รอบ ๆ เส้นตรง (เหนือหรือใต้เส้นตรง) ค่าที่อยู่เหนือเส้นตรงแสดงว่าค่าจริงมากกว่าค่าที่คาดไว้เมื่อประชากรมีการแจกแจงแบบปกติ ส่วนค่าที่อยู่ใต้เส้นตรง แสดงว่าค่าจริงน้อยกว่าค่าที่คาดไว้เมื่อประชากรมีการแจกแจงแบบปกติ แต่ข้อมูลเพียง 6 คน จาก 100 คน ที่มีค่าห่างจากค่าอื่น จึงพอสรุปได้ว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs มีการแจกแจงใกล้ หรือเป็นแบบปกติ หรือค่อนข้างสมมาตร



รูปที่ 17. แสดง Detrended Normal Plot ของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs

Detrended Normal Plot เป็นกราฟที่แสดงค่าการเบี่ยงเบนหรือค่าแตกต่างระหว่างค่าจริงกับค่าที่คาดไว้ภายใต้การแจกแจงปกติ ถ้าค่าจริงกับค่าที่คาดไว้จากการแจกแจงปกติเท่ากัน ค่าแตกต่างจะเป็นศูนย์

$$\text{ค่าเบี่ยงเบน} = \text{ค่าแตกต่าง} = \text{ค่าจริง} - \text{ค่าที่คาดไว้จากการแจกแจงปกติ}$$

จากรูป 17 เส้นตรงเป็นเส้นที่คาดว่าค่าจริงกับค่าที่คาดไว้ภายใต้การแจกแจงแบบปกติเท่ากัน ส่วนจุดแต่ละจุดแสดงค่าการแตกต่างระหว่างค่าจริงกับค่าที่คาดไว้ ถ้าจุดอยู่รอบ ๆ ทั้งเหนือเส้นและใต้เส้นและใกล้ ๆ เส้นตรงและกระจายกันโดยไม่มีรูปแบบ แสดงว่าข้อมูลนั้นมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติ ซึ่งจากรูป มีเพียง 3 จุด ที่มีค่าบวกซึ่งมีค่ามากกว่า 1 ส่วนที่เหลืออยู่ใกล้ ๆ เส้นตรง จึงพอสรุปได้ว่าการแจกแจงของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ GSTs ใกล้เคียงปกติ

ซึ่งจากการทดสอบการแจกแจงของข้อมูลทั้ง 5 ข้อ พบว่าข้อมูลมีการกระจายแบบปกติ จึงนำข้อมูลที่ได้มาใช้สถิติขั้นสูงต่อไป โดยในการวิจัยครั้งนี้ใช้ One-way ANOVA ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างมากกว่า 2 กลุ่ม (จากตารางที่ 12) โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม wild type กับ heterozygous mutant และ wild type กับ homozygous และ heterozygous mutant กับ homozygous ทั้งในยีน *GSTM1* และ *GSTP1* พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significant)

4.3. การจัด haplo-group ของยีน GSTs ชนิด M1 และ P1

การจัด haplo- group ทำโดยการนำจีโนไทป์ในยีน *GSTM1* และ *GSTP1* ของผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับจำนวน 100 คน มาจัดกลุ่ม สามารถแบ่งออกได้เป็น 9 กลุ่มย่อย ซึ่งจะพบความถี่และการกระจายของจำนวนประชากรในกลุ่มจำนวนน้อยแตกต่างกันไป โดยนำเอาค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ของประชากรในกลุ่มเดียวกันมาทำการหาค่าเฉลี่ย ซึ่งพบว่าลักษณะของจีโนไทป์ไม่ได้บ่งถึงค่าประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (ดังตารางที่ 14)

ตารางที่ 14. แสดงการจัด haplo-group ยีน GSTs ชนิด M1 และ P1 (n=100)

GENOTYPE		Enzyme activity (mean) (n mol/min/mg protein)	Number
<i>GSTM1</i>	<i>GSTP1</i>		
W	W	0.854	4
W	H	1.663	1
H	W	1.301	22
H	H	1.716	10
H	M	1.181	3
W	M	-	-
M	W	1.330	35
M	H	1.578	18
M	M	1.365	7

W =Wild type, H= Heterozygous mutant, M= Mutant

4.4. การวิเคราะห์ผลเชิงพรรณนา (Descriptive analysis)

จากผลการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ของยีน GSTs ชนิด *M1*, *P1* และ *T1* ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma (case group) จำนวน 140 คน (เพศชายจำนวน 82 คน เพศหญิงจำนวน 58 คน) เปรียบเทียบกับคนปกติ (control group) เป็นคนสุขภาพดี ไม่มีประวัติเป็นโรคมะเร็ง จำนวน 280 คน (เพศชายจำนวน 189 คน เพศหญิงจำนวน 91 คน) พบความถี่และการกระจายตัวของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma เปรียบเทียบกับคนปกติในกลุ่มประชากรไทย ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15. แสดงความถี่และการกระจายตัวของยีน *GSTM1*, *GSTP1* และ *GSTT1* ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma กับคนปกติในกลุ่มประชากรไทย

Genotype and allele frequency	Control N=280 (%)	Case N=140 (%)	Odds ratio (OR)	95% CI	p-value
<i>GSTM1</i>					
wild type (+/+)	10 (3.57)	7 (5)	1.0 (ref.)	-	-
heterozygous (+/-)	111 (39.64)	48 (34.29)	0.6178	0.2220-1.7192	0.35
homozygous (-/-)	159 (56.79)	85 (60.71)	0.7637	0.2806-2.0784	0.60
<i>GSTP1</i>					
wild type (Ile/Ile)	154 (55.00)	91 (65.00)	1.0 (ref.)	-	-
heterozygous (Ile/Val)	109 (38.93)	37 (26.43)	0.5745	0.3648-0.9046	0.016*
homozygous (Val/Val)	17 (6.07)	12 (8.57)	1.1946	0.5459-2.6141	0.66
<i>GSTT1</i>					
wild type (+/+)	100 (35.71)	52(37.14)	1.0 (ref.)	-	-
heterozygous(+/-)	101 (36.07)	55 (39.29)	1.0472	0.6550-1.6743	0.85
homozygous (-/-)	79 (28.22)	33 (23.57)	0.8033	0.4744-1.3602	0.41

OR: odd ratio; CI: confidence interval; ref.: reference category; * significant (p -value<0.05)

จากตารางที่ 15 พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน GSTs ในกลุ่มผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma หรือ cholangiocarcinoma (case group) ชนิด *GSTM1* แบบ wild type (+/+) คิดเป็นร้อยละ 5, heterozygous mutant (+/-) คิดเป็นร้อยละ 34.29 และ homozygous mutant (-/-) คิดเป็นร้อยละ 60.71 ชนิด *GSTP1* พบการเกิด wild type (+/+) คิดเป็นร้อยละ 65, heterozygous mutant (+/-) คิดเป็นร้อยละ 26.43 และ homozygous

mutant คิดเป็นร้อยละ 8.57 และชนิด *GSTT1* พบการเกิด wild type (+/+) คิดเป็นร้อยละ 37.14, heterozygous mutant (+/-) คิดเป็นร้อยละ 39.29 และ homozygous mutant คิดเป็นร้อยละ 23.57 ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ในกลุ่มคนปกติ (control group) ชนิด *GSTM1* พบการเกิด wild type (+/+) คิดเป็นร้อยละ 3.57, heterozygous mutant (+/-) คิดเป็นร้อยละ 39.64 และ homozygous mutant (-/-) คิดเป็นร้อยละ 56.79 ชนิด *GSTP1* พบการเกิด wild type (+/+) คิดเป็นร้อยละ 55, heterozygous mutant (+/-) คิดเป็นร้อยละ 38.93 และ homozygous mutant (-/-) คิดเป็นร้อยละ 6.07 และชนิด *GSTT1* เกิด wild type (+/+) คิดเป็นร้อยละ 35.71, เกิด heterozygous mutant (+/-) คิดเป็นร้อยละ 36.07 และเกิด homozygous mutant (-/-) คิดเป็นร้อยละ 28.22

แต่พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมชนิด *GSTP1* แบบ heterozygous mutant (Ile/Val) ในกลุ่มผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ (case group) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มคนปกติ (control group) คิดเป็นร้อยละ 26.43 และ 38.93 ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significant) โดยมีค่า OR เท่ากับ 0.5745 (มีผลในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับเมื่อเทียบกับคนปกติ), 95% CI (0.3648-0.9046) และค่า *p*-value เท่ากับ 0.016 ($p < 0.05$) ซึ่งมีการกระจายตัวของยีน *GSTP1* เป็นไปตามสมการของ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) และมีค่า chi-square เท่ากับ 5.79

ตารางที่ 16. แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ยีน ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma และ cholangiocarcinoma กับคนปกติในกลุ่มประชากรไทย

Double GST genotypes	Control N=280 (%)	Patients N=140 (%)	Odds ratio (OR)	95% CI	p-value
GSTM1 and GSTP1					
M1 (+/+) and P1 (Ile/Ile)	7 (2.5)	6 (4.29)	1.0 (Ref.)	-	-
M1 (+/+) and P1 (Ile/Val)	3 (1.07)	1 (0.71)	0.3889	0.0315-4.7958	0.45
M1 (+/+) and P1 (Val/Val)	-	-	-	-	-
M1 (+/-) and P1 (Ile/Ile)	61 (21.79)	32 (22.86)	0.7268	0.2271-2.3259	0.59
M1 (+/-) and P1 (Ile/Val)	44 (15.71)	14 (9.29)	0.3712	0.1069-1.2896	0.11
M1 (+/-) and P1 (Val/Val)	6 (2.14)	3 (2.14)	0.5833	0.1000-3.4024	0.55
M1 (-/-) and P1 (Ile/Ile)	86 (30.71)	53 (37.86)	0.7190	0.2293-2.2547	0.57
M1 (-/-) and P1 (Ile/Val)	62 (22.14)	23 (16.43)	0.4328	0.1316-1.4238	0.16
M1 (-/-) and P1 (Val/Val)	11 (3.93)	9 (6.43)	0.9545	0.2350-3.8780	0.95
GSTM1 and GSTT1					
M1 (+/+) and T1 (+/+)	4 (1.43)	3 (2.14)	1.0 (Ref.)	-	-
M1 (+/+) and T1 (+/-)	4 (1.43)	1 (0.71)	0.3333	0.0235-4.7362	0.41
M1 (+/+) and T1 (-/-)	2 (0.71)	3 (2.14)	2.0000	0.1940-20.6149	0.56
M1 (+/-) and T1 (+/+)	47 (16.79)	14 (10.00)	0.3972	0.0793-1.9900	0.25
M1 (+/-) and T1 (+/-)	36 (12.86)	22 (15.71)	0.8148	0.1665-3.9883	0.80
M1 (+/-) and T1 (-/-)	28 (10.00)	12 (8.57)	0.5714	0.1106-2.9536	0.50
M1 (-/-) and T1 (+/+)	49 (17.50)	35 (25.00)	0.9524	0.2004-4.5257	0.95
M1 (-/-) and T1 (+/-)	61 (21.79)	32 (22.86)	0.6995	0.1474-3.3183	0.65
M1 (-/-) and T1 (-/-)	49 (17.50)	18 (12.86)	0.4898	0.0997-2.4054	0.37
GSTT1 and GSTP1					
T1 (+/+) and P1 (Ile/Ile)	58 (20.71)	37 (26.43)	1.0 (Ref.)	-	-
T1 (+/+) and P1 (Ile/Val)	38 (13.57)	10 (7.14)	0.4125	0.1836-0.9269	0.029*
T1 (+/+) and P1 (Val/Val)	4 (1.43)	5 (3.57)	1.9595	0.4940-7.7728	0.33
T1 (+/-) and P1 (Ile/Ile)	56 (20.00)	35 (25.00)	0.9797	0.5429-1.7679	0.94
T1 (+/-) and P1 (Ile/Val)	39 (13.93)	16 (11.43)	0.6431	0.3152-1.3123	0.22
T1 (+/-) and P1 (Val/Val)	6 (2.14)	4 (2.86)	1.0450	0.2762-3.9541	0.22
T1 (-/-) and P1 (Ile/Ile)	40 (14.29)	19 (13.57)	0.7446	0.3756-1.4761	0.40
T1 (-/-) and P1 (Ile/Val)	32 (11.43)	11 (7.86)	0.5389	0.2422-1.1987	0.126
T1 (-/-) and P1 (Val/Val)	7 (2.50)	3 (2.14)	0.6718	0.1634-2.7628	0.58

OR: odd ratio; CI: confidence interval; ref.: reference category; * significant (p -value<0.05)

จากตารางที่ 16 เมื่อนำยีนมาวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ยีน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significant) ในยีน *GSTM1* กับ *GSTP1* และยีน *GSTM1* กับ *GSTT1* แต่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน *GSTT1* กับ *GSTP1* ในคู่ของยีน *GSTP1* แบบ heterozygous mutant (Ile/Val) กับยีน *GSTT1* แบบ wild type (+/+) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significant) โดยมีค่า OR เท่ากับ 0.4125, 95% CI (0.1836-0.9269) และค่า *p*-value เท่ากับ 0.029 ($p < 0.05$) ซึ่งให้ผลในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในกลุ่มประชากรไทย

ตารางที่ 17. แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 3 ยีน ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ hepatocellular carcinoma และ cholangiocarcinoma กับคนปกติในกลุ่มประชากรไทย

Triple GSTs genotypes	Control (N=280) (%)	Patients (N=140) (%)	Odds ratio (OR)	95% CI	<i>p</i> -value
M1(+/+), T1 (+/+) and P1(Ile/Ile)	51 (18.21)	38 (27.14)	1.0 (Ref.)	-	-
M1(+/+), T1 (+/+) and P1(Ile/Val or Val/Val)	43 (15.36)	12 (8.57)	0.3745	0.1742-0.8052	0.011*
M1 (-/-), T1(+/+) and P1 (Ile/Ile)	63 (22.50)	54 (38.57)	1.1504	0.6601-2.0048	0.62
M1 (-/-), T1(+/+) and P1 (Ile/Val or Val/Val)	44 (15.17)	6 (4.29)	0.183	0.0707-0.4736	0.0002*
M1 (+/+), T1 (-/-) and P1 (Ile/Ile)	20 (7.14)	13 (9.29)	0.8724	0.3862-1.9706	0.74
M1 (+/+), T1 (-/-) and P1 (Ile/Val or Val/Val)	11 (3.93)	1 (0.71)	0.1220	0.0151-0.9862	0.022*
M1 (-/-), T1 (-/-) and P1 (Ile/Ile)	20 (7.14)	8 (5.71)	0.5368	0.2137-1.3488	0.18
M1 (-/-), T1 (-/-) and P1 (Ile/Val or Val/Val)	28 (10.00)	8 (5.71)	0.3835	0.1573-0.9347	0.032*

OR: odd ratio; CI: confidence interval; ref.: reference category; * significant (p -value<0.05)

จากตารางที่ 17 เมื่อนำไปวิเคราะห์รวมกันทั้ง 3 ยีน พบว่าในกลุ่มที่ *GSTM1* และ *GSTT1* เป็น wild type (+/+) และ *GSTP1* เป็น mutant (Ile/Val หรือ Val/Val) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significant) โดยมีค่า OR เท่ากับ 0.3745, 95% CI (0.1742-0.8052) และค่า *p*-value เท่ากับ 0.011 ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มที่ *GSTM1* เป็น homozygous mutant (-/-), *GSTT1* เป็น wild type (+/+) และ *GSTP1* เป็น mutant (Ile/Val หรือ Val/Val) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significant) โดยมีค่า OR เท่ากับ 0.1830, 95% CI (0.0707-0.4736) และค่า *p*-value เท่ากับ 0.0002 ($p < 0.05$) ส่วนในกลุ่มที่ *GSTM1* เป็น wild type (+/+) , *GSTT1* เป็น homozygous mutant (-/-) และ *GSTP1* เป็น mutant (Ile/Val หรือ Val/Val) ยังมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significant) โดยมีค่า OR เท่ากับ 0.1220, 95% CI (0.0151-0.9862) และค่า *p*-value เท่ากับ 0.022 ($p < 0.05$) และในกลุ่มที่ *GSTM1* และ *GSTT1* เป็น homozygous mutant (-/-) และ

GSTP1 เป็น mutant (Ile/Val หรือ Val/Val) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (statistical significant) โดยมีค่า OR เท่ากับ 0.3835, 95% CI (0.1573-0.9347) และค่า p -value เท่ากับ 0.032 ($p < 0.05$)

4.5. การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนด้วยโปรแกรม MDR

จากความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน GSTs ชนิด M1, P1 และ T1 เมื่อนำมาวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนด้วยโปรแกรม Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) V1.1.0 พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ของยีนระหว่าง 1 ยีน 2 ยีน และ 3 ยีน จึงสรุปได้ว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18. แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนด้วยโปรแกรม MDR

Model	Training Bal. Acc.	Testing Bal Acc.	Sign Test (p)	CV Consistency
X2	0.5625	0.5625	8(0.0547)	10/10
X2 X3	0.5734	0.4964	6(0.3770)	5/10
X1 X2 X3	0.6002	0.5015	5(0.6230)	10/10