บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenetics) เป็นศาสตร์แขนงหนึ่งที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในจีโนมมนุษย์ที่ครอบคลุมตั้งแต่ การพยากรณ์ความเสี่ยงต่อการเกิดโรค การตอบสนองต่อยา การเลือกใช้ยาและขนาดยาที่เหมาะสม ฯลฯ ทั้งนี้เนื่องจากมนุษย์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างปัจเจกบุคคล (genetic polymorphisms) ซึ่งพบว่ามนุษย์ไม่ว่าจะเป็นเชื้อชาติไหนก็ตามย่อมมีรหัสแห่งชีวิตที่เป็นลำดับเบสในดีเอ็นเอเหมือนกันทุกคน จะแตกต่างกันบ้างก็เพียงร้อยละ 0.1 ของลำดับเบสทั้งหมดในจีโนมเท่านั้น ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้เองที่ทำให้มนุษย์ทุกคนมีเอกลักษณ์ที่เป็นของตนเอง ไม่มีทางเหมือนกับมนุษย์คนใดในโลก [1] เนื่องมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มประชากรในแต่ละเชื้อชาติและพันธุกรรม ฯลฯ ดังนั้นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนต่างๆ จึงได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่อง โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ Glutathione S-Transferases (GSTs) เนื่องจากเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงสารเคมีหรือยาเมื่อเข้าสู่ร่างกายในวิถีเมตาบอลิสมที่ 2 (phase II metabolic enzyme) โดยเอนไซม์ GSTs จะทำการย้ายหมู่ functional group จาก conjugating agent เข้ากับโมเลกุลของสารเคมีหรือยาตรงบริเวณ sulhydryl group เพื่อเพิ่มความมีขั้ว (polar) ให้กับสารนั้นทำให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น โดยเอนไซม์ GSTs นี้จะพบอยู่ในเนื้อเยื่อตับในส่วน cytosol ที่ได้จากการสกัด microsome และเอนไซม์ GSTs ยังมีบทบาทที่สำคัญคือ ทำลายสารพิษต่างๆ (detoxification) อีกทั้งยังทำลายสารก่อมะเร็งจำพวก polyaromatic hydrocarbon เช่น benzo[α]-pyrene, naphthalene และ anthracene ฯลฯ นอกจากนี้เอนไซม์ GSTs ยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากพวก free radical และ electrophile ต่าง ๆ [2] โดยในมนุษย์จะพบกลุ่มของเอนไซม์ GSTs ในส่วนของ cytosol อย่างน้อย 8 ชนิด คือ Alpha (α) Kappar (κ) Mu (μ) Pi (π) Sigma (δ) Omega (ω) Theta (θ) และ Zeta (ζ) โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะพบการกระจายตัวไม่เท่ากันในแต่ละเนื้อเยื่อของร่างกาย [3] จึงส่งผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งได้แตกต่างกันไป ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิจัยถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ในกลุ่ม

ประชากรไทยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยทำการศึกษาผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTM1* และ *CYP2E1* ในกลุ่มคนปกติจำนวน 485 คน พบว่ายีน *GSTM1* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นแบบปกติ (wild type) หรือแบบที่มีการขาดหายไปของยีนทั้งยีน (homozygous mutant) คิดเป็นร้อยละ 62.7 [4] และมีความถี่สูงเมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มประชากรในประเทศแถบเอเชีย (คิดเป็นร้อยละ 42-60) จึงเป็นจุดที่น่าสนใจต่อการศึกษาข้อมูลในกลุ่มประชากรไทยเพิ่มเติม ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับ โดยทำการเปรียบเทียบความถี่ และการกระจายตัวในกลุ่มตัวอย่างที่เป็นมะเร็งตับและคนปกติ เนื่องจากในกลุ่มประชากรไทยนั้นมีแนวโน้มของการเกิดมะเร็งตับสูงขึ้นในทุกๆปี และมีอุบัติการณ์ในการเกิดสูงเมื่อเทียบกับประชากรในเชื้อชาติอื่น โดยเฉพาะมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma) และมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) ซึ่งมะเร็งท่อน้ำดีนั้นมีอุบัติการณ์ในการเกิดสูงที่สุดในกลุ่มประชากรไทยแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดขอนแก่น มีอุบัติการณ์ในการเกิดคิดเป็นร้อยละ 89 ซึ่งเป็นอุบัติการณ์ที่สูงที่สุดในประชากรโลก เนื่องมาจากว่าประชากรไทยในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือส่วนใหญ่นิยมทานอาหารที่ปรุงไม่สุก จึงมีโอกาสได้รับไข่พยาธิ *Opisthorchis viverrini* (OV) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งการเกิดมะเร็งตับส่วนใหญ่จะนำไปสู่การเกิดภาวะตับแข็ง และเสียชีวิตในเวลาต่อมา ซึ่งสาเหตุหลักในการเกิดมะเร็งตับมีได้หลายสาเหตุ เช่น การได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี/ซี การดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ การได้รับสารอะฟลาท๊อกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งตับ (hepatocarcinogen) ฯลฯ ปัจจัยต่างๆในสิ่งแวดล้อม และปัจจัยทางพันธุกรรม เป็นต้น [5]

จากการที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* สามารถเกิดขึ้นได้หลายลักษณะ เช่น การเกิดการเพิ่มขึ้นของยีน (gene duplication) การขาดหายไปของยีน (gene deletion) และการเกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของลำดับเบสเดี่ยวๆ (single nucleotide polymorphisms; SNPs) เป็นต้น [6] การเกิดความหลากหลายของยีนในลักษณะดังกล่าวอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ให้ทำงานเพิ่มขึ้น ลดลง เท่าเดิม หรือมีการขาดหายไปของเอนไซม์ จึงทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง แต่ทั้งนี้ปัจจัยทางด้านพันธุกรรมเป็นเพียงหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ แต่ยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายปัจจัยที่ส่งเสริมการเกิดมะเร็งตับ ในการศึกษาวิจัยนี้จึงทำการศึกษาจีโนไทป์และฟีโนไทป์ของกลูทาไทโอน เอส-ทรานสเฟอเรส ชนิด M1, P1 และ T1 ที่มีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งตับในคนไทย เปรียบเทียบกับคนปกติ เพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นในกลุ่มประชากรไทยที่เป็นมะเร็งตับ เนื่องจากยังไม่มีการศึกษามาก่อน รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จากชิ้นเนื้อตับปกติใน

ผู้ที่เป็นมะเร็งตับ แล้วนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่มีจีโนไทป์ต่างกัน (genotype-phenotype correlation) รวมทั้งหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* กับการเป็นมะเร็งตับในคนไทย (genetic association)

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาชนิดและความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 ที่พบในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับและคนปกติ
2. ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ GSTs ในตับของผู้ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับ
3. หาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 กับการเป็นมะเร็งตับในคนไทย

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลของจีโนไทป์ควบคู่ไปกับผลของฟีโนไทป์ในผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับชนิดมะเร็งเซลล์ตับ (hepatocellular carcinoma) หรือมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) โดยนำเอาชิ้นเนื้อตับปกติจากผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งตับที่ต้องเข้ารับการผ่าตัด ณ โรงพยาบาลศิริราช ไปสกัด microsome ซึ่งเอนไซม์ GSTs จะอยู่ในส่วนของ cytosol เพื่อนำไปวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับผลของจีโนไทป์ที่ตรวจได้จากเลือด ทำให้ได้ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ (genotype-phenotype correlation) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับและกลุ่มคนปกติ ที่มีสุขภาพดี และไม่มีประวัติครอบครัวเป็นมะเร็ง เพื่อหาความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับ (genetic association) ในคนไทยที่ทำการศึกษา

1.4. ข้อจำกัดของการวิจัย

1. ไม่สามารถเก็บชิ้นเนื้อตับของคนปกติ ที่มาบริจาคโลหิตซึ่งเป็นคนที่มีสุขภาพดี จึงไม่สามารถทำการศึกษาเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ในตับระหว่างผู้เข้าร่วมวิจัย

ที่เป็นมะเร็งตับกับคนปกติ เนื่องจากการตัดชิ้นเนื้อตับจากคนปกติในประชากรนั้นไม่สามารถทำได้

2. ไม่ได้เก็บข้อมูลและประวัติส่วนตัวของผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ เช่น ประวัติการดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ การได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี/ซี และประวัติการทำงาน เพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณาว่ามีความเกี่ยวข้อง หรือเป็นปัจจัยส่งเสริมในการเกิดมะเร็งตับหรือไม่

1.5. วิธีดำเนินการวิจัย

1. หาชนิดและความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* (genotypic determination) จากตัวอย่างเลือดของผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับและคนปกติ โดยทำการสกัด DNA แล้วทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วย primer และเทคนิคที่มีความจำเพาะ เช่น multiplex PCR, PCR-RFLP (Restriction Fragment Length), Real time-PCR และ DHPLC เป็นต้น
2. วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ (phenotypic determination) จากชิ้นเนื้อตับของผู้เข้าร่วมวิจัยที่เป็นมะเร็งตับ โดยการนำชิ้นเนื้อตับมาสกัด microsome ซึ่งเอนไซม์ GSTs จะอยู่ในส่วนของ cytosol แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ (specific substrate) แล้ววัดอัตราการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ได้หลังจากการทำปฏิกิริยา(metabolite) ด้วยเครื่องspectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340nm
3. วัดปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry's method แล้วนำมาคำนวณค่าของประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ตามกฎ Beer's law ได้หน่วยเป็น nmol/min/mg protein
4. หาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* เปรียบเทียบกับผลการทำงานของเอนไซม์ (genotype-phenotype correlation)
5. หาความสัมพันธ์ของความความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ต่อความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งตับ (genetic association)

1.6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลชนิดและความถี่ของความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 ที่พบในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับและคนปกติ
2. ได้ข้อมูลการทำงานของเอนไซม์ GSTs ในตับที่สัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ในคนไทยที่เป็นมะเร็งตับ
3. ได้ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *GSTs* ชนิด M1, P1 และ T1 กับความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับในคนไทย