

ภาวะพหุสัญญาณของยีน XRCC1 ที่โคดอน 194 280 และ 399 ในผู้ป่วย
โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน

นางสาวฐิติพร บุญสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

Polymorphisms of *XRCC1* gene codons 194, 280 and 399 in ameloblastoma patients

Miss Thitiporn Boonsuwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ภาวะพหุสัญญาณของยีน XRCC1 ที่โคดอน 194 280 และ 399 ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน

โดย

นางสาวฐิติพร บุญสุวรรณ

สาขาวิชา

พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์ยิจิต

คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์ยิจิต)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. ทพ.นครินทร์ กิตกำธร)

จิตติพร บุญสุวรรณ : ภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ที่โคดอน 194 280 และ 399 ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน. (Polymorphism of *XRCC1* gene codons 194, 280 and 399 in Ameloblastoma Patients อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์ จิต, 83 หน้า.

โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (ameloblastoma) เป็นโรคเนื้องอกที่พบบ่อยเป็นอันดับ 2 ในกลุ่มของเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจากฟัน (odontogenic tumor) เนื้องอกชนิดนี้เป็นเนื้องอกชนิดที่ไม่ร้ายแรง แต่พฤติกรรมเฉพาะของโรคจะคล้ายมะเร็ง และมีอัตราการเกิดโรคซ้ำสูง สำหรับ DNA repair gene (กลุ่มย่อยของยีนต้านมะเร็ง) เป็นกระบวนการซ่อมแซมและป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอ ซึ่งกระบวนการ Base-excision repair (BER) เป็นกระบวนการสำคัญในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ และในกระบวนการนี้มียีนที่สำคัญคือ X-ray repair cross-complementing Group 1 gene (*XRCC1*) เป็นยีนที่เกิดภาวะพหุสัณฐานได้สูงและมีการศึกษามากในโคดอน 194 280 และ 399 ว่ามีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคในหลายๆ โรค และจากการศึกษาของ นครินทร์ กิตกำธร และคณะพบความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัณฐานของยีน *TP53* ตำแหน่ง โคดอน 72 ว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึง ตั้งสมมุติฐานว่าการเกิด ภาวะพหุสัณฐานในยีน *XRCC1* บริเวณ โคดอน 194 280 และ 399 น่าจะเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการก่อให้เกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันในประเทศไทยได้ โดย นำเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของรูปแบบของยีน *XRCC1* ที่ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399 ในรอยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันในผู้ป่วยชาวไทยโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบส และยืนยันลำดับเบสด้วยการส่ง sequencing ในประชากรที่เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันจำนวน 82 รายและในประชากรปกติ 140 ราย โดยในประชากรปกติแบ่งเป็นแบ่งเป็นผู้ชาย 71 ราย (50.71%) และผู้หญิง 69 ราย (49.29%) และในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันแบ่งเป็นผู้ป่วยชาย 41 ราย (50%) และผู้ป่วยหญิง 41 ราย (50%)

ในการหาความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรค เมื่อเทียบในประชากรผู้ป่วยเป็นโรคกับประชากรปกติ ในโคดอนที่ 194 มีค่าOR (95% CI) เท่ากับ1.62 (1.05-2.48) *P*-value เท่ากับ 0.027 และในโคดอนที่ 399 มีค่าOR (95% CI) เท่ากับ1.83 (1.19-2.81) *P*-value เท่ากับ 0.005 ซึ่งทั้ง 2 โคดอนมีความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรค แต่ในโคดอนที่ 280 นั้นไม่พบความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคโดยมีค่า OR (95% CI) เท่ากับ1.09 (0.62-1.89) *P*-value เท่ากับ 0.862 สำหรับรูปแบบแฮพลอไทป์ที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดโรคมามากที่สุดคือ GGC มีค่า *P* = 0.000472 และในการยืนยันว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อของผู้ป่วยนั้นไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ของเซลล์ร่างกายโดยการหาค่า Coefficient of variation (%CV) ต้องมีค่าไม่เกิน 10% พบว่าทั้ง 3 โคดอนมีค่าไม่เกิน 10%

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นปัจจัยร่วมกับยีนอื่นๆ เพื่อทำนายความเสี่ยงในการเกิดโรคได้

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา.....2554.....

#5172277923 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS : Ameloblastoma, Polymorphism, *XRCC1*

THITIPORN BOONSUWAN: POLYMORPHISM OF *XRCC1* GENE CODON 194, 280 AND 399 IN AMELOBLASTOMA PATIENTS. ADVISOR: PATTAMAWADEE YANATATSANEEJIT, Ph.D., 83 pp.

Ameloblastoma (AB) is the second most common in odontogenic tumor. It is characterized as a benign neoplasm, locally invades and frequently recurs. DNA repairing gene (sub set of tumor suppressor gene) plays a critical role in protecting the genome from carcinogens. Base-excision repair (BER) is an important DNA repair pathway. The X-ray repair cross-complementing Group1 (*XRCC1*) gene has been defined as essential in the base excision repair (BER) and single-strand break repair processes. This gene is highly polymorphic, the most extensively studied genetic changes are in codon 194,280 and 399 and Kitkumthorn, et al found the association of TP53 and ameloblastoma. To test the hypothesis that *XRCC1*codon 194, 280 and 399 polymorphism was associated with an increased risk of developing ameloblastoma in the Thai population. Genotyping was performed by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) confirm by sequencing in 82 AB patients and 140 normal controls. Normal controls male 71case (50.71%), female 69 case (49.29%) andAmeloblastomamale 41case (50.00%), female 41 case (50.00%). We found association Ameloblastoma in codon 194 OR (95%CI) 1.62 (1.05-2.48) *P*- value = 0.027and codon 399 OR (95%CI) 1.83 (1.19-2.81) *P*- value = 0.005 not found in codon 280 OR (95%CI) 1.09 (0.62-1.89) *P*- value = 0.862.

The GGC is risk haplotypes *P* = 0.000472. Thus we confirmed samples which were not somatic mutation with Coefficient of variation (%CV) and found less than 10%. Our study suggests that SNPs: *XRCC1* codon 194 and 399 are one of the genetic risk factors for Ameloblastoma and that those polymorphism may be useful as one of the genetic markers for predicting the occurrence of this disease.

Department :Botany.....

Student's Signature

Field of Study :Genetics.....

Advisor's Signature

Academic Year :2011.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. ปฐุมวดี ญาณทัศนีย์จิต ที่ให้คำแนะนำ เอาใจใส่ ให้กำลังใจทั้งเรื่องเรียนและเรื่องการทำวิจัย รวมทั้งการแนะนำเอกสารต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย และช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณอาจารย์ ทพ.ดร.นครินทร์ กิตกำธร สำหรับคำแนะนำต่างๆในการวิจัย ซึ่งอาจารย์ได้ให้ทั้งกำลังใจในเรื่องเรียน เรื่องการทำวิจัย รวมถึงเรื่องการดำรงชีวิต และร่วมเป็นกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. ชูมพล คุณวาสี และอาจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ ที่ได้ร่วมเป็นประธานและกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชา พฤษศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สำหรับผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2554 ภายใต้แผนงานวิจัยโครงการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพ ในโครงการผลิตนักวิจัยด้าน ความหลากหลายทางชีวภาพระดับปริญญาโท – เอก หมายเลขโครงการ CEB_M_80_2001 จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อและคุณแม่ที่คอยให้กำลังใจ เอาใจใส่และห่วงใย สุขภาพตลอดเวลา ตลอดจนให้กำลังใจและกำลังใจทรัพย์เรื่อยมา จนจบการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	2
1.2 วัตถุประสงค์.....	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (ameloblastoma).....	5
2.2 ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคเนื้องอกจากเซลล์ต้นกำเนิดฟัน.....	7
2.3 ยีนที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้.....	13
2.4 เทคนิคที่จะช่วยในการวิเคราะห์ภาวะพหุสัญญาณของยีน XRCC1.....	15
2.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติในภาวะพหุสัญญาณของยีน XRCC1.....	16
2.6 Somatic cell mutation.....	17
3. วิธีการศึกษา.....	19
3.1 ประชากรทดลอง.....	19
3.2 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	19
3.3 วิธีการทดลอง.....	21
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	31
4. ผลการศึกษา.....	37
4.1 ผลการศึกษาค้นคว้าข้อมูล.....	37
4.2 ผลการเลือกกลุ่มประชากรที่ศึกษา.....	38
4.3 ผลการเก็บตัวอย่าง.....	38

บทที่	หน้า
4.5 ผลการยืนยันลำดับเบสโดยการ sequencing.....	40
4.6 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยค่าสถิติ.....	43
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	46
ข้อเสนอแนะ.....	58
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	65
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	83

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตารางที่ 4.1 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE).....	46
2	ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ความเสี่ยงในการเกิดโรคของภาวะพหุสัญญาณในยีน XRCC1 ตำแหน่งโคดอน194 เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันและประชากรปกติ.....	48
3	ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ ในตำแหน่งโคดอนที่ 194.....	49
4	ตารางที่ 4.4 ตารางความสัมพันธ์ความเสี่ยงในการเกิดโรคของภาวะพหุสัญญาณในยีน XRCC1 ตำแหน่งโคดอน 280 เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันและประชากรปกติ.....	50
5	ตารางที่ 4.5 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ ในตำแหน่งโคดอนที่ 280.....	51
6	ตารางที่ 4.6 ตารางความสัมพันธ์ความเสี่ยงในการเกิดโรคของภาวะพหุสัญญาณในยีน XRCC1 ตำแหน่งโคดอน 399 เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันและประชากรปกติ.....	52
7	ตารางที่ 4.7 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ ในตำแหน่งโคดอนที่ 399.....	53
8	ตารางที่ 4.8 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของอัลลีลในสปีซของยีน XRCC1 ในผู้ป่วย.....	54

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
9	ตารางที่ 4.9 ตารางวิเคราะห์รูปแบบของแฮพลอไทป์ในสลิป rs25487 (โคดอน 399), rs25489 (โคดอน 280), rs1799782 (โคดอน 194).....	55
10	ตารางที่ 4.10 ตารางรูปแบบของการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในสลิปของผู้ป่วยและประชากรปกติ.....	55
11	ตารางที่ 4.11 ตารางวัดความเข้มข้น ในตัวอย่าง ผู้ป่วยที่มีอัลลีลแบบเฮเทโรไซกัสจำนวน35คน โคดอนที่ 194.....	56
12	ตารางที่ 4.12 ตารางวัดความเข้มข้น ในตัวอย่าง ผู้ป่วยที่มีอัลลีลแบบเฮเทโรไซกัสจำนวน21คน โคดอนที่ 280.....	56
13	ตารางที่ 4.13 ตารางวัดความเข้มข้น ในตัวอย่าง ผู้ป่วยที่มีอัลลีลแบบเฮเทโรไซกัสจำนวน15คน โคดอนที่ 399 ที่ใช้ <i>Taq</i> DNA Polymerase Invitrogen.....	57
14	ตารางที่ 4.14 ตารางวัดความเข้มข้น ในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีลแบบเฮเทโรไซกัสจำนวน30 คน โคดอนที่ 399 ที่ใช้ <i>Taq</i> DNA Polymerase Hotstart.....	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพที่ 2.1 ลักษณะชั้นเนื้อผู้ป่วยบริเวณกระดูกขากรรไกรที่เป็นโรคเนื้องอก เซลล์ต้นกำเนิดพัน แบบ Conventional.....	6
2	ภาพที่ 2.2 ลักษณะเนื้อเยื่อเซลล์ชั้นในเป็นเซลล์รูป stellate อยู่กันอย่างหลวมๆ บางครั้งเกิดการเกิดถุงน้ำ (cystic degeneration).....	7
3	ภาพที่ 2.3 แผนภาพแสดงตัวอย่างสลิป จำนวน 1 ตำแหน่ง.....	8
4	ภาพที่ 2.4 กระบวนการต่างๆที่เกิดหลังจากที่ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย.....	10
5	ภาพที่ 2.5 กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบ Base excision repair.....	12
6	ภาพที่ 2.6 ภาพกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบ Single-strand break (SSB) repair.....	12
7	ภาพที่ 2.7 ภาพกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบ Double-strand break (DSB) repairs.....	13
8	ภาพที่ 2.8 สรุปสาเหตุความเสียหายของดีเอ็นเอ, กระบวนการซ่อมแซมและหน้าที่ ของเซลล์.....	14
9	ภาพที่ 2.9 ภาพจำลองโครโมโซมยีน XRCC1 MIM *194360.....	15
10	ภาพที่ 2.10 กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอในกระบวนการ Base excision repair (BER) โดยมี XRCC1 ทำงานร่วมกับโปรตีนตัวอื่นๆเป็น scaffold protein.....	21
11	ภาพที่ 3.1 ภาพแสดงลำดับเบสของ nucleotide.....	22
12	ภาพที่ 3.2 ภาพแสดงลำดับเบสของ mRNA.....	23
13	ภาพที่ 3.3 ภาพแสดง intron และ exon.....	31
14	ภาพที่ 3.4 ภาพแสดงผลการคำนวณ Hardy-Weinberg equilibrium.....	32
15	ภาพที่ 3.5 ภาพตารางแสดง Hardy-Weinberg equilibrium.....	39
16	ภาพที่ 4.1 ลักษณะชั้นเนื้อผู้ป่วยบริเวณกระดูกขากรรไกรที่เป็นโรคเนื้องอก เซลล์ต้นกำเนิดพัน แบบ Conventional จะพบส่วนที่มีลักษณะเป็น Unisystic..	39
17	ภาพที่ 4.2 ลักษณะเนื้อเยื่อเซลล์ชั้นในเป็นเซลล์รูป stellate อยู่กันอย่างหลวมๆ บางครั้งเกิดการเกิดถุงน้ำ (cystic degeneration).....	40
18	ภาพที่ 4.3 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยที่เป็นโรคเนื้องอก เซลล์ต้นกำเนิดพันเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ PvuII.....	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
19	ภาพที่ 4.4 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยที่เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพืนมื่อตัดด้วยเอนไซม์ <i>Rsal</i>	42
20	ภาพที่ 4.5 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยที่เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพืนมื่อตัดด้วยเอนไซม์ <i>MspI</i>	43
21	ภาพที่ 4.6 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล C ในโคดอนที่ 194 โดยใช้ forward primer.....	43
22	ภาพที่ 4.7 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล T โดยใช้ forward primer.....	44
23	ภาพที่ 4.8 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล G โดยใช้ reverse primer.....	44
24	ภาพที่ 4.9 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล A โดยใช้ reverse primer.....	45
25	ภาพที่ 4.10 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล G โดยใช้ forward primer.....	45
26	ภาพที่ 4.11 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล A โดยใช้ forward primer.....	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื้องอก (Neoplasia) เป็นความผิดปกติของเซลล์ในด้านต่าง ๆ เช่น การเปลี่ยนแปลง (differentiation) การเจริญวัยเต็มที่ (maturation) การควบคุมการเติบโต (control of growth) ซึ่งจะปรากฏให้เห็นเป็นการสร้างก้อนเนื้อที่ผิดปกติเรียกว่า tumors ทำให้มีการบวม ขยายใหญ่ เป็นก้อน ตุ่ม ไต ซึ่งอาจออกขึ้นมาใหม่จากเนื้อเยื่อปกติของร่างกาย อาจเกิดขึ้นภายในร่างกายหรือบนผิวหนังก็ได้ ก้อนเนื้องอกอาจเป็น ชนิดไม่ร้ายแรง (benign) หรือร้ายแรง (malignant) ก็ได้ขึ้นกับลักษณะหลายอย่าง ที่เด่นชัดคือ malignant จะมีคุณสมบัติในการแพร่กระจายไปจากจุดกำเนิด เนื้องอกชนิดร้ายแรง จะโตเร็ว รุกรานและทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ รอบ ๆ ตัว และแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นที่ไกลออกไปได้ทั่วทั้งร่างกาย โดยผ่านทางระบบน้ำเหลืองและระบบไหลเวียนโลหิตและมักเป็นสาเหตุให้ถึงแก่ชีวิต ส่วน benign จะเติบโตอยู่เฉพาะที่ และมีชื่อเรียกต่างกันไปตามอวัยวะที่เกิด เนื้องอกอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การกลายพันธุ์ การแบ่งตัวที่ผิดปกติของเซลล์หรือไวรัสบางประเภท นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางพันธุกรรมด้วย ซึ่งมียีนที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 กลุ่มคือ 1) ยีนก่อมะเร็ง (Oncogene) 2) ยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor gene) ซึ่งยีนสองชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์ หากพบว่ามีการแสดงออกของยีนก่อมะเร็งมากผิดปกติ แต่ในทางกลับกัน ยีนต้านมะเร็งถูกยับยั้งการแสดงออก ก็จะทำให้เซลล์ ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็ง การที่ยีนต้านมะเร็ง ถูกยับยั้งการแสดงออกนั้นเกิดจากหลายสาเหตุที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรูปแบบต่างๆ รวมถึง ภาวะพหุสัณฐานของยีน (single nucleotide polymorphism, SNP สนิป) และความผิดปกติของยีนที่ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair gene) ด้วย

ภาวะพหุสัณฐานของยีน หรือ สนิป เป็นความแปรผันทางพันธุกรรมในมนุษย์ประเภทหนึ่ง ที่พบได้บ่อย โดยทั่วไปแล้ว nucleotide polymorphism จะแสดงออกอย่างน้อย 1% ของ human population เรียกว่า SNPs โดยเป็นความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์เบสเพียง 1 ตำแหน่ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในลำดับเบสเพียง 1 ตำแหน่งอาจส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนตลอดจนปริมาณและการทำงานของโปรตีนได้ ส่วนผลที่เกิดขึ้นจะมากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับตำแหน่งของสนิปบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเกิดในส่วนที่ไม่มีการถอดรหัส และเกิดในส่วนที่มีการถอดรหัส (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2548)

สำหรับ DNA repair gene เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่แตกหัก ซึ่งในชีวิตประจำวันสายของดีเอ็นเอมีการแตกหักเนื่องมาจาก เมแทบอลิซึมภายในเซลล์หรือจาก

ปัจจัยภายนอกโดยการแตกหักนี้ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ดังนั้นเมื่อใดก็ตามที่กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ เกิดความเสียหายก็จะส่งผลต่อการเกิดโรคต่างๆได้เช่นกัน รวมไปถึงการเกิดโรคมะเร็ง

โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (ameloblastoma) เป็นอีกโรคที่ควรให้ความสำคัญ เนื่องจากโรคนี้เมื่อเป็นแล้วถึงแม้ว่าทำการรักษา ก็ยังสามารถกลับมาเป็นซ้ำได้ ซึ่งอัตราการเกิดโรคซ้ำสูงถึงร้อยละ 50-70 โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน เป็นโรคเนื้องอกที่เกิดบริเวณใบหน้าและกระดูกขากรรไกร เป็นเนื้องอกที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มของเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจากฟัน (odontogenic tumor) มีรายงานครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1868 โดย Broca (Baden, 1965) ชื่อ ameloblastoma ถูกตั้งโดย Churchill ในปี ค.ศ. 1933 (Iordanidis *et al.*, 1999) เนื้องอกชนิดนี้เป็นเนื้องอกที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจากฟัน (odontogenic epithelium) โดยพบประมาณ 13-24% ตามแต่กลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษา (Small and Waldron, 1955) และพบได้ประมาณ 1% ของรอยโรคในช่องปาก (Melrose *et al.*, 1999) สำหรับในประเทศไทยจากการศึกษาโดยรัฐพงษ์ วรวงศ์วิสุ (2543) โดยศึกษาจากรอยโรคในช่องปากจำนวนใน 2,408 ราย ในปีพ.ศ. 2576-2540 พบว่ารอยโรคเนื้องอกจากเซลล์ต้นกำเนิดฟันมีอัตราการเกิดมากเป็นลำดับที่ 5 ของรอยโรคทั้งหมดที่พบในช่องปาก และมีอัตราการเกิดโรคในกระดูกขากรรไกร และข้อต่อขากรรไกรมากเป็นลำดับที่ 2 (24.8%, 193 ใน 779 ราย) ตำแหน่งที่เกิดโรคมกกว่าร้อยละ 80 พบที่ขากรรไกรล่าง โดยเฉพาะบริเวณฟันกราม และส่วนท้ายฟันกรามเป็นตำแหน่งที่พบมากที่สุด (Chaudhuri, 1975) ช่วงอายุที่ทำให้เกิดโรคส่วนใหญ่ประมาณ 30-50 ปี (Philipsen *et al.*, 2001) สำหรับการรักษาโรคเนื้องอกจากเซลล์ต้นกำเนิดฟันนั้น จะไม่ตอบสนองต่อการรักษาโดยวิธีเคมีบำบัด และรังสีบำบัด การรักษาผู้ป่วยจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการทำศัลยกรรมอย่างกว้างโดยวิธีเดียว ทำให้เกิดความพิการของใบหน้า เป็นปัญหาในด้านเศรษฐกิจและสังคม โดยรวม รวมถึงกลไกการเกิดเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Muller and Slootweg, 1985) การศึกษาในระดับโมเลกุลของเซลล์เนื้องอกชนิดนี้ก็ยังไม่มีการศึกษาอย่างแพร่หลาย การศึกษาที่มีอยู่ข้อมูลที่ได้ก็ยังไม่ค่อยมากและไม่สมบูรณ์ ดังนั้นการศึกษหาข้อมูลของเนื้องอกชนิดนี้ในระดับโมเลกุล จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ที่ต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม

จากการศึกษาของ นครินทร์ กิตกำธร และคณะพบความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัญญาณของยีน TP53 ตำแหน่ง โคดอน 72 ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor) ว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (Kitkumthorn *et al.*, 2010) ซึ่งเห็นได้ว่าภาวะพหุสัญญาณของยีนนี้มีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันได้

ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เราสนใจยีน XRCC1 ซึ่งจากการค้นคว้าเอกสารงานวิจัยพบว่าการศึกษาที่ผ่านมาของภาวะพหุสัญญาณในยีน XRCC1 ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม DNA repair gene เป็น

ยีนที่เกิดภาวะพหุสัณฐานได้สูงและมีการศึกษามากใน โคดอน 194 (Arg194Trp) โคดอน 280 (Arg280His) และโคดอน 399 (Arg399Gln) ว่ามีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคในหลายๆโรค รวมถึงยังไม่มีคณะวิจัยกลุ่มใดทำการศึกษาระยะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ที่ส่งผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน

ยีน *XRCC1* มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 19q13.2 ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายในกระบวนการ base excision repair ที่เกิดจากรังสีที่ทำให้เกิดไอออไนเซชัน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมาและรังสีคอสมิก และสารเคมีที่เติมหมู่แอลคิล (Alkylating Agent) ซึ่งเมื่อดีเอ็นเอได้รับความเสียหาย จากรังสี และสารเคมีที่เติมหมู่แอลคิล แล้ว แต่ ยีน *XRCC1* มีความบกพร่องในการทำหน้าที่ก็จะทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค (Zhang *et al.*, 2006) บริเวณ โคดอน 194 280 และ 399 ซึ่งเป็นบริเวณ evolutionarily conserved (Ratnasinghe *et al.*, 2001) นั้นส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ในหลายโรค เช่น มะเร็งเต้านม (Zhang *et al.*, 2006) มะเร็งปอด (Ratnasinghe *et al.*, 2001) มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Stern *et al.*, 2001) ฯลฯ ดังนั้นจึงตั้งสมมุติฐานว่าการเกิดภาวะพหุสัณฐานในยีน *XRCC1* บริเวณ โคดอน 194 280 และ 399 น่าจะส่งผลทำให้เกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (ameloblastoma)

การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการศึกษาเพื่อพิสูจน์หาความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัณฐานในยีน *XRCC1* บริเวณโคดอน 194 280 และ 399 โดยการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ในรอยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันในผู้ป่วยชาวไทยที่ได้รับการวินิจฉัยโดยทันตพยาธิแพทย์ว่าเป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันที่รวบรวมได้ ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2542-2551 จำนวน 82 คน จากบล็อกชิ้นเนื้อผู้ป่วย และในคนปกติจำนวน 140 คน จากเลือด โดยตำแหน่งโคดอน 194 ใช้เอนไซม์ *PvuII* ตำแหน่งโคดอน 280 ใช้เอนไซม์ *RsaI* และตำแหน่งโคดอน 399 ใช้เอนไซม์ *MspI* จากนั้นใช้ค่าการคำนวณทางสถิติต่อไปเพื่อเป็นการหาความสัมพันธ์และทำนายการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ที่โคดอน 194 280 และ 399 ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันในผู้ป่วยชาวไทย ที่สัมพันธ์กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (ameloblastoma)
2. สร้างฐานข้อมูล SNP database และ SNP frequency ของยีน *XRCC1* ในตำแหน่งโคดอน 194, 280 และ 399 ในประชากรไทยเพื่อประโยชน์ในการศึกษาในโรคอื่นๆต่อไป

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. ขออนุมัติจริยธรรมจาก คณะกรรมการ บริหารการดำเนินงานพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์และการใช้สัตว์ทดลองในการวิจัย กลุ่มวิทยาศาสตร์สุขภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. เลือกร่วมประชากรที่ศึกษา ประชากรกลุ่มควบคุมจากผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันและประชากรกลุ่มผู้ป่วยเป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน
4. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดในประชากรกลุ่มควบคุมจากผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันและจากบลิ๊อคซันเนื้อในประชากรกลุ่มผู้ป่วยเป็น โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน
5. ตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP
6. วิเคราะห์ผลภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis
7. ยืนยันลำดับเบสโดยการ sequencing
8. ศึกษาความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่าง ภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอน 194, 280 และ 399 กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและลักษณะทางคลินิกของโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน
9. วิเคราะห์ผลเพื่อยืนยันว่าตัวอย่างของคนไข้โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ไม่ได้เกิดจาก Somatic cell mutation โดยใช้ค่า Coefficient of variation (CV)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ตำแหน่ง โคดอน 194 280 และ 399 กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและลักษณะทางคลินิกของโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน โดยได้คาดการณ์ว่าภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399 จะมีผลต่อความเสี่ยงการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ซึ่งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปเป็นพื้นฐานในการทำนายและการรักษาโรคได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (ameloblastoma)

เป็นโรคเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรงพบได้บ่อยในกระดูกขากรรไกร พบบ่อยที่สุดในกลุ่มเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดมาจากฟัน (odontogenic epithelium) มีลักษณะจุลพยาธิวิทยาอยู่ในกลุ่มเนื้องอกที่ไม่ร้ายแรง เจริญเติบโตช้าและไม่สัมพันธ์กับอาการแสดงออกจนกว่าจะมีขนาดใหญ่ขึ้นถึงแม้เนื้องอกชนิดนี้จะเป็นเนื้องอกที่ไม่ร้ายแรงแต่ พฤติกรรม เฉพาะของโรคจะคล้ายมะเร็ง คือมีการทำลายกระดูกกลุกลามเฉพาะที่เข้าสู่เนื้อเยื่อข้างเคียง ขอบเขตของโรคไม่ชัดเจน และมีอัตราการเกิดซ้ำสูง 50-72% (Regezi *et al.*, 2002) เนื้องอกที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆจะทำให้ผู้ป่วยเกิดความไม่สบายในการดำรงชีวิต (Philipsen *et al.*, 2001)

เซลล์ต้นกำเนิดของเนื้องอกชนิดนี้มีรายงานว่าเกิดจาก (Shaw and Katsikas, 1973)

1. เซลล์เยื่อบุที่เหลือค้างของเนื้อเยื่อที่สร้างฟัน ได้แก่ แถบเยื่อบุผิวต้นกำเนิดฟัน (dental lamina), epithelial rest of Malasses เป็นต้น

2. เซลล์เยื่อบุของ odontogenic cyst

3. basal cell ของเนื้อเยื่อช่องปาก

4. เซลล์เยื่อบุของ enamel organ

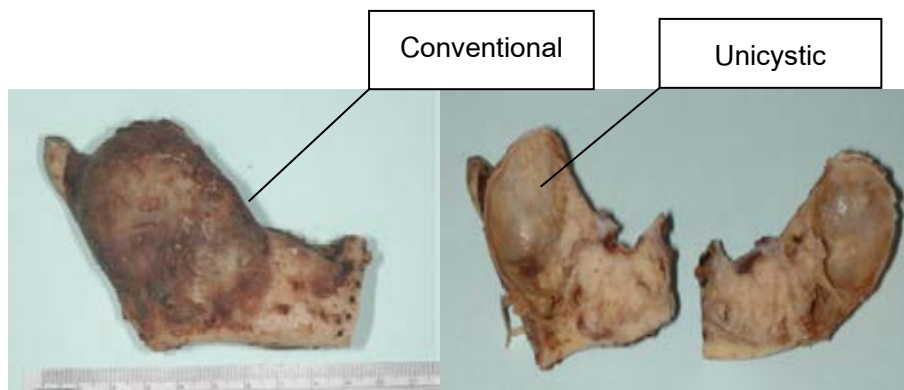
5. เยื่อช่องปากที่เกิดอยู่นอกช่องปาก

เนื้องอกชนิดนี้มีลักษณะทางคลินิกและภาพภาพรังสีต่างกันทำให้แบ่งได้เป็น 2 ชนิด

ซึ่งมีผลต่อการรักษาและพยากรณ์ ได้แก่ (Reichart *et al.*, 1995)

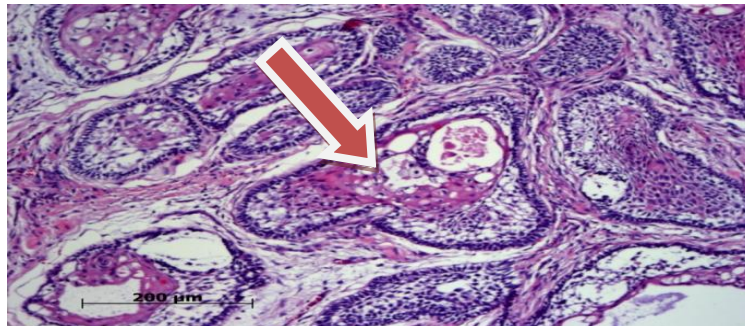
1. Conventional solid หรือ multicystic ซึ่งพบประมาณ ร้อยละ 86 ของโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันทั้งหมด มีช่วงอายุของการเกิดโรคกว้างมาก อาจพบได้ในเด็กต่ำกว่า 10 ขวบ และพบบ่อยในผู้ป่วยกลุ่มอายุ 20 – 40 ปี อายุเฉลี่ย 33 ปี มีลักษณะทางคลินิกพบเป็นการบวมหรือการขยายขนาดของขากรรไกรโดยไม่เจ็บปวด รอยโรคเติบโตช้า ๆ จนกระทั่งมีขนาดใหญ่โตมาก ทำให้ใบห้ น้ำผิดปกติ ร้อยละ 80 พบบริเวณขากรรไกรล่าง ซึ่งมักพบบริเวณฟันหลัง ส่วนลักษณะทางภาพรังสี จะพบเป็นเงาดำหลาย ๆ วง (multilocular radiolucent lesion) มักพบมีการขยายขนาดของกระดูกทั้งด้านแก้มและด้านลิ้น อาจพบการละลายของรากฟัน นอกจากนี้อาจพบเป็นลักษณะเงาดำวงเดี่ยว ซึ่งมีลักษณะคล้ายถุงน้ำ แต่ที่ขอบของเงาดำนี้จะพบมีลักษณะเป็นหยัก

2. Unicystic พบประมาณร้อยละ 13 มีลักษณะเป็นถุงน้ำเดี่ยวๆ เกิดขึ้นเองหรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มของถุงน้ำจากที่ไม่เป็นเนื้อเยื่ออกกลายเป็นเยื่อหุ้มที่เป็นโรคเนื้อเยื่ออกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน มักพบในผู้ป่วยอายุน้อย เมื่อเทียบกับ Conventional solid คือร้อยละ 75 พบในกลุ่มอายุ 20 ปี และ 30 ปี ร้อยละ 90 พบในขากรรไกรล่างบริเวณฟันหลัง ไม่มีอาการใดๆ รอยโรคที่มีขนาดใหญ่มักทำให้เกิดการบวมขึ้นโดยไม่ปวด ลักษณะทางภาพรังสีพบเป็นเงาดำวงเดียว



ภาพที่ 2.1 ลักษณะชิ้นเนื้อผู้ป่วยบริเวณกระดูกขากรรไกรที่เป็นโรคเนื้อเยื่ออกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน แบบ Conventional จะพบส่วนที่มีลักษณะเป็น Unicystic ร่วมด้วย
<http://www.oralpatho.dent.chula.ac.th>

โรคนี้สามารถแบ่งตามลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาได้ 4 ชนิด คือ 1.solid 2.unicystic 3.peripheral และ 4.desmoplastic (Modolo *et al.*, 2004) โดยทุกชนิดมีลักษณะร่วมกันคือ มีการรวมกลุ่มของเนื้อเยื่อ ลอยอยู่ในเนื้อเยื่อยึดต่อที่โตเต็มที่แล้ว (mature fibrous tissue) กลุ่มของเนื้อเยื่อจะพบเยื่อที่สานกันไปมาเป็นร่างแห ชั้นล่างเป็นเซลล์ cuboidal หรือ columnar เรียงตัวตั้งฉากกับฐาน (basement membrane) ซึ่งเซลล์ในกลุ่มนี้ก็คือ ameloblast หรือ preameloblast-like cells เซลล์ชั้นในเป็นเซลล์รูป stellate อยู่กันอย่างหลวมๆ บางครั้งจะพบ การเกิดถุงน้ำ (cystic degeneration) ในชั้นด้านใน (ภาพที่ 2.2) ซึ่งเกิดจากการเสื่อมสลายของเซลล์ใน stellate reticulum ซึ่งลักษณะที่แตกต่างกันทางจุลพยาธิวิทยาของทั้ง 4 ชนิด ไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิก การเกิดเป็นซ้ำ และการพยากรณ์โรค



ภาพที่ 2.2 ลักษณะเนื้อเยื่อเซลล์ชั้นในเป็นเซลล์รูป stellate อยู่กันอย่างหลวมๆ บางครั้งเกิดถุงน้ำ (cystic degeneration)

<http://www.oralpatho.dent.chula.ac.th>

อาการของโรคนี้เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (Philipsen *et al.*, 2001)

1. บริเวณเนื้ออกบวม
2. ไม่มีอาการปวดหรือซาร่วมด้วย
3. มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆอย่างช้าๆ จนกระทั่งสร้างความลำบากในการดำรงชีวิต

การรักษาโรคนี้เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (Reichart *et al.*, 1995)

โรคนี้เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดฟันนั้น จะไม่ตอบสนองต่อการรักษาโดยวิธีเคมีบำบัด และรังสีบำบัด การรักษาผู้ป่วยจึงจำเป็นที่จะต้องใช่วิธีการทำศัลยกรรมอย่างกว้างโดยวิธีเดียว ซึ่งมีทั้ง

1. การขูดออก
2. การควักออก
3. การตัดโดยรวมขอบเขตของกระดูกรอบๆเนื้ออก
4. การตัดกระดูกขากรรไกรออกบางส่วน หรือการตัดกระดูกขากรรไกรออกครึ่งหนึ่ง

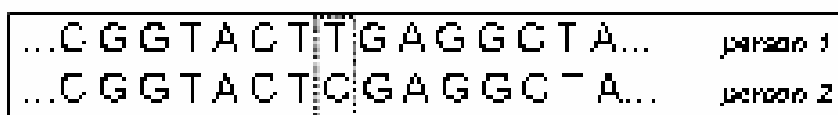
หลังจากที่ผู้ป่วยทำศัลยกรรมแล้วจะมีความทุกข์ทรมานเนื่องจากมีความพิการของใบหน้าเกิดขึ้น ต้องได้รับการบูรณะด้วยวิธีการทำฟัน ขากรรไกร และใบหน้าเทียม การบำบัดรักษาโรคนี้ทำให้ผู้ป่วยสูญเสียเวลาและทรัพย์สินในการรักษา เกิดเป็นภาระทางเศรษฐกิจต่อครอบครัวและประเทศโดยรวม ซึ่งวิธีการรักษาเหล่านี้ก็ยังมีพบว่าการกลับมาเป็นโรคซ้ำร้อยละ 50-70 (Ghandhi *et al.*, 2006) ดังนั้นการติดตามผู้ป่วยในระยะยาวมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคเนื้องอกจากเซลล์ต้นกำเนิดพัน (Kitkumthorn *et al.*, 2010)

การบ่งบอกถึงสาเหตุที่แน่นอนยากที่จะบอกว่าเกิดขึ้นจากสาเหตุใด อาจเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมหรือปัจจัยทางพันธุกรรมเนื่องจากการศึกษาในระดับโมเลกุลของเซลล์เนื้องอกชนิดนี้ก็ยังไม่มี การศึกษาอย่างแพร่หลาย การศึกษาที่มีอยู่ข้อมูลที่ได้ก็ยังไม่ค่อยมากและไม่สมบูรณ์ สำหรับกลไกการเกิดเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการศึกษาหาข้อมูลของเนื้องอกชนิดนี้ในระดับโมเลกุล จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ที่ต้องมี การศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม แต่จากการศึกษาที่มีอยู่อาจจะ บ่งบอกสาเหตุของการเกิดโรคเนื้องอกจากเซลล์ต้นกำเนิดพันที่เกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรมได้แก่

1. ภาวะพหุสัณฐานของยีน (Polymorphisms)

ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดพบว่า มักจะเกิดความหลากหลายของการเปลี่ยนแปลงในสายของดีเอ็นเอ และจากการศึกษาการเกิดการเปลี่ยนแปลงใน genome มนุษย์พบว่า สามารถเกิดได้ทุกๆ 200 นิวคลีโอไทด์ หรือบ่อยกว่า การเกิดการผันแปรในสายดีเอ็นเอนี้ เราเรียกว่า ภาวะพหุสัณฐาน (DNA polymorphisms) ซึ่งภาวะพหุสัณฐานทางพันธุกรรมที่พบในจีโนมมนุษย์ แบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ restriction fragment length polymorphism (RFLP), variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism และ single nucleotide polymorphism (SNP) และการเกิดภาวะพหุสัณฐานของยีนในมนุษย์นั้นมักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงเบสเดียวซึ่งเราเรียกว่า สนิป เป็นความแปรผันทางพันธุกรรมในมนุษย์ประเภทหนึ่งที่พบได้บ่อย โดยทั่วไปแล้ว nucleotide polymorphism จะแสดงออกอย่างน้อย 1% ของมนุษย์ โดย SNP เป็นความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอที่พบเป็นปกติโดยทั่วไปในเส้นสายของดีเอ็นเอ โดยสามารถเกิดได้ทุกๆ 100-300 เบส โดยเป็นความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เบสเพียง 1 ตำแหน่ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในลำดับเบสเพียง 1 ตำแหน่งอาจส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนตลอดจนปริมาณและการทำงานของโปรตีนได้ส่วนผลที่เกิดขึ้นจะมากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับตำแหน่งของสนิบบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเกิดในส่วนที่ไม่มีกรดอะมิโน และเกิดในส่วนที่มีการถอดรหัส (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2548)



ภาพที่ 2.3 แผนภาพแสดงตัวอย่างสนิป จำนวน 1 ตำแหน่ง

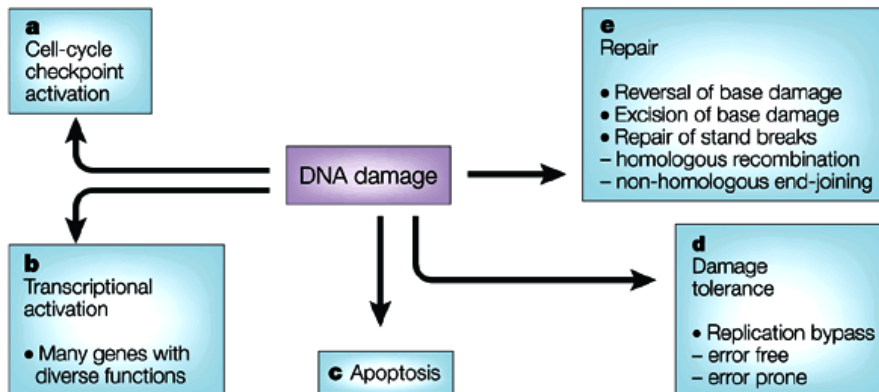
จากการศึกษาของ นครินทร์ กิตกำธร และคณะพบความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัณฐานของยีน *TP53* ตำแหน่ง โคดอน 72 ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (Tumor suppressor gene) ว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (Kitkumthorn *et al.*, 2010) โดยได้ศึกษาลำดับเบสบนยีน *TP53* ที่โคดอน 72 ซึ่งมีขนาด 204 bp จากนั้นใช้ restriction enzyme *BstU1* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์ CGCG เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Arginine *BstU1* สามารถจดจำและตัดได้ทำให้ได้ขนาด 125 และ 79 bp และไม่สามารถจดจำอัลลีลที่เป็น Proline ทำให้ได้ขนาด 204 bp ได้ผลการศึกษารูปแบบความหลากหลายของยีน *TP53* ตำแหน่ง โคดอน 72 SNP analysis of *TP53* codon 72 พบว่ากลุ่มประชากรควบคุมมีจีโนไทป์โฮโมไซกัสโพรลีน (Pro/Pro) มากที่สุด แต่ประชากรผู้ป่วยมีจีโนไทป์เฮเทอโรโรไซกัสโพรลีนและอาร์จินีน (Pro/Arg) แสดงว่ากลุ่มประชากรในประเทศไทยส่วนใหญ่ที่ยีน *TP53* โคดอน 72 แสดงจีโนไทป์โฮโมไซกัสโพรลีน (Pro/Pro) มากที่สุด แต่ในกลุ่มประชากรผู้ป่วยแสดงจีโนไทป์เฮเทอโรโรไซกัสโพรลีนและอาร์จินีน (Pro/Arg) และยังพบว่ากรดอะมิโนอาร์จินีน ใน ยีน *TP53* ตำแหน่งโคดอน 72 มีส่วนสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (ameloblastoma) อาจเนื่อง มาจากกระบวนการควบคุมการแบ่งเซลล์ของโปรตีน P53 เกิดการทำงานผิดปกติไปจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก กรดอะมิโนของโพรลีน เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนของอาร์จินีน ทำให้พบว่า กรดอะมิโนของอาร์จินีน มีผลต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน

ซึ่งเห็นได้ว่าภาวะพหุสัณฐานของยีนนั้นมีผลต่อความเสี่ยงในการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันได้ ดังนั้นยีนที่มีภาวะพหุสัณฐานของยีนสูงจึงเป็นยีนที่น่าสนใจศึกษา

2. กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ

ในชีวิตประจำวันเราสายของดีเอ็นเอมีการแตกหักเนื่องมาจากเมแทบอลิซึมภายในเซลล์หรือจากปัจจัยภายนอก โดยการแตกหักนี้ ส่งผลต่อการดำรงชีวิตของ เซลล์ไม่ว่าจะเป็นการปิดการแสดงออกของยีนในบริเวณที่เกิดการแตกหัก เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น เกิดการตัดต่อของโครโมโซมขึ้นเช่นการเกิด Translocation, Aneuploidy, Loss of chromosome arm และเมื่อเซลล์เกิดการแบ่งตัวให้เซลล์ในรุ่นถัดไปลักษณะที่ผิดปกตินี้จะถูกถ่ายทอดไปเร็ว อยๆ ในปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ ส่งผลอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตได้ (Williams *et al.* , 2007) โดยหากเซลล์นั้นไม่สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอที่แตกหักได้เซลล์นั้นจะเข้าสู่ภาวะที่เรียกว่า Cellular senescence (Chen *et al.* , 2007) ซึ่งเซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้อีกต่อไป (เป็นการยับยั้งไม่ให้ผลิตเซลล์รุ่นถัดไปที่ผิดปกติ) หรือเกิดการฆ่าตัวตายของเซลล์โดยกระบวนการ Apoptosis (เป็นการยอมสละตัวเองเพื่อรักษาส่วนใหญ่ไว้) หรือในกรณีที่เลวร้ายเซลล์ที่มีดีเอ็นเอแตกหักที่ยังซ่อมแซมไม่สำเร็จสามารถ ผลิตเซลล์รุ่นถัดไปได้เรื่อยๆ จะทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอเช่นการเกิดโรค

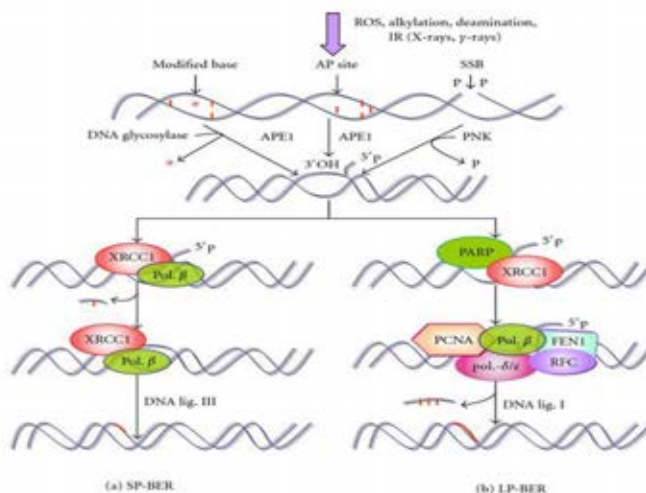
ต่างๆ รวมไปถึง การเกิดมะเร็ง กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอที่แตกหักมีหลายกระบวนการตามลักษณะของการแตกหักของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยสามารถแบ่งการแตกหักเป็นสองกลุ่มหลักๆ คือ



ภาพที่ 2.4 กระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นหลังจากที่ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย
<http://www.nature.com>

1. Single strand damage ไม่ซับซ้อนและสามารถแก้ไขดีเอ็นเอได้ค่อนข้างสมบูรณ์ ซึ่งมีสามวิธีคือ (Yeganeh and Jocelyn., 2006)

1.1 Base excision repair ซึ่งจะมีการนำนิวคลีโอไทด์ที่อยู่รอบๆ จุดผิดปกตินั้นออกไปทั้งก่อนโดยเอนไซม์ DNA Glycosylase แล้วจึงเติมบริเวณที่ว่างโดย DNA polymerase และ DNA ligase



ภาพที่ 2.5 กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบ Base excision repair
<http://www.sage-hindawi.com>

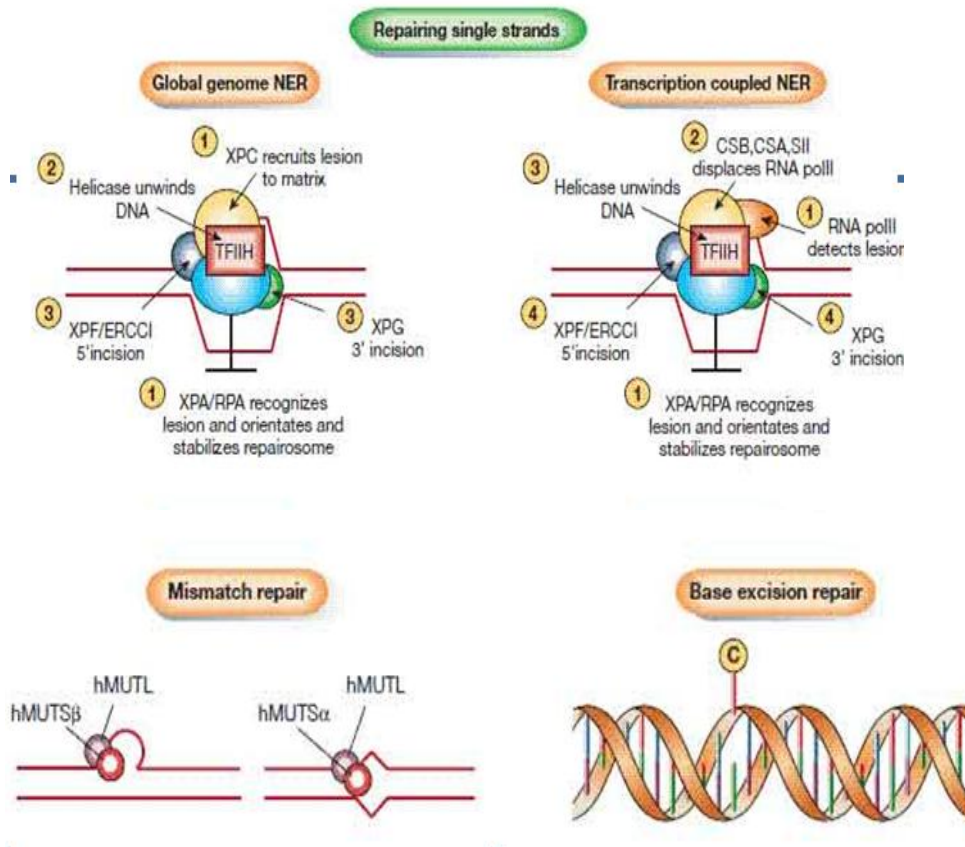
1.2 Nucleotide excision repair ที่มีลักษณะการทำงานคล้ายๆกับ Base excision repair แต่จะเกิดเมื่อสายดีเอ็นเอมีการบิดหรือการจัดตัวที่ผิดปกติเช่นการได้รับรังสียูวี ตัดเบสที่มีความผิดปกติมากกว่า เช่น T=T dimers หรือ เบส ที่มี side group ขนาดใหญ่

มีขั้นตอนดังนี้

- 1) Excision nuclease (Exonuclease) ตัด oligonucleotide (12 mers) บริเวณที่พบเบสที่เสียหายออก
- 2) DNA polymerase I เติมเบสที่ถูกตัดลงในสายดีเอ็นเอ
- 3) DNA ligase จะเชื่อมต่อบเบสใหม่ที่ถูกตัดกับสายดีเอ็นเอ

1.3 Mismatch repair หรือ MMR เป็นกระบวนการที่สำคัญมากเพราะเป็นกระบวนการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เข้าคู่กัน (Proof-reading) เช่น หลังการเกิด DNA replication เป็นต้น การเกิดดีเอ็นเอแตกหักแบบ Single strand damage นี้ไม่ค่อยมีปัญหาในคนปกติที่ไม่มีความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอ เนื่องจากว่ามีต้นแบบให้ลอกอยู่ติดกัน (อยู่บนโครมาทินเส้นเดียวกัน) Mismatch เกิดระหว่าง replication เมื่อ

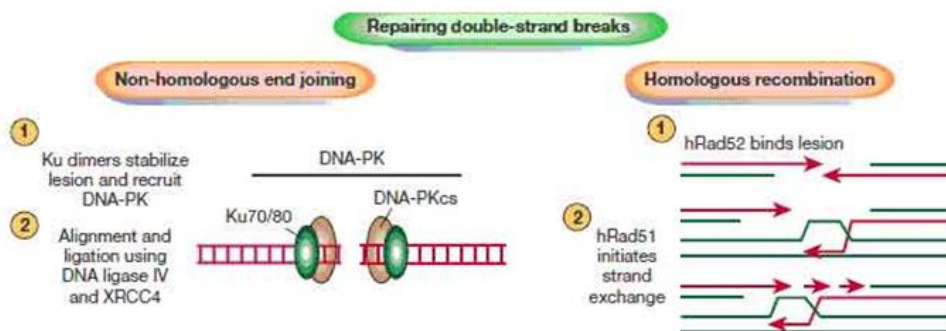
- 1) ใส่เบสผิด
- 2) เกิดการขัดข้องในการ proofreading system จึงต้องมีการซ่อมแซมหลังการ replication เช่น T = G ซึ่งจะได้สายดีเอ็นเอต้นแบบที่มีเบสปกติ
- 3) ส่วนสายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่จะมี mismatched base
- 4) เซลล์จะใช้แบบของ methylation ของ base ในสายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่ เป็นเครื่องบอกความแตกต่างว่า T หรือ G ถูก



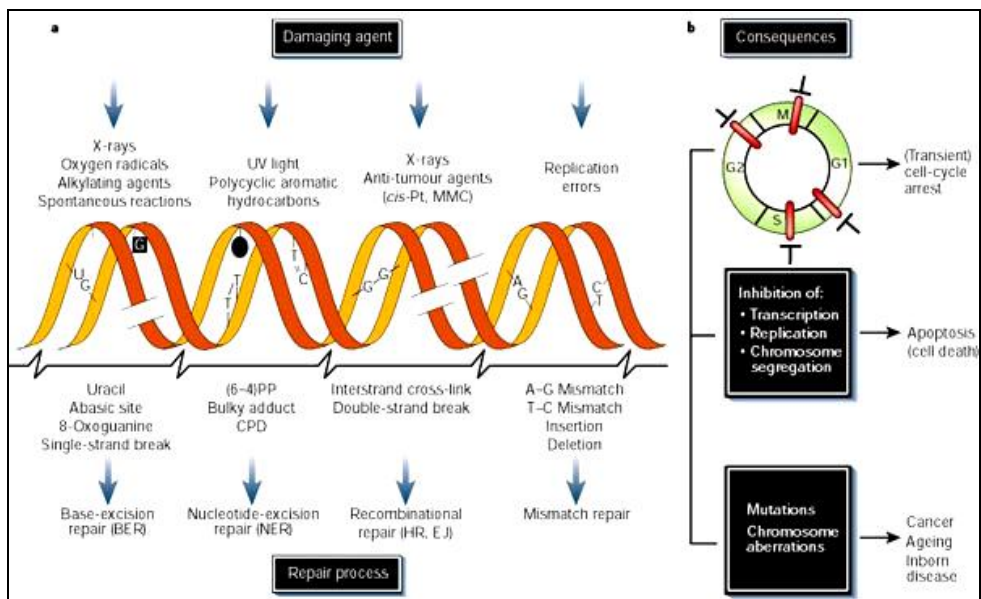
ภาพที่ 2.6 ภาพกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบ Single-strand break (SSB) repair <http://www.nature.com>

2. Double strand break เป็นการซ่อมที่ซับซ้อนกว่ามากเนื่องจากการขาดของดีเอ็นเอทั้งเส้นโครมาทิน

มีสองกระบวนการหลักๆ คือ Homologous recombination (HR) และ Non-homologous end joining (NHEJ) โดยทั้งสองกระบวนการนี้มีลักษณะการซ่อมแซมที่ค่อนข้างจำเพาะและเกิดในคนละช่วงของ Cell cycle



ภาพที่ 2.7 ภาพกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบ Double-strand break (DSB) repair <http://www.nature.com>



ภาพที่ 2.8 สรุปสาเหตุความเสียหายของดีเอ็นเอ, กระบวนการซ่อมแซมและหน้าที่ของเซลล์ <http://www.nature.com>

ดังนั้นหากเซลล์นั้นไม่สามารถซ่อมแซมดีเอ็นเอ ได้หรือทำงานได้บกพร่องก็จะ ก่อให้เกิด ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆ ได้ และหากยีนที่ทำหน้าที่อยู่ในกระบวนการ ซ่อมแซมดีเอ็นเอ ไม่สามารถทำงานได้หรือทำงานได้น้อยลงก็จะส่งผลหรือมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้เช่นกัน

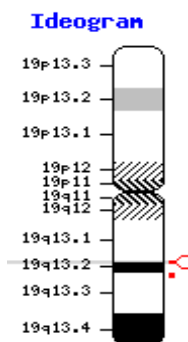
ยีนที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งนี้

จากการศึกษาค้นคว้าเอกสาร งานวิจัย (review literature) พบว่าบริเวณยีน *XRCC1* โคดอน 194 280 และ 399 นั้นส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ในหลายๆ โรค เช่น มะเร็ง เต้านม (Zhang *et al.*, 2006) มะเร็งปอด (Ratnasinghe *et al.*, 2001) มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Stern *et al.*, 2001) ฯลฯ ดังนั้นจึงตั้งสมมุติฐานว่า การเกิดภาวะพหุสัญญาณในยีน *XRCC1* บริเวณ โคดอน 194 280 และ 399 น่าจะส่งผลทำให้เกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (ameloblastoma)

ยีน *XRCC1*

XRCC1 หรือ X-ray repair cross complementing group 1 มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 19q13.2 ทั้งหมด 17 exons ความยาวประมาณ 31.9 kb. และสามารถถอดรหัสกรดอะมิโนได้ทั้งสิ้น 633 amino acid ประกอบด้วย 2 กลุ่มของครอบครัวโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการ (BRCT domains) เป็นยีนที่พบว่ามี ภาวะพหุสัญญาณ สูงมาก โดยเฉพาะตำแหน่งโคดอนที่ 194 280 และ 399 ซึ่งเป็นบริเวณ evolutionarily conserved (Ratnasinghe *et al.*, 2001) และมี

รายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปอดในประชากรชาวจีน มะเร็งเต้านมในประชากรชาวไออร์แลนด์ และมะเร็ง กระเพาะปัสสาวะ ในประชากร ชาวสหรัฐอเมริกา รวมถึงมีการศึกษาใน *XRCC1* ในโรค มะเร็งเต้านม มะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็ก และมะเร็งในช่องปากในประชากรชาวไทย (Pakakasama *et al.*, 2007 ; Sangrajrang *et al.*, 2008 ; Kietthubthew *et al.*, 2006)



ภาพที่ 2.9 ภาพจำลองโครโมโซมยีน *XRCC1* MIM *194360

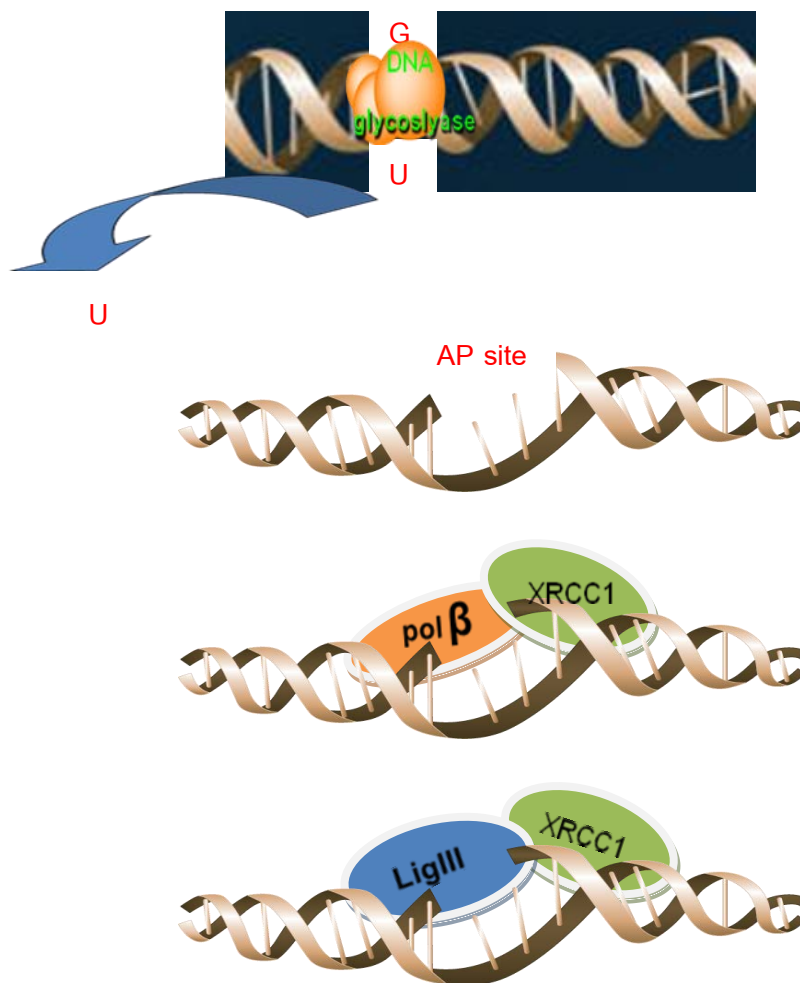
<http://www.genecards.org>

ยีน *XRCC1* ทำหน้าที่เป็นยีนที่อยู่ในกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอในกระบวนการ Base excision repair (BER) ที่เกิดจากรังสีที่ทำให้เกิดไอออไนเซชัน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมาและรังสีคอสมิก และสารเคมีที่เติมหมู่แอลคิล (Alkylating Agent) (Zhang *et al.*, 2006) คอยตรวจเช็คและแก้ไขความผิดปกติของ DNA strand-break repair และในช่วงของการแลกเปลี่ยนซิสเทอโครมาทิด มีหน้าที่ภายในกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ Base excision repair โดยการทำงานร่วมกับโปรตีนตัวอื่นๆ เป็น scaffold protein ซึ่งมีกระบวนการดังต่อไปนี้

ยกตัวอย่าง เมื่อดีเอ็นเอเกิดความผิดปกติ เช่น เกิดดีอะมิเนชันของไซโตซีน เปลี่ยนจากเบส C เป็นเบส U ก็จะมีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอดังนี้

1. DNA glycosylase จะเข้าเกาะบริเวณเบส U เพื่อตัดพันธะ Glycosidic Bond (Sugar-Base) ทำให้เกิดเป็นตำแหน่ง AP site
2. ตำแหน่ง AP site นี้ก็จะถูกตรวจพบโดย AP endonuclease (APE1) human apurinic/apyrimidinic endonuclease ซึ่งจะทำงานร่วมกับ phospho diesterase เพื่อตัดกลุ่มน้ำตาล-ฟอสเฟต ตรงที่ไม่มีเบสออก
3. *XRCC1* ก็จะเข้าทำงานร่วมกับ DNA Pol β เพื่อเติมเบสที่ถูกตัดออกในสายดีเอ็นเอ ในที่นี้คือเบส C

4. หลังจากนั้น จะเชื่อม 2 nucleotides ด้วย DNA ligase III ซึ่งทำงานร่วมกับ XRCC1 การซ่อมแซมดีเอ็นเอเสิร์จสมบูรณ (Matsumoto and Kyung, 1995)



ภาพที่ 2.10 กระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอในกระบวนการ Base excision repair (BER) โดยมี XRCC1 ทำงานร่วมกับโปรตีนตัวอื่นๆ เป็น scaffold protein

เทคนิคที่จะช่วยในการวิเคราะห์ภาวะพหุสัณฐานของยีน XRCC1

ในการวิเคราะห์ภาวะพหุสัณฐานของยีน XRCC1 นั้นเราเลือกใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยการศึกษาความยาวของท่อน DNA หลังการตัดโดย Restriction enzyme เพื่อใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรมหรือโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากกลายพันธุ์ (Mutation) หรือเกิดภาวะพหุสัณฐาน ซึ่งสามารถทำให้เกิด Restriction site ใหม่ หรือทำให้ Restriction site เดิมที่มีอยู่แล้วหายไป Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (กนกวรรณ และ วัลัญญา ., 2007)

เป็นวิธีที่ใช้หลักการของ sequence polymorphism ซึ่งเกิดขึ้นในยีนของคน (และในยีนของสิ่งที่มีชีวิตอื่นเช่นกัน) คือ ในบางครั้ง ภาวะพหุสัณฐาน หรือ การกลายพันธุ์ ที่เกิดขึ้นใน genome นั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อ restriction site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ เช่น เดิมยีนในตำแหน่งนี้ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนี้ได้ แต่เมื่อเกิดมี ภาวะพหุสัณฐาน หรือ การกลายพันธุ์ ขึ้น อาจทำให้ยีนในบริเวณดังกล่าวสามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันนี้ได้ หรืออาจจะเกิดขึ้นในทางกลับกันคือ เดิมยีนส่วนนี้อาจถูกตัดด้วยเอนไซม์นี้ได้ แต่เมื่อเกิดมี การกลายพันธุ์ ขึ้น ทำให้ไม่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัวเดิมได้ เป็นต้น จากลักษณะนี้เอง ทำให้สาย DNA ของยีนที่สกัดจากคนที่ส่วนนี้ถูกเอนไซม์ตัดได้ จะมีขนาดเล็กกว่าสาย DNA ของยีนเดียวกันที่สกัดจากคนที่มีส่วนนี้ที่ไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้ได้ ความแตกต่างในความยาวของสาย DNA ชนิดเดียวกันที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันที่เรียกว่า RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เกิดขึ้นเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสบางเบสในสาย DNA นี้ ดังนั้นเมื่อนำ DNA ส่วนนั้นมาทำการย่อยด้วย restriction enzyme ก็จะทำให้รูปแบบที่ต่างกัน ในบางครั้ง ภาวะพหุสัณฐาน หรือ การกลายพันธุ์ ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรค อาจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ ทำให้เราสามารถนำเทคนิคนี้มาช่วยในการตรวจหาภาวะพหุสัณฐานที่ทำให้เกิดโรคชนิดนั้นๆ ได้

ลักษณะการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถแบ่งออกเป็นลักษณะต่างๆ ดังนี้ (กนกวรรณ และ วรรณญา ., 2007)

1. ปลายเหนียว (overhang) คือ ปลายสาย DNA ที่ถูกตัดจะมีสายใดสายหนึ่งยาวกว่าอีกสายหนึ่ง ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ ดังนี้

- สาย DNA ที่ได้มีปลาย 5' ที่ยาวกว่าปลาย 3' เรียกว่า 5' overhangs
- สาย DNA ที่ได้มีปลาย 3' ที่ยาวกว่าปลาย 5' เรียกว่า 3' overhangs

2. ปลายทู่ (blunt end) ปลายสาย DNA ที่ถูกตัดจะมีความยาวเท่ากัน

กรณีลำดับของนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองสายที่ถูกตัด จะสามารถอ่านลำดับเบสได้เหมือนกัน คือ เมื่อเริ่มอ่านลำดับเบสจากซ้ายไปขวาในสายหนึ่ง หรือจากขวาไปซ้ายในอีกสายหนึ่งจะมีลำดับเบสเหมือนกัน เรียกกรณีเช่นนี้ว่า พาลินโดรม (palindrome)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติในภาวะพหุสัญญาณของยีน XRCC1

1. odds ratios (Yanatatsaneejit *et al.*, 2010) เป็นการคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัวที่แต่ละตัวแปรจัดกลุ่มที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกรณีหรือไม่มีปัจจัยที่เราสงสัย จะเสี่ยงต่อการเกิดโรคน้อยเพียงใด ซึ่งค่า odds ratios ที่ได้สามารถแปลความหมายได้ดังนี้

= 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา นั้นไม่สัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยง

> 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา นั้นสัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยงเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่ป่วย

< 1 การมีปัจจัยเสี่ยงนั้น ทำให้ไม่เกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา

และทุกครั้งที่ได้ศึกษาค่า odds ratios จะนำมาทำการศึกษาแค่ครั้งเดียว ดังนั้นจึงต้องรายงานค่าเป็นช่วง ซึ่งที่นิยมกันคือ 95% confident intervals (95% CI) ซึ่งค่า 95% CI ต้องมีค่าไม่อยู่ในระหว่างค่า 1 และค่า P value < 0.05 จึงถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

2. การวิเคราะห์ Haplotype analysis (Ingorn Kimkong, 2008) ผ่านโปรแกรม plink version PLINK v1.07 เพื่อหาความสัมพันธ์ของ

1. Allelic association test
2. Model of inheritance analysis
3. Conditional analysis of SNP
4. Haplotype analysis

เพื่อวิเคราะห์ว่าภาวะพหุสัญญาณของยีน XRCC1 ในตำแหน่งโคดอนที่ 194 280 และ 399 นั้นแต่ละสปีปมีความสัมพันธ์ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคหรือไม่ และในแต่ละสปีปมีรูปแบบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแบบใด รวมถึงหากมีการนำสปีปบางไปแล้วยังมีผลทำให้ความเสี่ยงในการเกิดโรคน้อยลงหรือไม่

Somatic cell mutation

หมายถึง การกลายของเซลล์ร่างกาย ไม่เกี่ยวข้องกับเซลล์สืบพันธุ์ จึงไม่มีการถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานรุ่นหลังๆ แต่ก็มีความสำคัญเนื่องจากเซลล์ร่างกายมนุษย์ส่วนใหญ่เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส โดยเริ่มต้นจากไซโกต 1 เซลล์ และตลอดเวลาที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ย่อมมีโอกาสเกิดการกลายในเซลล์ร่างกายได้ (ธัญภักดิ์ สังฆมานนท์, 2545)

ในการตรวจสอบว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษานั้นว่าเป็นภาวะพหุสัญญาณไม่ใช่ การ กลายของ เซลล์ร่างกาย โดยทำการวัด ความเข้มข้น ในตัวอย่าง ผู้ป่วยที่มีอัลลีลแบบเฮเทโรไซกัส หลังจากนั้นใช้ค่า Coefficient of variation (%CV) เป็นค่าที่ใช้วัดการกระจายสัมพัทธ์ของข้อมูล จากการวัด ความเข้มข้น เพื่อเปรียบเทียบการกระจายของข้อมูลตั้งแต่สองชุดขึ้นไป คำนวณจากอัตราส่วน ระหว่าง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน กับมัชฌิมเลขคณิต และคูณด้วย 100 เพื่อให้เป็นค่าร้อยละ คำนวณจากสูตร ดังนี้

วิธีคำนวณ Coefficient of variation (%CV)

$$CV = (SD / \bar{x}) \times 100$$

เมื่อ

SD คือ ส่วนเบี่ยงเบน

\bar{x} คือ มัชฌิมเลขคณิต

ค่า Coefficient of variation ต้องมีค่าไม่เกิน 10 จึงสรุปได้ว่าข้อมูลที่เราสอนใจนั้นไม่มีการกระจาย ตัวของข้อมูลมาก (Yanatatsaneejit *et al.*, 2010)

บทที่ 3 วิธีการศึกษา

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาภาวะพหุสัญญาณของยีน *XRCC1* โดยการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งอาศัยรูปแบบการตัดบริเวณจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดมาใช้ในการศึกษาภาวะพหุสัญญาณของยีน *XRCC1* ที่ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399 ในรอยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันของผู้ป่วยชาวไทยที่ได้รับการวินิจฉัยโดยทันตพยาธิแพทย์ว่าเป็นโรคนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542-2551 จำนวน 100 คน จากบล็อกรื้อฟื้นเนื้อผู้ป่วย และในคนปกติจำนวน 150 คน โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1. ประชากรทดลอง

1. ประชากรกลุ่มผู้ป่วยเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน จากบล็อกรื้อฟื้นเนื้อซึ่งได้รับการวินิจฉัยโดยทันตพยาธิแพทย์ว่าเป็นโรคนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542-2551 จำนวน 100 คนซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. ประชากรกลุ่มคนที่ไม่ป่วยเป็นโรคนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน จากการเก็บตัวอย่างเลือด จำนวน 150 คน ซึ่งได้เขียนขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม

2. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. ชุดสกัด DNA
QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN, Germany)
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด DNA
 - ถังมือยาง
 - ถาดหลุมวางหลอด eppendorf
 - ไมโครปิเปตต์ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - ทิปไมโครปิเปตต์ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - หลอด eppendorf ขนาด 100 ไมโครลิตร 250 ไมโครลิตร และ 1000 ไมโครลิตร
 - เครื่อง Centrifuge
 - เครื่อง Vortex
 - เครื่อง Thermal cycle

- เครื่อง Spectrophotometer
 - ตู้ดูดอากาศระดับ 2
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาภาวะพหุฐานของยีน *XRCC1* โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP
- ถังมี้อย่าง
 - ไมโครปิเปตต์ขนาด 2.5, 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - ทิปไมโครปิเปตต์ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - ถาดหลุมวางหลอด eppendorf
 - หลอด eppendorf ขนาด 100 ไมโครลิตร
 - เครื่อง Centrifuge
 - เครื่อง Vortex
 - เครื่องปลอดเชื้อสำหรับทำ PCR
 - ตำแหน่งโคดอน 194 ใช้เอนไซม์ *PvuII*
 - ตำแหน่งโคดอน 280 ใช้เอนไซม์ *RsaI*
 - ตำแหน่งโคดอน 399 ใช้เอนไซม์ *MspI*
 - ตู้อบอุณหภูมิ 37° องศา
4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis
- ชุดเครื่องมือสำหรับทำ Agarose gel electrophoresis
 - ขวดรูปชมพู่
 - ผง Agarose
 - เครื่องชั่งน้ำหนัก
 - ถาดพลาสติก
 - Ethidium Bromide (EtBr) and dyes
 - เครื่อง UV illumination
5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR-RFLP
- 10x Taq polymerase buffer
 - dNTP
 - Primer
 - Unit Taq DNA polymerase
 - Q-Solution
 - dH₂O
 - buffer NEB

- restriction enzyme *PvuII* , *RsaI* และ *MspI*

3. วิธีการทดลอง

1. ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

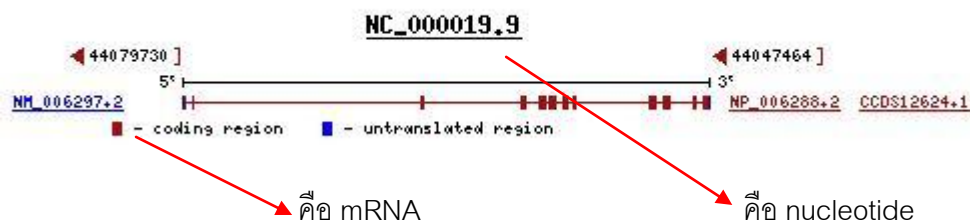
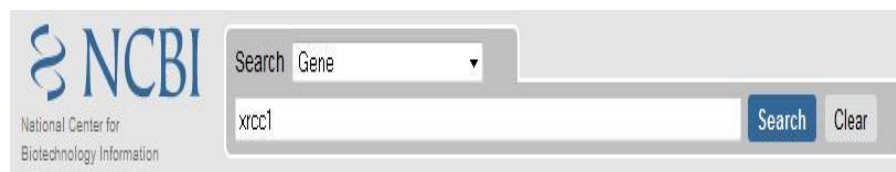
1.1 ศึกษาลำดับเบสบนยีน *XRCC1* ที่ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399

เลือกเข้า 2 เว็บไซต์เป็นหลัก คือ www.NCBI.nih.gov และ www.ensemble.org ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

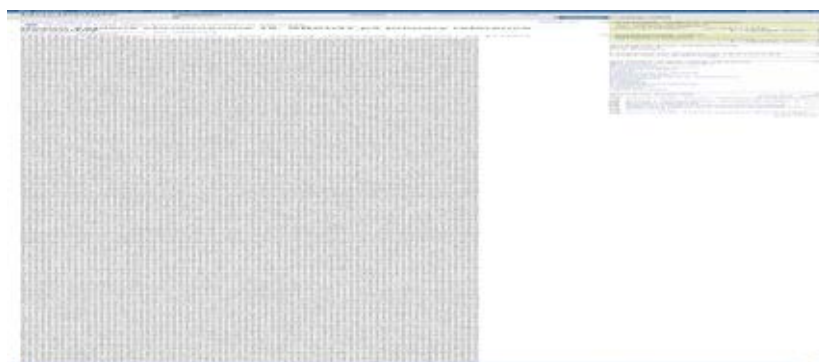
เว็บไซต์ที่ 1 NCBI (www.NCBI.NIH.GOV)

1. เลือก search Gene หรือ Nucleotide

ตัวอย่าง Search Gene --> *XRCC1* --> เลือกที่เป็น *Homo sapiens*



เปิดทั้ง NM_00629+2 ซึ่งแสดงถึง mRNA และ NC_000019+9 ซึ่งแสดงถึงนิวคลีโอไทด์ มาเทียบคู่กัน จะทำให้ทราบว่า ตำแหน่งใด เป็น intron และ exon



ภาพที่ 3.1 ภาพแสดงลำดับเบสของ nucleotide



ภาพที่ 3.2 ภาพแสดงลำดับเบสของ mRNA

เว็บไซต์ที่2 ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>)

1. Search Human --> XRCC1 --> คลิกหา Gene

Search: for

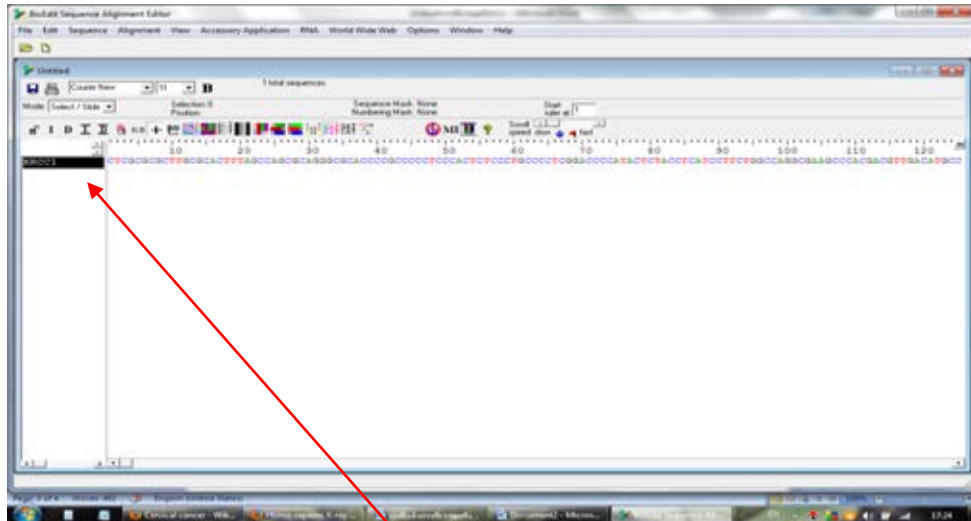
e.g. human gene BRCA2 or rat X:100000..200000 or coronary heart disease

By Feature type
Total
▶ Domain
▶ Family
▼ Gene
Homo sapiens (2)
▶ SNP

Show/hide columns			
Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID
XRCC1-201	ENST00000262887	2102	ENSP00000262887
XRCC1-202	ENST00000458471	1944	ENSP0000039471

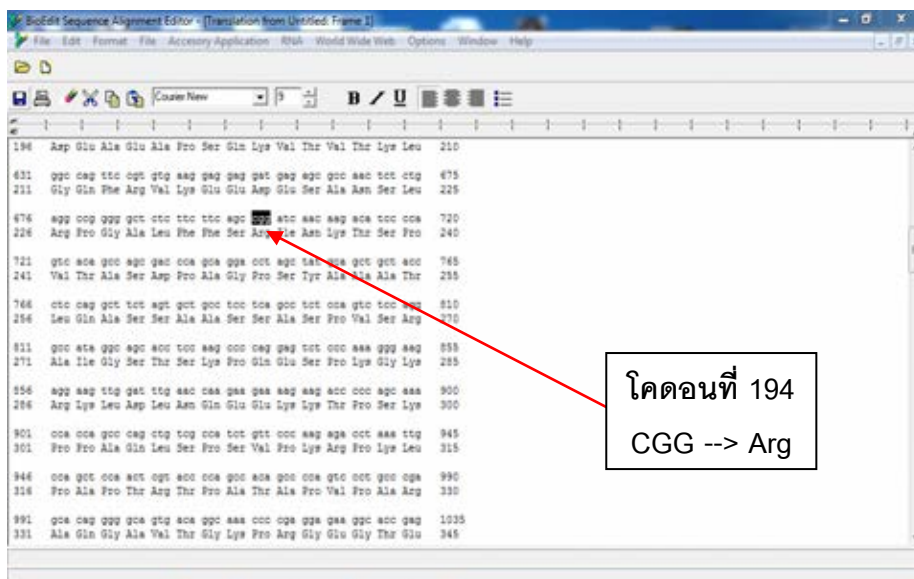
2. กดเลือก Length (bp) ยาว คือ 2102 (เนื่องจากถ้าเลือกความยาวสั้นอาจจะได้ลำดับเบสที่เราต้องการทั้งหมด) --> คลิกเข้าไปแล้วเลือก Exons ทางด้านซ้ายของเว็บไซต์

Transcript-based displays	
[-]	Transcript summary
[-]	Supporting evidence (15)
[-]	Sequence
[-]	Exons (17)
[-]	cDNA
[-]	Protein
[-]	External References
[-]	General identifiers (37)
[-]	Oligo probes (21)



--> กด ที่ชื่อ XRCC1 ให้เป็นแถบดำดังภาพ

--> คลิก Sequence --> Nucleic Acid --> Translate --> Frame 1



จะได้ดังรูปที่แสดงผลการ Translate protein ของแต่ละโคดอน ซึ่งต้องหาโคดอน แรก Met ก่อนว่าอยู่ตรงไหนแล้ว ก็ให้นับตัวนั้นเป็นตัวแรกจนกระทั่งถึงโคดอนที่เราสนใจ ยกตัวอย่างเช่น สนใจโคดอนที่ 194 ซึ่งเป็นเบส CGG

4.นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณที่ครอบคลุม CGG ซึ่งเป็นโคดอนที่ 194 ไปเทียบกับ Genomic DNA (nucleotide) ที่เราหาในต้นต้นว่าโคดอนที่เราสนใจอยู่ตำแหน่งใด จากนั้นจึงทำการออกแบบไพรเมอร์

โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสของยีน *XRCC1* ที่ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399

ตำแหน่งโคดอน 194

Forward primer AGAAGGTGACAGTGACCAAG

Reverse primer ACGTTGTCCGAGCTCACCT

ตำแหน่งโคดอน 280

Forward primer TTGACCCCCAGTGGTGCT

Reverse primer TGCCTTCTCCTCGGGGTTT

ตำแหน่งโคดอน 399

Forward primer CCCCAAGTACAGCCAGGTC

Reverse primer CCCAGCACAGGATAAGGAGC

1.3 ศึกษาวิธี PCR-RFLP

2. การเลือกกลุ่มประชากรที่ศึกษา

2.1 คัดเลือกตัวอย่างเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพินจากบล็อกชิ้นเนื้อผู้ป่วยซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ที่โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและได้รับการวินิจฉัยโดยทันตพยาธิแพทย์ว่าเป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพิน ตั้งแต่ ปี พ .ศ. 2542- 2551 จำนวน 100 คน

2.2 คัดเลือกประชากรกลุ่มควบคุมจากผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพินจำนวน 150 คนโดยคัดเลือกกลุ่มประชากรควบคุม ที่มีอายุ เพศ และเชื้อชาติใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย ซึ่งมาจากแบบสอบถามในการเขียนขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม

3. เขียนขออนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรม

จากคณะกรรมการบริหารการดำเนินงานพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และการใช้สัตว์ทดลองในการวิจัย กลุ่มวิทยาศาสตร์สุขภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการอนุมัติเป็นสัญญาเลขที่

4. การเก็บตัวอย่าง

4.1 คัดเลือกบล็อกชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่เป็นโรคนีื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพันซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ที่โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยชิ้นเนื้อมีความหนา 10 μm นำเนื้อเยื่อที่ได้จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่เป็นโรคนีื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพัน ได้ถูกนำมาสกัด ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด ชุดสกัด DNA QIAamp® DNA FFPE Tissue ซึ่งเป็นชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอสำหรับชิ้นเนื้อที่อยู่ใน Paraffin โดยเฉพาะ

4.2 การเก็บตัวอย่างเลือดในกลุ่มควบคุม เก็บตัวอย่าง peripheral blood lymphocyte ในผู้ป่วยที่มาบริจาคโลหิตจากสภากาชาดไทย ปริมาณ 10 มล. นำมาสกัด ดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี phenol chloroform หลังจากนั้นนำมาวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร

5. ทำการศึกษาภาวะพหุฐานฐานของยีน *XRCC1* (SNP analysis of *XRCC1* codons 194 280 and 399) โดยวิธี PCR- RFLP

5.1 เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการโดย ออกแบบไพรเมอร์ ครอบคลุมตำแหน่งของยีน *XRCC1* ที่ ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399 ตามลำดับ

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบไปด้วยสารละลายทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย

1) 10x <i>Taq</i> polymerase buffer	1	μl
2) dNTP	0.2	μl
3) Primer (F, R)	0.2	μl
4) Unit <i>Taq</i> DNA polymerase	0.1	μl
5) Q-Solution	0.5	μl
6) dH ₂ O	6.8	μl
7) DNA	1	μl

PCR Cycle Condition ตั้งค่าตามลำดับ ดังนี้

Initial denaturation	95°C	15 นาที
----------------------	------	---------

จากนั้นตามด้วย 40 รอบของสามปฏิกิริยา คือ

1) Denaturation	95°C	40 วินาที
-----------------	------	-----------

2) Annealing	59°C	40 วินาที
--------------	------	-----------

3) Extension	72°C	40 วินาที
--------------	------	-----------

และสุดท้ายตามด้วยปฏิกิริยา

Final extension	72°C	7 นาที
-----------------	------	--------

5.2 ใช้ restriction enzyme ในการตรวจหา SNP ซึ่งอาศัยรูปแบบการตัดบริเวณจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดมาใช้ในการศึกษาภาวะพหุสัณฐานของยีน XRCC1 ที่ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399

ในปฏิกิริยา การตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ประกอบไปด้วยสารละลายทั้งหมด 5 ไมโครลิตร ซึ่งจำแนกได้

1) buffer NEB	1.5	μl
---------------	-----	----

2) restriction enzyme	0.2	μl
-----------------------	-----	----

3) dH ₂ O	3.3	μl
----------------------	-----	----

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-20 ชม.

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399

1. ตำแหน่งโคดอน 194 ใช้ restriction enzyme *PvuII* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์ CAG^{*}CTG เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Tryptophan (minor allele) ซึ่ง *PvuII* สามารถจดจำ และตัดได้ แต่ไม่สามารถจดจำและตัดอัลลีลที่เป็น Arginine (major allele) ได้

2. ตำแหน่งโคดอน 280 ใช้ restriction enzyme *RsaI* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์ GT^{*}AC เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Arginine (major allele) ซึ่ง *RsaI* สามารถจดจำ และตัดได้ แต่ไม่สามารถจดจำและตัดอัลลีลที่เป็น Histidine (minor allele) ได้

3. ตำแหน่งโคดอน 399 ใช้ restriction enzyme *MspI* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์ C^{*}CGG เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Arginine (major allele) ซึ่ง *MspI* สามารถจดจำ และตัดได้ แต่ไม่สามารถจดจำและตัดอัลลีลที่เป็น Glutamine (minor allele) ได้

ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งที่เพิ่มจำนวนของบริเวณที่คร่อมโคดอน 194 ที่เป็น Arginine (major allele)

AGAAGGTGACAGTGACCAAGCTTGGCCAGTTCCGTGTGAAGGAGGAGGATGAGAGC
GCCAACTCTCTGAGGCCGGGGGCTCTCTTCTT **CAG CCG**
GATCAACAAGACATCCCCAGGTGAGCTCGGACAACGT

ภาพที่ 2 แสดงตำแหน่งที่เพิ่มจำนวนของบริเวณที่คร่อมโคดอน 194 ที่เป็น Tryptophan (minor allele)

AGAAGGTGACAGTGACCAAGCTTGGCCAGTTCCGTGTGAAGGAGGAGGATGAGAGC
GCCAACTCTCTGAGGCCGGGGGCTCTCTTCTT **CAG TCG**
GATCAACAAGACATCCCCAGGTGAGCTCGGACAACGT

ภาพที่ 3 แสดงตำแหน่งที่เพิ่มจำนวนของบริเวณที่คร่อมโคดอน 280 ที่เป็น Arginine (major allele)

TTGACCCCCAGTGGTGCTAACCTAATCTACTCTTTGTCTTCTCCAGTGCCAGCTCCAAC
TC **GT AC** CCCCAGCCACAGCCCCAGTCCCTGCCCGAGCACAGGGGGCAGTGACAGGC
AAACCCCGAGGAGAAGGCA

ภาพที่ 4 แสดงตำแหน่งที่เพิ่มจำนวนของบริเวณที่คร่อมโคดอน 280 ที่เป็น Histidine (minor allele)

TTGACCCCCAGTGGTGCTAACCTAATCTACTCTTTGTCTTCTCCAGTGCCAGCTCCAAC
TC **AT AC** CCCCAGCCACAGCCCCAGTCCCTGCCCGAGCACAGGGGGCAGTGACAGGC
AAACCCCGAGGAGAAGGCA

ภาพที่ 5 แสดงตำแหน่งที่เพิ่มจำนวนของบริเวณที่คร่อมโคดอน 399 ที่เป็น Arginine (major allele)

CCCCAAGTACAGCCAGGTCCTAGGCCTGGGAGGCCGCATCGTGCGTAAGGAGTGG
GTGCTGGACTGTCACCGCATGCGTCGGCGGCTGCCCTC **C CCG** AGGTAAGGCC
TCACACGCCGGCCCTGCTCCTTATCCTGTGCTGGG

ภาพที่ 6 แสดงตำแหน่งที่เพิ่มจำนวนของบริเวณที่คร่อมโคดอน 399 ที่เป็น Glutamine (minor allele)

CCCCAAGTACAGCCAGGTCCTAGGCCTGGGAGGCCGCATCGTGCGTAAGGAGTGG
 GTGCTGGACTGTCACCGCATGCGTCGGCGGCTGCCCTC **C CAG** AGGTAAG
 GCCTCACACGCCAGCCCTGCTCCTTATCCTGTGCTGGG

6. จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำให้ PCR ไปวิเคราะห์บน 3% Agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide และแปลผลผ่านเครื่อง UV illumination และอีกส่วนหนึ่งถูกนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยตำแหน่งโคดอน 194 ใช้เอนไซม์ *PvuII* ตำแหน่งโคดอน 280 ใช้เอนไซม์ *RsaI* และตำแหน่งโคดอน 399 ใช้เอนไซม์ *MspI* ในการจดจำตำแหน่งเบสและนำไปวิเคราะห์บน gel electrophoresis อีกครั้งและนำผลที่ได้ไปสรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

3% Agarose gel มีสารประกอบดังนี้

1. Agarose 1.5 g
2. 1X TBE 50 mL
3. ethidium bromide 3 µl.

นำสารประกอบข้างบนเข้าเครื่องไมโครเวฟเพื่อละลาย Agarose gel ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

สำหรับการอ่านผลวิเคราะห์จากการตรวจหา Product เพื่อศึกษาภาวะพหุฐานของ ยีน *XRCC1* ในการศึกษาคั้งนี้ โดยวิธี agarose gel electrophoresis อ่านผลวิเคราะห์ดังนี้

6.1 PCR Product ของยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอน 194 ที่ได้ (ใช้เอนไซม์ *PvuII*)

- ถ้ามี 1 band ที่มีขนาด 131 bp จะรายงานผล Homozygous Arginine
- ถ้ามี 2 band ที่มีขนาด 40 bp และ 91 bp จะรายงานผล Homozygous Tryptophan
- ถ้ามี 3 band ที่มีขนาด 131 bp 40 bp และ 91 bp จะรายงานผลเป็น Heterozygous

6.2 PCR Product ของยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอน 280 ที่ได้ (ใช้เอนไซม์ *RsaI*)

- ถ้ามี 1 band ที่มีขนาด 133 bp จะรายงานผล Homozygous Histidine
- ถ้ามี 2 band ที่มีขนาด 63 bp และ 70 bp จะรายงานผล Homozygous Arginine

- ถ้ามี 3 band ที่มีขนาด 133 bp 63 bp และ 70 bp จะรายงานผลเป็น Heterozygous

6.3 PCR Product ของยีน XRCC1 ตำแหน่งโคดอน 399 ที่ได้ (ใช้เอนไซม์ *MspI*)

- ถ้ามี 1 band ที่มีขนาด 142 bp จะรายงานผล Homozygous Glutamine

- ถ้ามี 2 band ที่มีขนาด 24 bp และ 118 bp จะรายงานผล Homozygous Arginine

- ถ้ามี 3 band ที่มีขนาด 142 bp 24 bp และ 118 bp จะรายงานผลเป็น Heterozygous

7. เลือกตัวอย่างเพื่อทำการ ยืนยันลำดับเบสโดยการ direct sequencing โคดอนละ 12 ตัวอย่าง โดยนำ PCR product ที่ได้มา purify โดยใช้ PCR purification Kits จากบริษัท QIAGEN, Germany จากนั้นจึงส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท แปะซิฟิค ไชเอ็นส์ จำกัด

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัณฐานของยีน XRCC1 ที่ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399 กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและลักษณะทางคลินิกของโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพิน โดยเชื่อมโยงข้อมูลที่ได้เข้าด้วยกันและหาความสัมพันธ์ทางสถิติโดยวิธี chi-square สำหรับการศึกษารisk factorจะเปรียบเทียบรูปแบบของยีน (genotype และ haplotype) ระหว่างประชากรกลุ่มโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพิน กับกลุ่มควบคุม โดยกำหนด p value น้อยกว่า 0.05 จึงจะถือว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังจะศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบความหลากหลายของยีนกับลักษณะทางคลินิกต่างๆ โดยใช้ค่าสถิติดังนี้

4.1 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) จะทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Hardy-Weinberg equilibrium calculator ซึ่งค่า P value > 0.05 จึงถือว่าอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium มี 2 วิธีดังนี้

4.1.1 โดยเข้าโปรแกรมจาก

<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>

วิธีการใช้: กรอกข้อมูลลงในตารางแล้วกด Calculate

Result

$$\chi^2 = 0.23$$

(140 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	72.86	74
Heterozygotes	56.27	54
Rare homozygotes	10.86	12

$$p \text{ allele freq} = 0.72; q \text{ allele freq} = 0.28$$

Solutions for perfect HWE, under a model of ascertainment (+/-) of one group

Group affected	Common Hz	Heterozygotes	Rare Hz	p allele freq	q allele freq
Common Hz	60.75	54	12	0.69	0.31
Heterozygotes	74	59.6	12	0.71	0.29
Rare Hz	74	54	9.85	0.73	0.27

ภาพที่ 3.4 ภาพแสดงผลการคำนวณ Hardy-Weinberg equilibrium

4.1.2 โดยการคำนวณด้วยสูตรการคำนวณ

ใช้สูตรการคำนวณดังนี้

Genotype	Frequency	
CC	74	m1
CT	54	m2
TT	12	m3

C allele frequency	0.72	p	$(2m1+m2)/(2*(m1+m2+m3))$
T allele frequency	0.28	q	$(m2+2m3)/(2*(m1+m2+m3))$
	1.00	p+q	

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

$$p = 0.72$$

$$q = 0.28$$

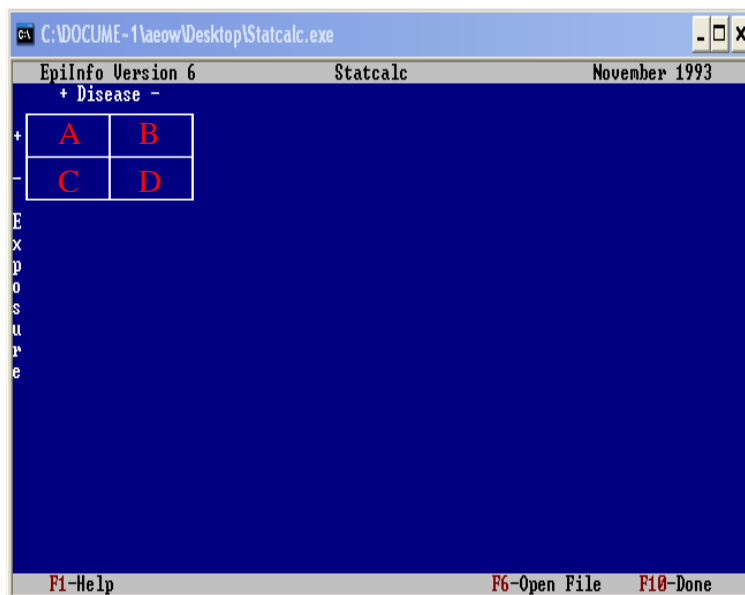
Prob (CC)	0.52	p^2
Prob (CT)	0.40	$2pq$
Prob (TT)	0.08	q^2
	1.000	$p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Genotype	Observed (O)	Expected (E)	Different (O-E)	Chi-square (O-E) ² / E
CC	74	72.80	1.2	0.020
CT	54	56.00	-2.0	0.071
TT	12	11.20	0.8	0.057
total	140	140	0.00	0.148

ภาพที่ 3.5 ภาพตารางแสดง Hardy-Weinberg equilibrium

จากภาพที่ 3.5 ได้ค่า Chi-square เท่ากับ 0.148 และค่า P value > 0.05 จึงถือว่าอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium

4.2 Single SNP-Disease association analyses โดยใช้ contingency tables เพื่อประมาณค่า age และ sex-adjusted odds ratios
contingency tables : Statcalc



- A คือ ความถี่ของอัลลีลที่เป็นปัจจัยเสี่ยง แล้วทำให้เกิดโรค
 B คือ ความถี่ของอัลลีลที่เป็นปัจจัยเสี่ยง แล้วไม่ทำให้เกิดโรค
 C คือ ความถี่ของอัลลีลที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยง แล้วทำให้เกิดโรค
 D คือ ความถี่ของอัลลีลที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยง แล้วไม่ทำให้เกิดโรค

ซึ่งการคำนวณค่า odd ratios นั้นเป็นการคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัวที่แต่ละตัวเป็นตัวแปรจัดกลุ่มที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างการมีหรือไม่มีปัจจัยที่เราสงสัย จะเสี่ยงต่อการเกิดโรคน้อยเพียงใด

ซึ่งค่า odd ratios ที่ได้สามารถแปลความหมายได้ดังนี้

- = 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา นั้นไม่สัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยง
- > 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา นั้นสัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยงเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่ป่วย
- < 1 การมีปัจจัยเสี่ยงนั้น ทำให้ไม่เกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา

และทุกครั้งที่ศึกษาค่า odd ratios ในแง่ปฏิบัติก็มักจะสุ่มมาทำแค่ครั้งเดียว ดังนั้นจึงต้องรายงานค่าเป็นช่วง ซึ่งที่นิยมกันคือ 95% confident intervals (95% CI) ซึ่งค่า 95% CI ต้องไม่ครอบคลุมค่า 1 และค่า P value < 0.05 จึงถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

4.3 Haplotype analysis ผ่านโปรแกรม plink version PLINK v1.07

เพื่อหาความสัมพันธ์ของ 1. Allelic association test

2. Model of inheritance analysis
3. Conditional analysis of SNP
4. Haplotype analysis

4.4 วิเคราะห์ผลเพื่อยืนยันว่าตัวอย่างของคนไข้โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพัน ไม่ได้เกิดจาก Somatic cell mutation โดยใช้ค่า Coefficient of variation (%CV)

Coefficient of variation (%CV) เป็นค่าที่ใช้วัดการกระจายสัมพัทธ์ของข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบการกระจายของข้อมูลตั้งแต่สองชุดขึ้นไป คำนวณจากอัตราส่วนระหว่างส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานกับมัชฌิมเลขคณิต และคูณด้วย 100 เพื่อให้เป็นค่าร้อยละ คำนวณจากสูตรดังนี้

วิธีคำนวณ Coefficient of variation (%CV)

$$CV = (SD / \bar{x}) 100$$

SD คือ ส่วนเบี่ยงเบน

\bar{x} คือ มัชฌิมเลขคณิต

ค่า Coefficient of variation ต้องมีค่าไม่เกิน 10 จึงสรุปได้ว่าข้อมูลที่เราสงสัยนั้นไม่มีการกระจายตัวของข้อมูลมาก (Yanatsaneejit *et al.*, 2010)

ซึ่งในการทดลองเราได้นำ Coefficient of variation มาใช้เพื่อวิเคราะห์ผลเพื่อยืนยันว่าตัวอย่างของคนไข้โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพันที่เรานำมาศึกษานั้นเป็นภาวะพหุสัญญาณจริง ไม่ได้เกิดจาก Somatic cell mutation ซึ่งมีขั้นตอนในการทำดังนี้

1. เลือกตัวอย่างภาพการวิเคราะห์โดยเทคนิค Gel Electrophoresis ในคนไข้โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพัน ที่วิเคราะห์แล้วมีรูปแบบยีนเป็น Heterozygous ทั้ง 3 โครโมโซม
2. นำภาพการวิเคราะห์โดยเทคนิค Gel Electrophoresis ในคนไข้โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพันที่เลือกไว้มาทำการวัดความเข้มของ band โดยใช้โปรแกรมการวัดความเข้มจากเครื่องวิเคราะห์ผลเจล (UV illumination)
3. เมื่อได้ค่าความเข้มของแต่ละ band ในทุกตัวอย่างแล้ว ก็นำค่าที่ได้มาคำนวณหา Coefficient of variation (%CV) ต่อไป

เมื่อค่า Coefficient of variation ที่ได้มีค่าไม่เกิน 10 จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างของคนไข้โรคนี้ของออก
เซลล์ต้นกำเนิดพันธุกรรมที่เรานำมาศึกษานั้นเป็นภาวะพหุสัญญาณจริง ไม่ได้เกิดจาก Somatic cell
mutation

บทที่ 4 ผลการศึกษา

1. ผลการศึกษาค้นคว้า

1.1 ศึกษาลำดับเบสบน ยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอนที่ 194 280 และ 399
ซึ่งยีน *XRCC1* อยู่บนโครโมโซม 19 ตำแหน่ง 13.2 ขนาด 32,267 bp. 633 amino acids

ลำดับเบสบนยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอนที่ 194 ในบริเวณที่สนใจ คือ cgg
agaaggtgacagtgaccaagcttgccagttccgtgtgaaggaggaggatgagagcgccaactctctgaggccgg
gggctctcttctcag[~]ccggatcaacaagacatccccaggtgagctcggacaactg

ลำดับเบสบนยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอนที่ 280 ในบริเวณที่สนใจ คือ cgt
ttgacccccagtggtgctaacctaatctactctttgtctctccagtgccagctccaactcgt[~]acccc
agccacagccccagtcctgccccgagcacagggggcagtgacaggcaaaccgccaggagaaggca

ลำดับเบสบนยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอนที่ 399 ในบริเวณที่สนใจ คือ cgg
ccccaagtacagccaggtcctaggcctgggaggccgcatcgtgcgtaaggagtgggtgctggactgtcaccgcatg
cgtcggcggctgcctcc[~]cggaggtaaggcctcacacgccaaacctgctccttatcctgtgctggg

โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสของยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอนที่ 194, 280 และ 399

ตำแหน่งโคดอน 194

Forward primer 5' AGAAGGTGACAGTGACCAAG 3'

Reverse primer 5' ACGTTGTCCGAGCTCACCT 3'

ตำแหน่งโคดอน 280

Forward primer 5' TTGACCCCCAGTGGTGCT 3'

Reverse primer 5' TGCCTTCTCCTCGGGGTTT 3'

ตำแหน่งโคดอน 399

Forward primer 5' CCCCAAGTACAGCCAGGTC 3'

Reverse primer 5' CCCAGCACAGGATAAGGAG 3'

1.2 เทคนิค PCR-RFLP ซึ่งใช้ restriction enzyme ในการศึกษา ดังนี้

- ตำแหน่งโคดอน 194 ใช้ restriction enzyme *PvuII* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์

CAG[~]CTG เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Tryptophan (TGG) ซึ่งเป็น minor allele ซึ่ง *PvuII* สามารถจดจำ และตัดได้ แต่ไม่สามารถจดจำและตัดอัลลีลที่เป็น Arginine (CGG) ซึ่งเป็น major allele ได้

- ตำแหน่งโคดอน 280 ใช้ restriction enzyme *RsaI* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์ GT[~]AC เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Arginine (CGT) ซึ่งเป็น major allele ซึ่ง *RsaI* สามารถจดจำ และตัดได้ แต่ไม่สามารถจดจำและตัดอัลลีลที่เป็น Histidine (CAT) ซึ่งเป็น minor allele ได้

- ตำแหน่งโคดอน 399 ใช้ restriction enzyme *MspI* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์

C[~]CGG เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Arginine (CGG) ซึ่งเป็น major allele ซึ่ง *MspI* สามารถจดจำ และตัดได้ แต่ไม่สามารถจดจำและตัดอัลลีลที่เป็น Glutamine (CAG) ซึ่งเป็น minor allele ได้

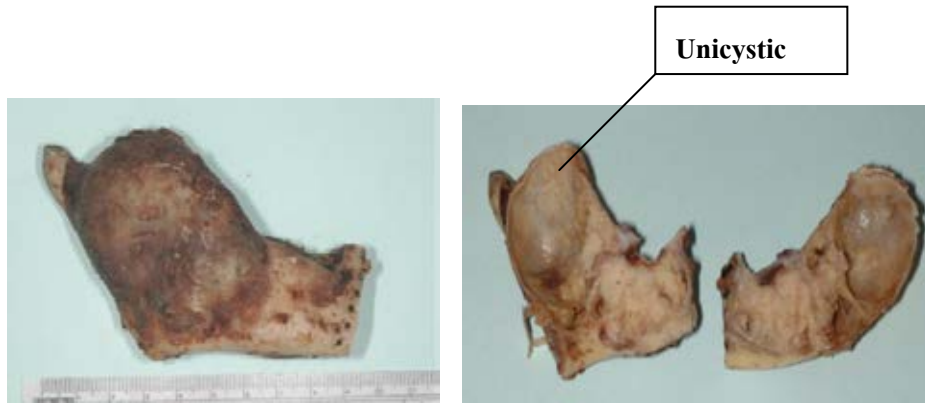
2. ผลการเลือกกลุ่มประชากรที่ศึกษา

2.1 ตัวอย่างเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพืงจากบลิอกซึนเนือผู้ป่วยซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ที่โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและได้รับการวินิจฉัยโดยทันตพยาธิแพทย์ว่าเป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพืง ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2542-2551 จำนวน 100 คน

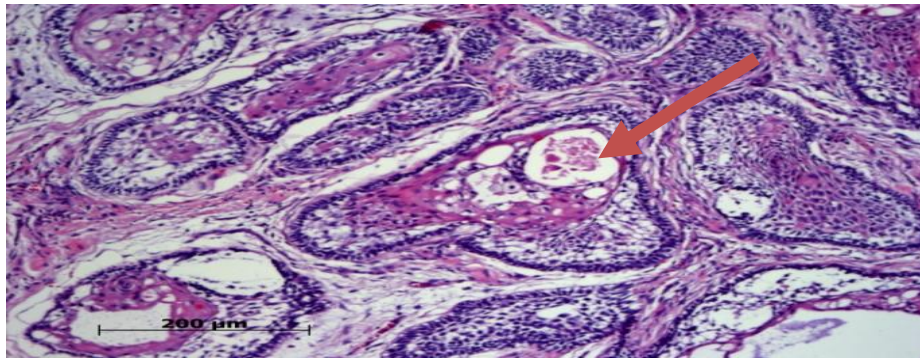
2.2 คัดเลือกประชากรกลุ่มควบคุมจากผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพืง จำนวน 150 คน โดยคัดเลือกกลุ่มประชากรควบคุม ที่มีอายุ เพศ และเชื้อชาติใกล้เคียงกับกลุ่มผู้ป่วย (match-group control)

3. ผลการเก็บตัวอย่าง

3.1 ผลจากการคัดเลือกบลิอกซึนเนือผู้ป่วยที่เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพืงสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด QIAamp[®] DNA FFPE Tissue (QIAGEN/Germany) ซึ่งผลที่ได้พบว่าสกัดดีเอ็นเอของผู้ป่วยได้จำนวน 82 ราย จาก 100 ราย แบ่งเป็นผู้ป่วยชาย 41 ราย (50%) และผู้ป่วยหญิง 41 ราย (50%) เกณฑ์เฉลี่ยอายุของผู้ป่วยทั้งหมดอยู่ที่ 40 ปี (ผู้ป่วยมีอายุตั้งแต่ 8-81 ปี)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะชิ้นเนื้อผู้ป่วยบริเวณกระดูกขากรรไกรที่เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน แบบ Conventional จะพบส่วนที่มีลักษณะเป็น Unicystic



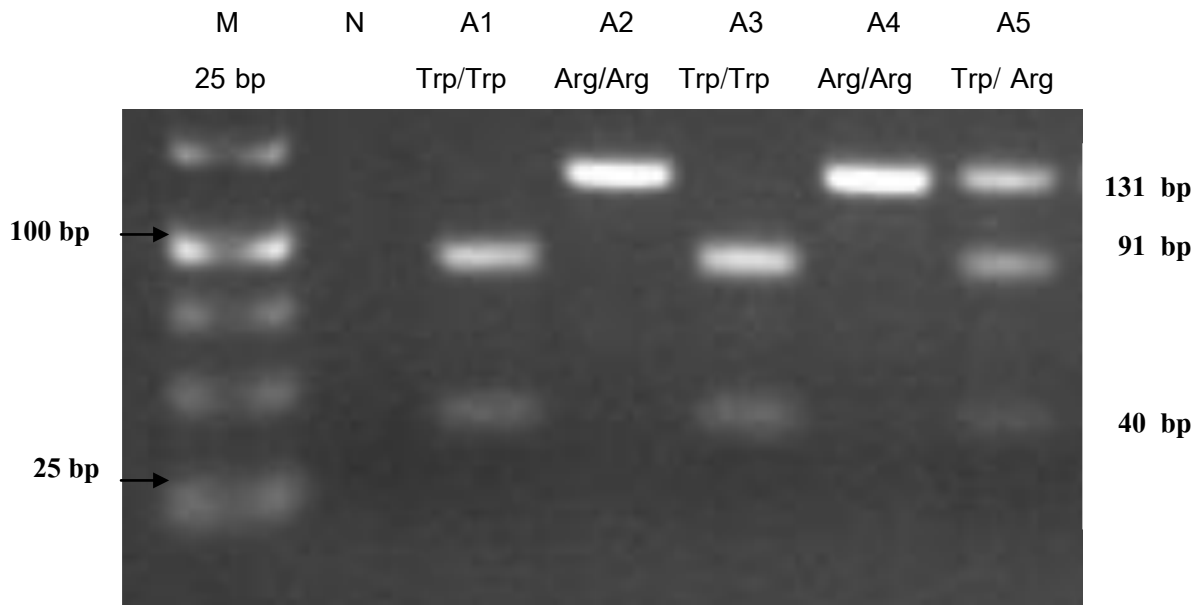
ภาพที่ 4.2 ลักษณะเนื้อเยื่อเซลล์ชั้นในเป็นเซลล์รูป stellate อยู่กันอย่างหลวมๆ บางครั้งการเกิดถุงน้ำ (cystic degeneration)

3.2 ผลจากการเก็บตัวอย่างเลือดในกลุ่มควบคุม เก็บตัวอย่าง peripheral blood lymphocyte จากผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันนำมาสกัด ดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี phenol chloroform (Kitkumthorn *et al.*, 2010) ซึ่งผลที่ได้พบว่าสกัดดีเอ็นเอได้จำนวน 140 ราย จาก 150 ราย แบ่งเป็นผู้ชาย 71 ราย (50.71%) และผู้หญิง 69 ราย (49.29%) เกณฑ์เฉลี่ยอายุของผู้ป่วยทั้งหมดอยู่ที่ 40 ปี (ผู้ป่วยมีอายุตั้งแต่ 25-45 ปี) เพื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์การเกิดโรค

4. ผลการศึกษาภาวะพหุสัณฐานของ ยีน XRCC1 การตรวจหา SNP โดยวิธี

PCR- RFLP

4.1 ตำแหน่งโคดอนที่ 194 (SNP analysis of XRCC1 codon 194) ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *PvuII* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์ CAG~CTG เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Tryptophan (minor allele) *PvuII* สามารถจดจำ และตัดได้ แต่ไม่สามารถจดจำและตัดอัลลีลที่เป็น Arginine (major allele) ได้



ภาพที่ 4.3 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยที่เป็น

โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันมือตัดด้วยเอนไซม์ *PvuII*

M คือ DNA marker 25 bp

N คือ negative control

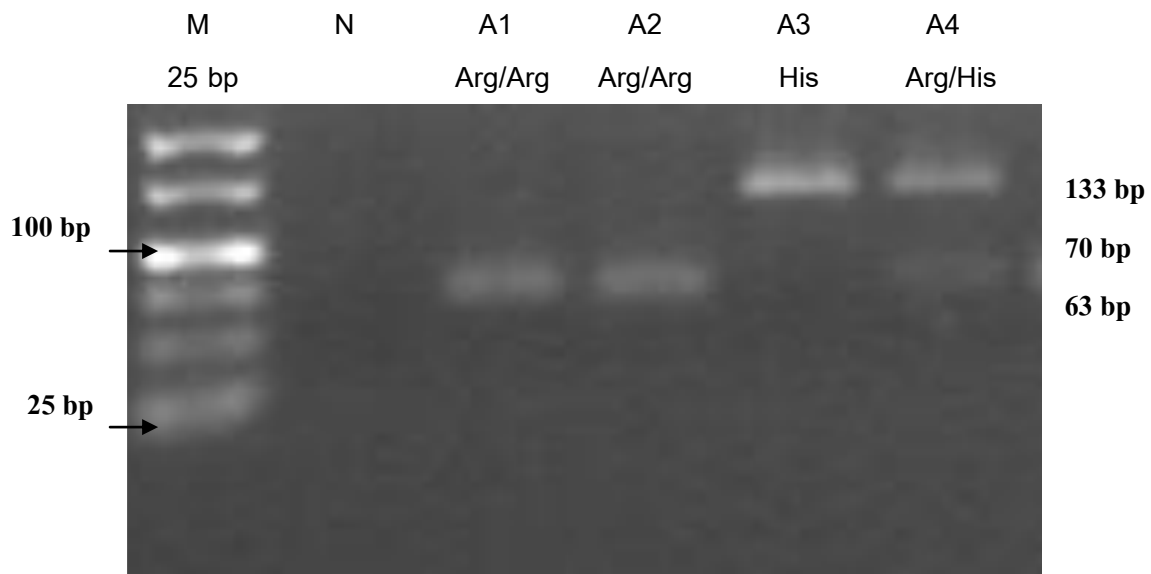
จากรูปที่ 4.3 พบว่าแต่ละเลนได้ ผลิตรหัส ดังนี้

เลนที่ A1 และ A3 (Trp/Trp) คือ ผู้ป่วยที่มีกรดอะมิโนเป็น Tryptophan มี ขนาด 40 และ 91 bp

เลนที่ A2 และ A4 (Arg/Arg) คือ ผู้ป่วยที่มีกรดอะมิโนเป็น Arginine มี ขนาด 131 bp

เลนที่ A5 (Trp/Arg) คือ ผู้ป่วยที่มีกรดอะมิโนทั้ง Tryptophan และ Arginine มี ขนาด 40 91 และ 131bp

4.2 ตำแหน่งโคดอนที่ 280 (SNP analysis of *XRCC1* codon 280) ใช้ restriction enzyme *RsaI* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์ GTAC เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Arginine (major allele) *RsaI* สามารถจดจำ และตัดได้ แต่ไม่สามารถจดจำและตัดอัลลีลที่เป็น Histidine (minor allele) ได้



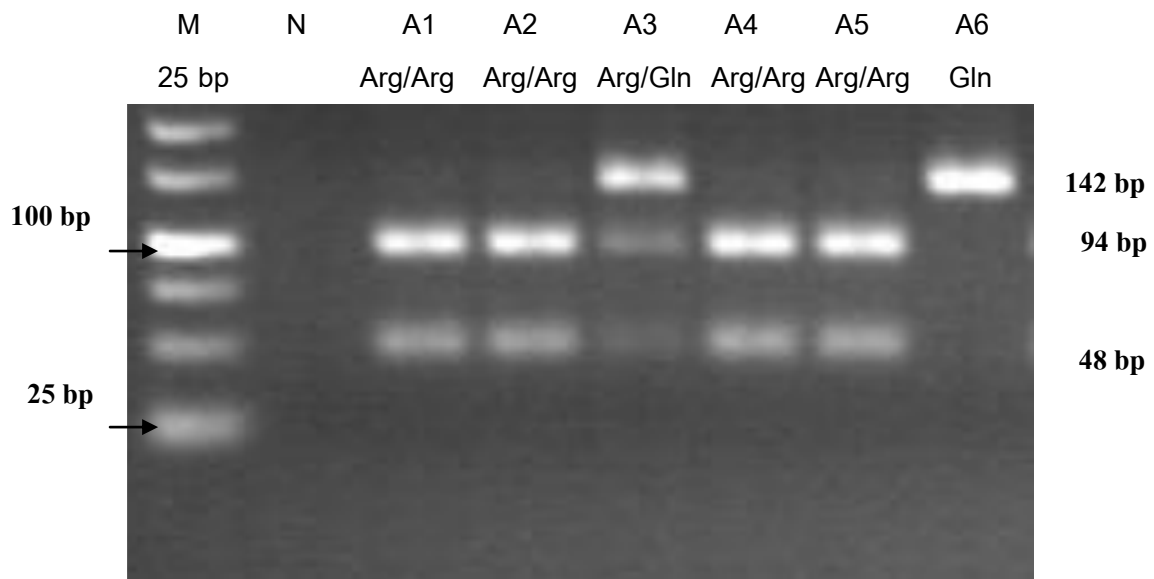
ภาพที่ 4.4 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยที่เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI*

M คือ DNA marker 25 bp
N คือ negative control

จากรูปที่ 4.4 พบว่าแต่ละเลนได้ ผลิตรหัส ดังนี้

เลนที่ A1 และ A2 (Arg/Arg) คือ ผู้ป่วยที่มีกรดอะมิโนเป็น Arginine มี ขนาด 63 และ 70 bp
เลนที่ A3 คือ ผู้ป่วยที่มีกรดอะมิโนเป็น Histidine มี ขนาด 133 bp
เลนที่ A4 (Arg/His) คือ ผู้ป่วยที่มีกรดอะมิโนทั้ง Arginine และ Histidine มี ขนาด 60 70 และ 133bp

4.3 ตำแหน่งโคดอนที่ 399 (SNP analysis of *XRCC1* codon 399) ใช้ restriction enzyme *MspI* ซึ่งจดจำนิวคลีโอไทด์ CCGG เป็นตัวตรวจหา SNP โดยที่ อัลลีลที่เป็น Arginine (major allele) *MspI* สามารถจดจำ และตัดได้ แต่ไม่สามารถจดจำและตัดอัลลีลที่เป็น Glutamine (minor allele) ได้



ภาพที่ 4.5 แบบแผนดีเอ็นเอของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผู้ป่วยที่เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันมือตัดด้วยเอนไซม์ *MspI*

M คือ DNA marker 25 bp

N คือ negative control

จากรูปที่ 4.5 พบว่าแต่ละเลนได้ ผลิตรหัส ดังนี้

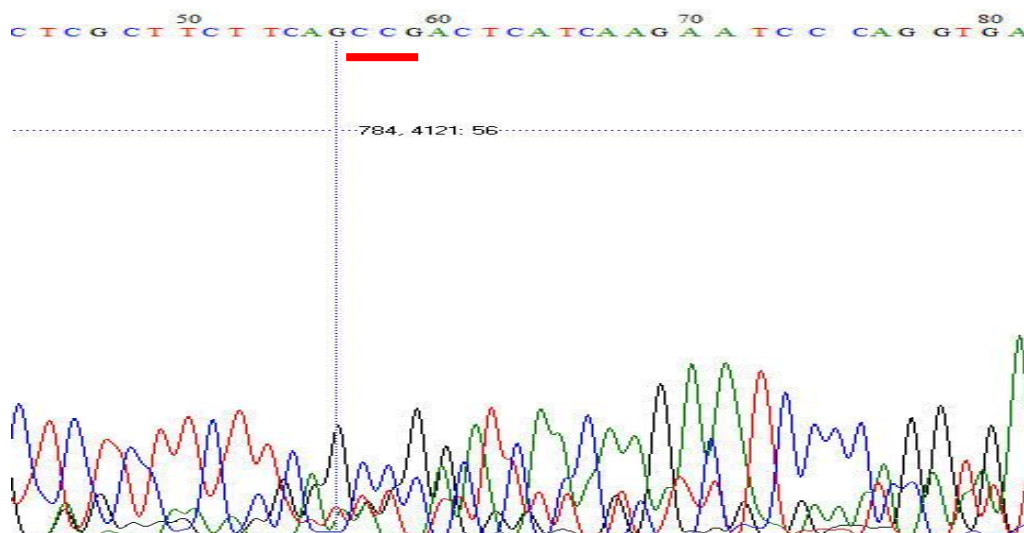
เลนที่ A1 A2 A4 และ A5 (Arg/Arg) คือ ผู้ป่วยที่มีกรดอะมิโนเป็น Arginine มี ขนาด 48 และ 94 bp

เลนที่ A3 (Arg/Gln) คือ ผู้ป่วยที่มีกรดอะมิโนทั้ง Arginine และ Glutamine มี ขนาด 48 94 และ 142bp

เลนที่ A6 คือ ผู้ป่วยที่มีกรดอะมิโนเป็น Glutamine มี ขนาด 142 bp

5. ผลการยืนยันลำดับเบสโดยการ sequencing โดยนำ PCR product ที่ได้มา purify จากนั้นจึงดำเนินการ direct sequencing เพื่อยืนยันลำดับเบส โดยใช้ forward primer สำหรับตำแหน่งโคดอนที่ 194 และ 399 ส่วน reverse primer ใช้สำหรับตำแหน่งโคดอนที่ 280

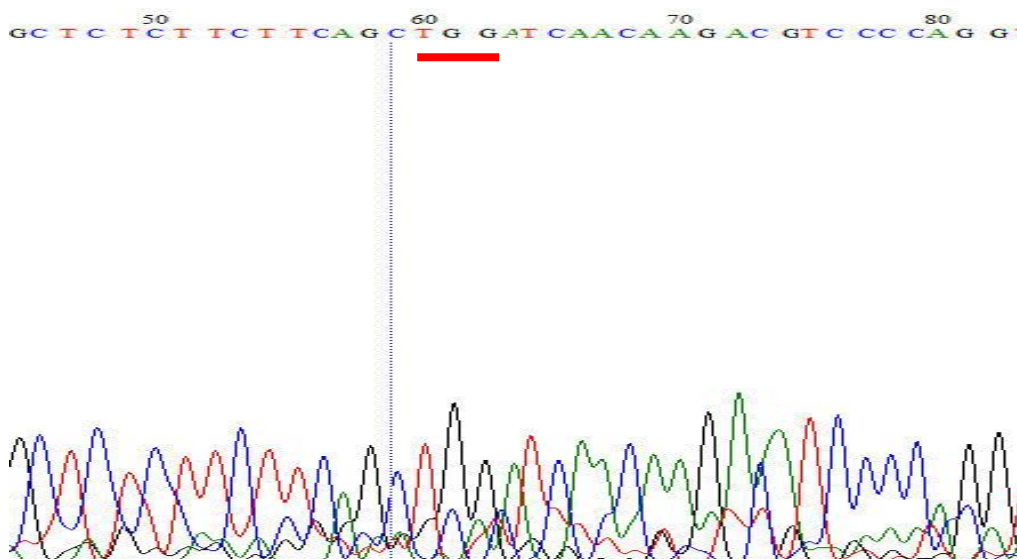
5.1 ตำแหน่งโคดอนที่ 194 Arginine (CGG)



ภาพที่ 4.6 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing

จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล C ในโคดอนที่ 194 โดยใช้ forward primer

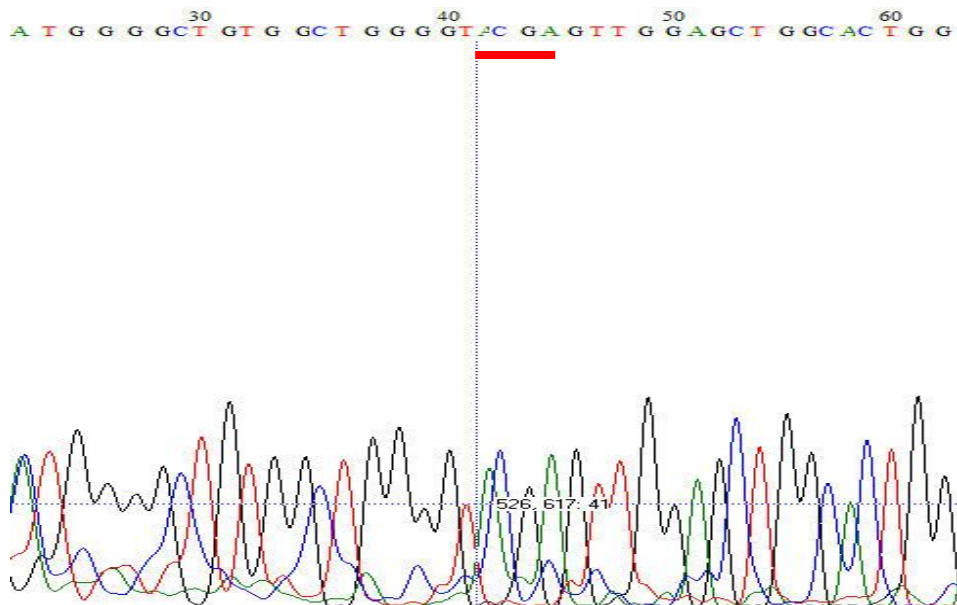
5.2 ตำแหน่งโคดอนที่ 194 Tryptophan (TGG)



ภาพที่ 4.7 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing

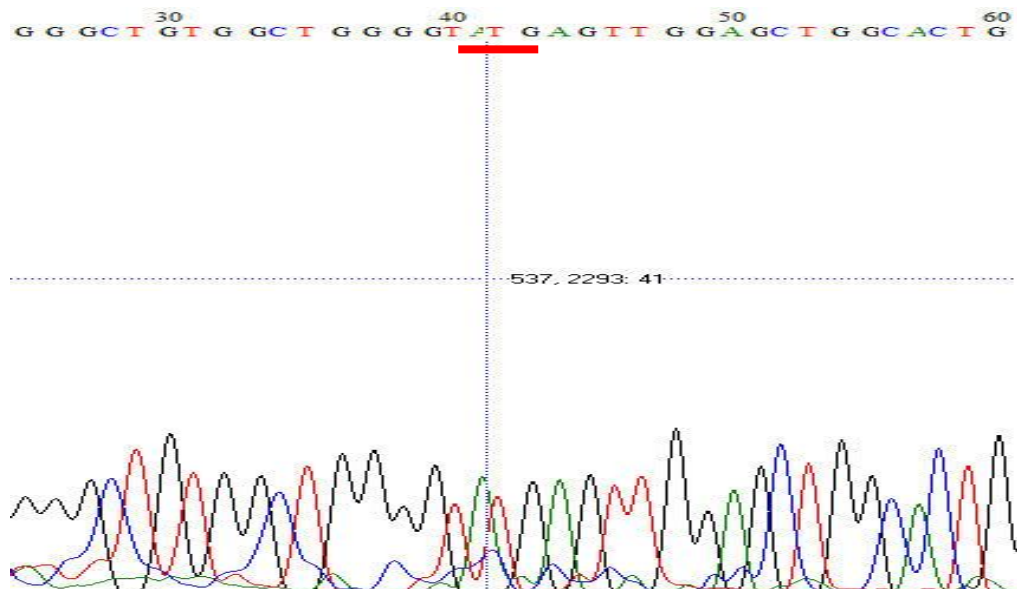
จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล T โดยใช้ forward primer

5.3 ตำแหน่งโคดอนที่ 280 Arginine (CGT)



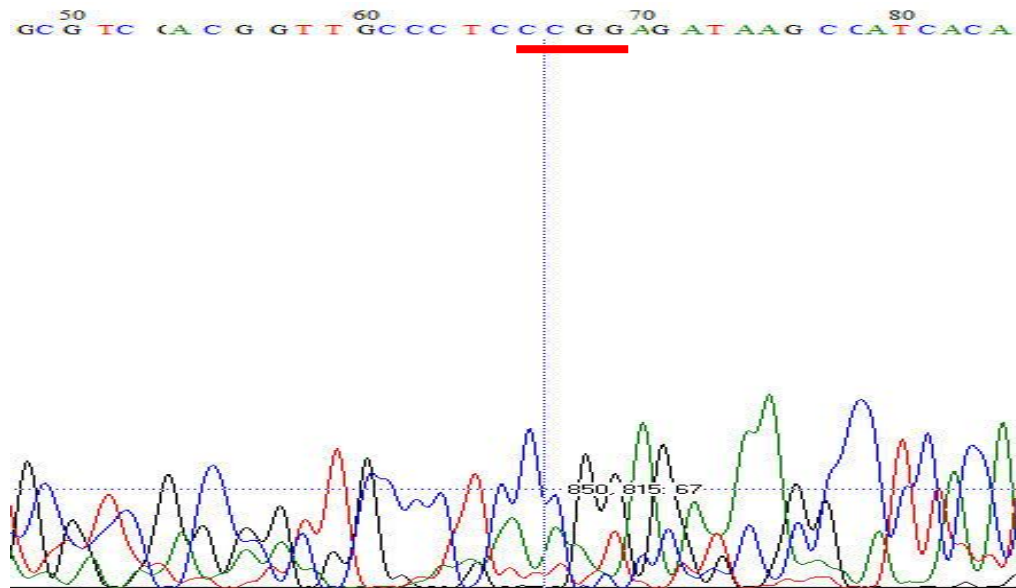
ภาพที่ 4.8 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing
จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล G โดยใช้ reverse primer

5.4 ตำแหน่งโคดอนที่ 280 Histidine (CAT)



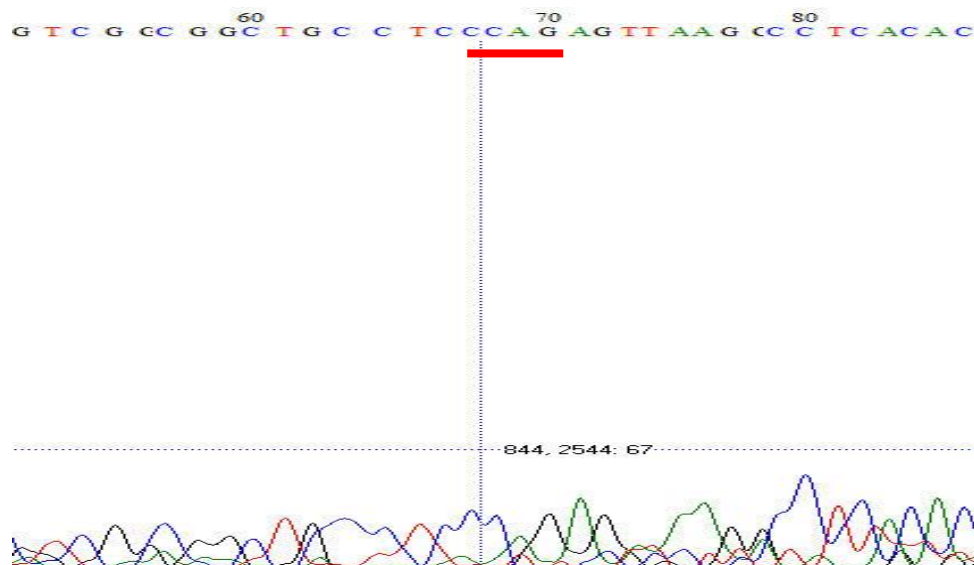
ภาพที่ 4.9 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing
จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล A โดยใช้ reverse primer

5.5 ตำแหน่งโคดอนที่ 399 Arginine (CGG)



ภาพที่ 4.10 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล G โดยใช้ forward primer

5.6 ตำแหน่งโคดอนที่ 399 Glutamine (CAG)



ภาพที่ 4.11 แสดงผลการยืนยันการทดลองด้วยวิธี Sequencing จากตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีล A โดยใช้ forward primer

6. ผลการวิเคราะห์ข้อมูลโดยค่าสถิติ

6.1 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)

วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Hardy-Weinberg equilibrium calculator ในประชากรปกติ ซึ่งค่า P value > 0.05 ในทั้ง 3 โคดอน จึงถือว่าอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium ตารางที่ 4.1 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)

<i>XRCC1</i>	Chi-square	P value
โคดอน 194	0.23	0.6315
โคดอน 280	3.08	0.0793
โคดอน 399	0.28	0.5967

สรุปผล จากตารางที่ 4.1 *XRCC1* ตำแหน่งโคดอนที่ 194 280 และ 399 มีค่า P value > 0.05 จึงถือว่าอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium

6.2 การศึกษาความเสี่ยงของจีโนไทป์ต่อการเกิดโรค

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบความหลากหลายของยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอน 194 280 และ 399 กับความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและลักษณะทางคลินิกของโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน และรูปแบบของการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม โดยใช้ contingency tables: Statcalc

โคดอนที่ 194

ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเสี่ยงในการเกิดโรคกับภาวะพหุสัญญาณในยีน XRCC1 ตำแหน่งโคดอน 194 เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันและประชากรปกติ

Groups	No. of samples	Avg. age	XRCC1 genotypes [n(%)]			Allele frequency [n(%)]		Allelic test OR (95%CI)	P value
			Arg	Hetero	Trp	C	T		
Controls	140	30.8	74(52.86%)	54(38.57%)	12(8.57%)	202(72.14%)	78(27.86%)	ref.	
Sex									
Male	71 (50.71%)	29.9	38(53.52%)	27(38.03%)	6(8.45%)	103(72.54%)	39(27.46%)	ref.	
Female	69 (49.29%)	31.43	36(52.17%)	27(39.13%)	6(8.70%)	99(71.74%)	39(28.26%)	ref.	
Ameloblastoma	82	35.96	33(40.24%)	35(42.68%)	14(17.07%)	101(61.59%)	63(38.41%)	1.62(1.05-2.48)	0.027
Sex									
Male	41 (50%)	41.54	20(48.78%)	14(34.15%)	7(17.07%)	54(65.85%)	28(34.15%)	1.37(0.73-2.57)	0.367
Female	41 (50%)	31.39	13(31.71%)	21(51.22%)	7(17.07%)	47(57.32%)	35(42.68%)	1.89(1.02-3.49)	0.041
Adjust OR								1.61(1.05-2.48)	0.028
Clinical types									
Unicystic	23	35.96	7(30.44%)	13(56.52%)	3(13.04%)	27(58.70%)	19(41.30%)	1.82(0.91-3.63)	0.093
Sex									
Male	12(52.17%)	41.54	4(33.33%)	7(58.34%)	1(8.33%)	15(62.50%)	9(37.50%)	1.58(0.58-4.25)	0.447
Female	11(47.83%)	31.39	3(27.27%)	6(54.55%)	2(18.18%)	12(54.55%)	10(45.45%)	2.12(0.77-5.79)	0.168
Adjust OR								1.83(0.91-3.63)	0.094
Convent	59	64.31	26(44.07%)	22(37.29%)	11(18.64%)	74(62.71%)	44(37.29%)	1.54(0.95-2.49)	0.081
Sex									
Male	29(49.15%)	41.54	15(51.72%)	8(27.59%)	6(20.69%)	38(65.52%)	20(34.48%)	1.39(0.69-2.81)	0.414
Female	30(50.85%)	31.39	11(36.67%)	14(46.67%)	5(16.66%)	36(60.00%)	24(40.00%)	1.69(0.85-3.35)	0.143
Adjust OR								1.54(0.95-2.49)	0.082

OR; odd ratio, CI; confidence interval

จากตารางที่ 4.2 XRCC1 ตำแหน่งโคดอน 194 นั้น จากสมมติฐานที่ว่าอัลลีล T น่าจะมีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน พบ ว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรมในประชากรกลุ่มปกติและกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 3 แบบ คือประชากรที่มี จีโนไทป์แบบ CC, CT และ TT ซึ่ง ในประชากรปกติมีความถี่ของอัลลีล C เท่ากับ 202 (72.14%) และ ความถี่ของอัลลีล T เท่ากับ 78 (27.86%) ส่วนในประชากรกลุ่มผู้ป่วย มีความถี่ของอัลลีล C เท่ากับ 101 (61.59%) และ ความถี่ของอัลลีล T เท่ากับ 63 (38.41%) พบว่าค่า OR = 1.62, 95%CI =1.05-2.48 P value 0.027 (P value < 0.05)

เมื่อพิจารณาลักษณะชั้นเนื้อของโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ unicystic และ conventional พบผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันแบบ unicystic มีความถี่ของอัลลีล C เท่ากับ 27 (58.70%) และ ความถี่ของอัลลีล T เท่ากับ 19 (41.30%) พบว่าค่า OR = 1.82, 95%CI =0.91-3.63 P value 0.093 กำเนิดฟัน (P value > 0.05)

ส่วนในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันแบบ conventional มีความถี่ของอัลลีล C เท่ากับ 74 (62.71%) และ ความถี่ของอัลลีล T เท่ากับ 44 (37.29%) พบว่าค่า OR = 1.54, 95%CI =0.95-2.49 P value 0.081 (P value > 0.05)

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ ในตำแหน่งโคดอนที่ 194

Risk of Ameloblastoma Associated with XRCC1 Codon 194 Genotype According to Different Model of Inheritance

	OR (95%CI)	Pvalue	Adjusted OR (95%CI)	Pvalue
T dominant, C wild type				
CC	1.00	0.937	1.66 (0.92-3.01)	0.095
CT or TT	1.66 (0.92-3.00)			
T recessive, C wild type				
CC or CT	1.00	0.099	2.20 (0.90-5.41)	0.093
TT	2.61(0.88-5.33)			

จากตารางที่ 4.3 การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมพบว่า ถ้าให้อัลลีล T มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแบบลักษณะด้อย ผู้ป่วยที่มี จีโนไทป์ ที่เป็นโฮโมไซกัส ทริบิตเฟน (TT) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ถึง 2.61 เท่า ในขณะที่ผู้ป่วยที่เป็นจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (CT) และโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (CC) มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน น้อยกว่าจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัส ทริบิตเฟน (TT) โดยใช้ค่า OR (95%CI) เท่ากับ 2.61 (0.88-5.33) ซึ่งค่า $P = 0.099$ ดังในตาราง ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เพศเป็นตัวกำหนดในการศึกษาความสัมพันธ์ พบ ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัส ทริบิตเฟน (TT) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน เพียง 2.20 เท่า ในขณะที่ผู้ป่วยที่เป็นจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (CT) และโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (CC) มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน น้อยกว่าจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัส ทริบิตเฟน (TT) โดยใช้ค่า OR (95%CI) เท่ากับ 2.20 (0.90-5.41) และไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งค่า $P = 0.093$ ดังในตาราง

แต่เมื่อให้ อัลลีล T มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแบบลักษณะ เด่น ก็พบว่า ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส (CT) และโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (CC) มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน โดยมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน โดยมีค่า OR (95%CI) เท่ากับ 1.66 (0.92-3.00) ซึ่งค่า $P = 0.937$ ดังในตาราง ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เพศเป็นตัวกำหนดในการศึกษาความสัมพันธ์ พบว่าผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส (CT) และโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (CC) มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน โดยมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน โดยมีค่า OR (95%CI) เท่ากับ 1.66 (0.92-

3.01) ซึ่งค่า $P = 0.095$ ดังในตาราง ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอนที่ 194 นั้นไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่านัยสำคัญทางสถิติ

โคดอนที่ 280

ตารางที่ 4.4 ตารางความสัมพันธ์ พันธุระหว่างความเสี่ยงในการเกิดโรคร่วมกับ ภาวะพหุสัญญาณในยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอน 280 เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน และ ประชากรปกติ

Groups	No. of samples	Average	<i>XRCC1</i> genotypes [n(%)]			Allele frequency [n(%)]		Allelic test OR (95%CI)	P value
			Glu		Arg	G	A		
			GG	G/A					
Controls	140	30.8	103(73.57%)	31(22.14%)	6(4.29%)	237 (84.64%)	43(15.36%)	ref.	
Sex									
Male	71 (50.71%)	29.9	56(78.87%)	11(15.49%)	4(5.63%)	123(86.62%)	19(13.38%)	ref.	
Female	69 (49.29%)	31.43	47(68.12%)	20(28.99%)	2(2.90%)	114(82.61%)	24(17.39%)	ref.	
Ameloblastoma	82	35.96	58(70.73%)	21(25.61%)	3(3.66%)	137(83.54%)	27(16.46%)	1.09(0.62-1.89)	0.862
Sex									
Male	41 (50%)	41.54	29(70.73%)	9(21.95%)	3(7.32%)	67(81.71%)	15(18.29%)	1.45(0.65-3.22)	0.427
Female	41 (50%)	31.39	29(70.73%)	12(29.27%)	0(0.00%)	70(85.37%)	12(14.63%)	0.81(0.36-1.83)	0.729
Adjust OR								1.09(0.62-1.89)	0.864
Clinical types									
Unicyclic	23	35.96	15(65.22%)	7(30.43%)	1(4.35%)	37(80.43%)	9(19.57%)	1.34(0.56-3.15)	0.613
Sex									
Male	12(52.17%)	41.54	9(75.00%)	2(16.67%)	1(8.33%)	20(83.33%)	4(16.67%)	1.29(0.33-4.63)	0.911
Female	11(47.83%)	31.39	6(54.55%)	5(45.45%)	0(0.00%)	17(77.27%)	5(22.73%)	1.40(0.40-4.57)	0.760
Adjust OR								1.35(0.56-3.17)	0.606
Conventional	59	64.31	43(72.88%)	14(23.73%)	2(3.39%)	100(84.75%)	18(15.25%)	0.99(0.52-1.87)	0.899
Sex									
Male	29(49.15%)	41.54	19(65.52%)	8(27.59%)	2(6.89%)	46(79.31%)	12(20.69%)	1.69(0.71-4.01)	0.279
Female	30(50.85%)	31.39	24(80.00%)	6(20.00%)	0(0.00%)	54(90.00%)	6(10.00%)	0.53(0.18-1.46)	0.263
Adjust OR								0.99(0.52-1.87)	0.898

OR; odd ratio, CI; confidence interval

จากตารางที่ 4.4 *XRCC1* ตำแหน่งโคดอน 280 นั้น จากสมมติฐานที่ว่าอัลลีล A น่าจะมีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน พบว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรมในประชากรกลุ่มปกติและกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 3 แบบ คือประชากรที่มีจีโนไทป์แบบ GG, GA และ AA ซึ่งในประชากรปกติมีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 237 (84.64%) และ ความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 43(15.36%) ส่วนในประชากรกลุ่มผู้ป่วย มีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 137(83.54%) และ ความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 27 (16.46%) พบว่าค่า OR = 1.09, 95%CI =0.62-1.89 P value 0.862 (P value > 0.05) เมื่อพิจารณาลักษณะขึ้นเนื้อของโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ unicyclic และ conventional ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน พบผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันแบบ unicyclic มีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 37 (80.43%) และ ความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 9 (19.57%) พบว่าค่า OR = 1.34, 95%CI =0.56-3.15 P value 0.613 (P value > 0.05)

ส่วนในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันแบบ Conventional มีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 100 (84.75%) และ ความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 18 (15.25%) พบว่าค่า $OR = 0.99$, $95\%CI = 0.52-1.87$ P value 0.899 (P value > 0.05)

ตารางที่ 4.5 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของความถี่ของความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ ในตำแหน่งโคดอนที่ 280

Risk of Ameloblastoma Associated with *XRCC1* Codon 280 Genotype According to Different Model of Inheritance

	OR (95%CI)	Pvalue	Adjusted OR (95%CI)	Pvalue
A dominant, G wild type				
GG	1.00	0.762	1.15(0.60-2.21)	0.769
AA or AG	1.15(0.60-2.20)			
A recessive, G wild type				
GG or GA	1.00	1.000	0.85(0.16-4.04)	0.891
AA	0.85(0.16-3.96)			

จากตารางที่ 4.5 การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมพบ ว่า ถ้าให้อัลลีล A มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแบบลักษณะด้อย พบผู้ป่วยที่มี จีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัส ฮิสติดีน (AA) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน เพียง 0.85 เท่า ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (AG) และผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (GG) มีความเสี่ยงต่อการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิด ฟัน มากกว่าจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัส ฮิสติดีน (AA) โดยมีค่า OR (95%CI) เท่ากับ 0.85 (0.16-3.96) ซึ่งค่า $P = 1.000$ ดังในตาราง ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เพศเป็นตัวกำหนดในการศึกษาความสัมพันธ์ พบผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัส ฮิสติดีน (AA) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน เพียง 0.85 เท่า ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (AG) และผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (GG) มีความเสี่ยงต่อการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน มากกว่าจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัส ฮิสติดีน (AA) โดยมีค่า OR (95%CI) เท่ากับ 0.85 (0.16-4.04) ซึ่งค่า $P = 0.891$ ดังในตาราง ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แต่เมื่อให้ อัลลีล T มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแบบลักษณะ เด่น ก็พบว่าผู้ป่วยที่มีที่จีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (AG) และผู้ป่วยที่โฮโมไซกัส ฮิสติดีน (AA) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน 1.15 เท่า ในขณะที่จีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (GG) มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน น้อยกว่า โดยมีค่า OR (95%CI)

เท่ากับ 1.15 (0.06-2.20) ซึ่งค่า $P = 0.762$ ดังในตาราง ไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เพศเป็นตัวกำหนดในการศึกษาความสัมพันธ์ พบผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (AG) และผู้ป่วยที่โฮโมไซกัส ฮิสติดีน (AA) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน 1.15 เท่า ในขณะที่จีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (GG) มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน น้อยกว่า โดยมีค่า OR (95%CI) เท่ากับ 1.15 (0.06-2.21) ซึ่งค่า $P = 0.769$ ดังในตาราง ซึ่งไม่เป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอนที่ 280 นั้นไม่สามารถสรุปได้ว่ามีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยหรือลักษณะเด่น เนื่องจากไม่พบค่านัยสำคัญทางสถิติ

โคดอนที่ 399

ตารางที่ 4.6 ตารางความสัมพันธ์ ระหว่างความเสี่ยงในการเกิดโรคร่วมกับ ภาวะพหุสัญญาณในยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอน 399 เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วย โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน และประชากรปกติ

Groups	No. of samples	Average	<i>XRCC1</i> genotypes [n(%)]			Allele frequency [n(%)]		Allelic test OR (95%CI)	P value
			Arg	Hetero	His	G	A		
			GG	G/A	A/A				
Controls	140	30.8	77(55.00%)	52(37.14%)	11(7.86%)	206(73.57%)	74(26.43%)	ref.	
Sex									
Male	71 (50.71%)	29.9	47(66.20%)	20(28.17%)	4(5.63%)	114(80.28%)	28(19.72%)	ref.	
Female	69 (49.29%)	31.43	30(43.48%)	32(46.38%)	7(10.14%)	92(66.67%)	46(33.33%)	ref.	
Ameloblastoma	82	35.96	27(32.93%)	45(54.88%)	10(12.20%)	99(60.37%)	65(39.63%)	1.83(1.19-2.81)	0.005
Sex									
Male	41(50%)	41.54	16(39.02%)	21(51.22%)	4(9.76%)	53(64.63%)	29(35.37%)	2.23 (1.15-4.31)	0.015
Female	41(50%)	31.39	11(26.83%)	24(58.54%)	6(14.63%)	46(56.10%)	36(43.90%)	1.57(0.86-2.85)	0.154
Adjust OR								1.84(1.19-2.84)	0.005
Clinical types									
Unicyclic	23	35.96	8(34.78%)	15(65.22%)	0(0.00%)	31(67.39%)	15(32.61%)	1.35(0.65-2.76)	0.488
Sex									
Male	12(52.17%)	41.54	5(41.67%)	7(58.33%)	0(0.00%)	17(70.83%)	7(29.17%)	1.68(0.57-4.84)	0.435
Female	11(47.83%)	31.39	4(36.36%)	7(63.64%)	0(0.00%)	15(68.18%)	7(31.82%)	0.93(0.32-2.66)	0.917
Adjust OR								1.23(0.58-2.58)	0.677
Conventional	59	64.31	19(32.20%)	30(50.85%)	10(16.95%)	68(57.63%)	50(42.37%)	2.05(1.27-3.30)	0.002
Sex									
Male	29(49.15%)	41.54	9(31.04%)	16(55.17%)	4(13.79%)	34(58.62%)	24(41.38%)	2.87(1.40-5.91)	0.002
Female	30(50.85%)	31.39	8(26.67%)	16(53.33%)	6(20.00%)	32(53.33%)	28(46.67%)	1.75(0.90-3.40)	0.104
Adjust OR								2.19(1.36-3.56)	0.001

OR; odd ratio, CI; confidence interval

จากตารางที่ 4.6 *XRCC1* ตำแหน่งโคดอน 399 นั้น จากสมมติฐานที่ว่าอัลลีล A น่าจะมีผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน พบว่ามีรูปแบบทางพันธุกรรมในประชากรกลุ่มปกติและกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมด 3 แบบ คือประชากรที่มี จีโนไทป์แบบ GG, GA และ AA ซึ่ง ในประชากรปกติมีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 206 (73.57%) และ ความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 74 (26.43%) ส่วนในประชากรกลุ่มผู้ป่วย มีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 99 (60.37%) และ ความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 65 (39.63%) พบว่าค่า OR = 1.83, 95%CI = 1.19-2.81

P value = 0.005 (P value < 0.05)

เมื่อพิจารณาลักษณะขึ้นเนื้อของโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ unicystic และ conventional ต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน พบผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันแบบ unicystic มีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 31 (67.39%) และความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 15 (32.61%) พบว่าค่า $OR = 1.35$, $95\%CI = 0.65-2.76$ P value 0.488 (P value > 0.05)

ส่วนในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันแบบ conventional มีความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 99 (60.37%) และความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 50 (42.37%) พบว่าค่า $OR = 2.05$, $95\%CI = 1.27-3.30$ P value 0.002 (P value < 0.05)

ตารางที่ 4.7 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของความถี่ของความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันกับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมในแต่ละจีโนไทป์ ในตำแหน่งโคดอนที่ 399

Risk of Ameloblastoma Associated with XRCC1 Codon 399 Genotype According to Different Model of Inheritance

	OR (95%CI)	Pvalue	Adjusted OR (95%CI)	Pvalue
A dominant, G wild type				
GG	1.00	0.002	2.55 (1.38-4.79)	0.002
AA or AG	2.49(1.36-4.58)			
A recessive, G wild type				
GG or GA	1.00	0.407	1.63(0.60-4.39)	0.412
AA	1.63(0.61-4.37)			

จากตารางที่ 4.7 การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมพบว่า อัลลีล A มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น เนื่องจากมีค่า $P = 0.002$ ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษานี้พบผู้ป่วยที่เป็นโฮโมไซกัสกลูตามีน (AA) และจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (AG) มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน 2.49 เท่า ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (GG) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน น้อยกว่าจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสกลูตามีน (AA) โดยใช้ค่า OR (95%CI) เท่ากับ 2.49 (1.36 – 4.58) ซึ่งค่า $P = 0.002$ ดังในตาราง และเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เพศเป็นตัวกำหนดในการศึกษาความสัมพันธ์ ก็พบว่าพบว่ามีอัลลีล A ยังคงมีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น เนื่องจากมีค่า $P = 0.002$ ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผู้ป่วยที่เป็นโฮโมไซกัส กลูตามีน (AA) และจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (AG) มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน 2.55 เท่า ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีจีโนไทป์

ที่เป็นโฮโมไซกัสอาร์จีนีน (GG) จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน น้อยกว่า จีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสกลูตามีน (AA) โดยใช้ค่า OR (95%CI) เท่ากับ 2.55 (1.38 – 4.79) ซึ่งค่า $P = 0.002$ ดังในตาราง และเป็นไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6.3 Haplotype analysis ผ่านโปรแกรม plink version PLINK v1.07

ตารางที่ 4.8 ตารางแสดงความสัมพันธ์ของอัลลีลในสเนิปของยีน *XRCC1* ในผู้ป่วย

Genes	SNP	Physical position	Allele	Allele frequency		Odd ratio (95% CI)	P value
				Amelo	Control		
<i>XRCC1</i> โคดอนที่ 194	rs1799782	48749414	C	0.6159	0.7217	1.615 (1.212- 2.755)	0.02109
			T	0.3841	0.2786		
<i>XRCC1</i> โคดอนที่ 280	rs25489	48748252	G	0.8354	0.8464	1.086 (0.6424-1.837)	0.75750
			A	0.1646	0.1536		
<i>XRCC1</i> โคดอนที่ 399	rs25487	48747566	G	0.6037	0.7357	1.828 (1.073-2.432)	0.00378
			A	0.3963	0.2643		

จากตารางที่ 4.8 พบว่ามี 2 SNPs ที่มีความสัมพันธ์ในการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิด ฟัน คือ rs1799782 (โคดอนที่ 194) และ rs25487 (โคดอนที่ 399) ซึ่งพบว่าอัลลีล T (rs1799782) และอัลลีล A (rs25487) มีนัยสำคัญที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วย โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน เมื่อเทียบกับ คนปกติ (OR = 1.615, 95% CI = 1.212- 2.755, $P = 0.02109$; OR = 1.828, 95% CI = 1.073- 2.432, $P = 0.00378$ ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.9 ตารางวิเคราะห์รูปแบบของแฮพลอไทป์ในสลิป rs25487 (โคดอน 399), rs25489 (โคดอน 280), rs1799782 (โคดอน 194)

Haplotype	Haplotype frequency		P value
	Amelo	Control	
AAT	NA	NA	0.002194
GAT	0.03019	0.02727	0.858100
AGT	0.10370	0.02870	0.000941
<u>GGT</u>	<u>0.25020</u>	<u>0.22260</u>	<u>0.506300</u>
AAC	0.02736	0.01659	0.440100
GAC	0.10710	0.10970	<u>0.931500</u>
<u>AGC</u>	<u>0.26530</u>	<u>0.21900</u>	<u>0.268100</u>
<u>GGC</u>	<u>0.21620</u>	<u>0.37610</u>	<u>0.000472</u>

จากตารางที่ 4.9 แสดงให้เห็นถึง SNPs ทั้ง 3 ตำแหน่ง rs25487 (โคดอน 399), rs25489 (โคดอน 280), rs1799782 (โคดอน 194) พบรูปแบบแฮพลอไทป์สามัญ (Common haplotypes ซึ่งมีค่า MHF: Minimum Haplotypes Frequency ≥ 0.20) จากการวิเคราะห์ผลนั้น เราพบ major haplotype ที่พบมากกว่า 20% พบทั้งหมด 3 แฮพลอไทป์ คือ GGT AGC GGC ซึ่งทั้ง 3 รูปแบบนั้นไม่พบว่ามีความเสี่ยงต่อการก่อให้เกิดโรค แต่พบว่ารูปแบบ GGC นั้นพบในประชากรปกติสูงถึง 37.61 % แต่กลับพบในผู้ป่วยเพียง 21.62% และ $p = 0.0004$ มีค่านัยสำคัญทางสถิติ เรียกว่า เป็นแฮพลอไทป์แบบ protective haplotype ซึ่งถ้าบุคคลใดตรวจแล้ว วมี่แฮพลอไทป์แบบ GGC ก็จะไม่จะมีโอกาสเป็นโรค และยังได้พบว่ารูปแบบแฮพลอไทป์แบบ AGT ซึ่งเป็น minor haplotype นั้นก็มีนัยสำคัญต่อการเกิดโรค โดยเป็นแบบ risk haplotype ซึ่งพบในโรคถึง 10.37% แต่พบในประชากรปกติเพียง 2.8% ดังนั้นถ้าบุคคลใดมีรูปแบบแฮพลอไทป์แบบ AGT ก็จะมีความเสี่ยงในการเกิดโรค

ตารางที่ 4.10 ตารางรูปแบบของการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในสனிปของผู้ป่วยและประชากรปกติ

Gene	SNP	Minor a	Major A	Amelo (N=82)			Control (N=140)			P value of model of inheritance	
				Aa	Aa	AA	Aa	Aa	AA	Recessive	Dominant
<i>XRCC1</i>	rs25487	A	G	10	45	27	11	52	77	0.2865	0.001468
	rs25489	A	G	3	21	58	6	31	103	NA	NA
	rs1799782	T	C	14	35	33	12	54	74	0.05727	0.06949

จากตารางที่ 4.10 แสดงให้เห็นถึงผลจากการวิเคราะห์ รูปแบบของการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมใน SNPs ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน (rs25487 และ rs1799782) ในยีน *XRCC1* ในสனிป rs25487 (โคดอน 399) มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ Dominant และมีค่านัยสำคัญทางสถิติ P value 0.001468 (P value < 0.05) ส่วนสனிป rs1799782 (โคดอน 194) พบค่า P value 0.05727 (P value > 0.05)

6.4 ผลวิเคราะห์ เพื่อยืนยันตัวอย่างของคนไข้โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ไม่ได้เกิดจาก Somatic cell mutation โดยใช้ค่า Coefficient of variation (%CV)

XRCC1 โคดอนที่ 194

ตารางที่ 4.11 ตารางวัดความเข้มแบนด์ ในตัวอย่าง ผู้ป่วยที่มีอัลลีลแบบเฮเทโรไซกัส จำนวน 35 คน โคดอนที่ 194

	Density average (%)	Standard deviation (SD)	% CV
C band	66.70429	1.698986	2.55
T band at 91 bp	19.57514	1.635662	8.36
T band at 40 bp	13.71171	1.350186	9.85

จากตารางที่ 4.11 ค่า % CV ของ C band T band (91 bp) และ T band (40 bp) มีค่า 2.55 8.36 และ 9.85 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 10

XRCC1 โคดอนที่ 280

ตารางที่ 4.12 ตารางวัดความเข้มข้นในตัวอย่าง ผู้ป่วยที่มีอัลลีลแบบเฮเทโรไซกัส จำนวน 21 คน โคดอนที่ 280

	Density average (%)	Standard deviation (SD)	% CV
A band	34.08857	1.37784	4.04
G band at 70 bp	33.20429	2.126089	6.40
G band at 63 bp	32.70000	2.48826	7.61

จากตาราง 4.12 ค่า % CV ของ A band G band (70 bp) และ G band (63 bp) มีค่า 4.04 6.40 และ 7.61 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 10

XRCC1 โคดอนที่ 399

ตารางที่ 4.13 ตารางวัดความเข้มข้นในตัวอย่าง ผู้ป่วยที่มีอัลลีลแบบเฮเทโรไซกัส จำนวน 15 คน โคดอนที่ 399 จากการทำพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ Taq DNA Polymerase จากบริษัท Invitrogen (USA)

	Density average (%)	Standard deviation (SD)	% CV
A band	37.81133	1.286473	3.40
G band at 95 bp	32.18867	1.30327	4.05
G band at 47 bp	30.00000	1.953923	6.51

จากตาราง 4.13 ค่า % CV ของ A band G band (95 bp) และ G band (47 bp) มีค่า 3.40 4.05 และ 6.51 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 10

XRCC1 โคดอนที่ 399

ตารางที่ 4.14 ตารางวัดความเข้มข้นในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอัลลีลแบบเฮเทโรไซกัสจำนวน 30 คน โคดอนที่ 399 ที่ใช้ *Taq* DNA Polymerase Hotstart จากบริษัท Biolabs (England)

	<i>Density average</i> (%)	<i>Standard deviation</i> (SD)	% CV
A band	63.14533	1.078143	1.71
G band at 95 bp	21.68333	1.632967	7.53
G band at 47 bp	15.14267	1.485876	9.81

จากตารางที่ 4.14 ค่า % CV ของ A band G band (95 bp) และ G band (47 bp) มีค่า 1.71 7.53 และ 9.81 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 10

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันจัดเป็นเนื้องอกที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มของเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจากฟัน (Odontogenic tumor) ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะพหุสัญญาณของยีน XRCC1 ที่โคดอน 194 280 และ 399 กับความเสี่ยงในการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ในผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน จากการศึกษาด้วยวิธี PCR-RFLPs และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Chi-Square ทั้งในกลุ่มของผู้ป่วยโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันจำนวน 82 คน และในกลุ่มประชากรปกติจำนวน 140 คนพบว่า

1. XRCC1 ที่โคดอน 194 พบว่าอัลลีล T (IGG) นั้น มีอิทธิพลในการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ซึ่งมีค่า ODD ratio = 1.62 และ 95% CI = 1.05-2.48 (P -Value = 0.027) ซึ่งอัลลีล T (IGG) มีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ โดมนั้นไม่สามารถสรุปได้ (จากตารางที่ 4.3) รวมถึงพบว่าเพศมีความสัมพันธ์ต่อการเสี่ยงในการเป็นโรค โดยเพศหญิงที่มีภาวะพหุสัญญาณของยีน XRCC1 ที่โคดอน 194 ODD ratio = 1.89 และ 95% CI = 1.02-3.49 (P -Value = 0.041) จะมีความเสี่ยงมากกว่าเพศชายซึ่งมีค่า ODD ratio = 1.37 และ 95% CI = 0.73-2.57 (P -Value = 0.367) และยังพบว่าผู้ป่วยนั้น เป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันแบบ Convention มากกว่าแบบ Unicystic (จากตารางที่ 4.2)
2. XRCC1 ที่โคดอน 280 พบว่าอัลลีล A (CAT) นั้น ไม่มีอิทธิพลในการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ซึ่งมีค่า ODD ratio = 1.09 และ 95% CI = 0.62-1.89 (P -Value = 0.862) ซึ่งสำหรับอัลลีล A (CAT) มีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบโดมนั้นไม่สามารถสรุปได้ (จากตารางที่ 4.5)
3. XRCC1 ที่โคดอน 399 พบว่าอัลลีล A (CAG) นั้น มีอิทธิพลในการเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ซึ่งมีค่า ODD ratio = 1.83 และ 95% CI = 1.19 -2.81 (P -Value = 0.005) และหากจีโนไทป์ ในตำแหน่งนี้ของผู้ที่ได้รับการถ่ายทอดเป็นแบบ AA หรือ GA จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคได้ถึง 2.49 เท่า (ตารางที่ 4.7) เมื่อเปรียบเทียบกับ บิโนไทป์แบบอื่น ซึ่งอัลลีล A มีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบลักษณะเด่นนั่นเอง รวมถึงพบว่าเพศมีความสัมพันธ์ต่อการเสี่ยงในการเป็นโรค โดยเพศชายที่มีภาวะพหุสัญญาณของยีน XRCC1 ที่โคดอน 399 ODD ratio = 2.23 และ 95% CI = 1.15-4.31 (P -Value = 0.015) จะมีความ

เสี่ยงมากกว่าเพศหญิงซึ่งมีค่า ODD ratio = 1.57 และ 95% CI = 0.86-2.85 และยังพบว่าผู้ป่วยนั้นเป็นโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพันแบบ Convention มากกว่าแบบ Unicystic (ตารางที่ 4.6)

ซึ่งจากการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม นั้น XRCC1 ที่โคดอน 194 อัลลีล T (IGG) และ XRCC1 ที่โคดอน 280 อัลลีล A (CAT) มีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ บิโด นั้นไม่สามารถสรุปได้ อาจเนื่องจากธรรมชาติของโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพัน นั้น โคดอนที่ 399 มีความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคได้มากที่สุดจาก 3 โคดอน

จากการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของภาวะพหุสัญญาณในแต่ละสลิปโดยการนำโปรแกรม plink version PLINK v1.07 ในสลิปตำแหน่งโคดอนที่ 194 และ 399 (rs1799782 และ rs25487 ตามลำดับ) ซึ่งพบว่าอัลลีล T (IGG) ตำแหน่งโคดอนที่ 194 และอัลลีล A (CAT) ตำแหน่งโคดอนที่ 399 มีความเสี่ยงของการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพันเมื่อเทียบกับคนปกติ (OR = 1.615, 95% CI = 1.212- 2.755, $P = 0.02109$; OR = 1.828, 95% CI = 1.073-2.432, $P = 0.00378$ ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับค่าวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Chi-Square สำหรับรูปแบบของ แฮพลอไทป์ในคนปกตินั้นจะพบ แฮพลอไทป์แบบ GGC มากที่สุดถึง 37.61% (Major haplotype) และพบรูปแบบ AAC น้อยที่สุด 1.66% (Minor haplotype) และพบว่าแฮพลอไทป์แบบ GGC มีความเสี่ยงในการเกิดโรค เนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพัน มีค่า $P = 0.000472$ และในการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของในแต่ละสลิปที่มีนัยสำคัญต่อการก่อให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดโรค เนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิด พันนั้น ในสลิป rs25487 (โคดอน 399) มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ ยีนเด่น (Dominant) และมีค่านัยสำคัญทางสถิติ P value 0.001468 (P value < 0.05) ซึ่งเป็นสลิปที่มีความเสี่ยงในการเกิด โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพัน มากที่สุด ส่วนสลิป rs1799782 (โคดอน 194) มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ โดมนั้นยังไม่อาจสรุปได้ เนื่องจากไม่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ P value 0.05727 (P value > 0.05)

ในการทดลองนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ ยืนยันว่าตัวอย่างของคนไข้โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดพัน ไม่ได้เกิดจาก Somatic cell mutation แต่เป็นภาวะพหุสัญญาณ โดยใช้ค่า Coefficient of variation (%CV) ซึ่ง Somatic cell mutation หมายถึง การกลายของเซลล์ร่างกาย ไม่เกี่ยวข้องกับเซลล์สืบพันธุ์ จึงไม่มีการถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานรุ่น แต่ก็มีความสำคัญเนื่องจากเซลล์ร่างกายมนุษย์ส่วนใหญ่เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส โดยเริ่มต้นจากไซโกต 1 เซลล์ และตลอดเวลาที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ย่อมมีโอกาสเกิดการกลายของยีนในเซลล์ร่างกายเฉพาะที่ ส่งผลให้เป็นมะเร็งที่บริเวณนั้นในที่สุด

ซึ่งพบว่าค่า %CV ของทั้ง 3 โคดอนก็อยู่ในค่าที่ไม่เกิน 10 จึงสรุปได้ว่าข้อมูลที่เรานำมาใช้นั้น ไม่มีการกระจายตัวของข้อมูลมาก ดังนั้นตัวอย่างของคนไข้โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันที่เรานำมาศึกษานั้นเป็นภาวะพหุสัณฐานจริง ไม่ได้เกิดจาก Somatic cell mutation

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ทำการศึกษาที่บริเวณภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ที่ ตำแหน่ง โคดอนที่ 194 280 และ 399 นั้น พบว่ามีเพียงรูปแบบของอัล ลีล A (CAT) ของภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ตำแหน่ง โคดอนที่ 280 นั้นไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน อาจเนื่องจากธรรมชาติของกลไกการเกิดโรค เนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันนั้นไม่เกี่ยวข้องกับ *XRCC1* ตำแหน่ง snip ที่ 280 รวมทั้งในตำแหน่ง snip ที่ 280 นั้น มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Arginine ไปเป็น Histidine ซึ่งสำหรับกรดอะมิโนสองตัวนี้นั้นจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (กลุ่มมีขั้วและไม่ชอบน้ำ) ดังนั้นอาจจะทำให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนมากนักจึงทำให้ไม่มีผลต่อการจับของยีน *XRCC1* ในการทำงานเป็น scaffold protein ในกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ จึงทำให้ไม่ส่งผลต่อความเสี่ยงในการเกิดโรค เนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน แต่ ถึงอย่างไรก็ตาม ก็พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของโคดอนที่ 280 นี้ในโรคอื่นๆ เช่น มะเร็งเต้านม (Zhang *et al.*, 2006) มะเร็งปอด (Ratnasinghe *et al.*, 2001) มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Stem *et al.*, 2001) เป็นต้น

ผลการศึกษา ในครั้งนี้สามารถนำไปเป็นเครื่องมือเพื่อช่วยในการวินิจฉัยคัดกรอง ในเบื้องต้นของ โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟัน ต่อไปได้ อีกทั้งยังใช้ในการจำแนกคัดกรองเบื้องต้นระหว่างเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจากฟัน (odontogenic tumor) กับโรค Ameloblastoma ดังนั้นจึงสามารถใช้ข้อมูลจากการศึกษาดังกล่าวเป็นส่วนร่วมของ genetic marker ในการคัดกรองเบื้องต้นได้ และยังพบว่าภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ที่ ตำแหน่งโคดอนที่ 194 และ 399 อาจจะมีประโยชน์ในการเป็นตัวเลือกหนึ่งของ เครื่องหมายทางพันธุกรรมบ่งชี้ในการเกิดโรคต่างๆ ได้ และนอกจากนี้ภาวะพหุสัณฐานของยีน *XRCC1* ที่ ตำแหน่ง โคดอนที่ 194 และ 399 สามารถที่จะนำมาใช้ประโยชน์ควบคู่ไปกับการรักษาทางเวชพันธุศาสตร์ โดยที่ความแตกต่างในรูปแบบของอัล ลีลในผู้ป่วยนั้น จะใช้เป็นข้อมูลในการรักษา ด้วยยา และยังสามารถสร้างฐานข้อมูล SNP database และ SNP frequency ของ *XRCC1* ที่ ตำแหน่งโคดอนที่ 194 280 และ 399 ในประชากรไทยเพื่อสร้างประโยชน์ในการศึกษาโรคอื่นๆ ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

โรคเนื้องอกเซลล์ต้นกำเนิดฟันจัดเป็นเนื้องอกที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่มของเนื้องอกที่มีต้นกำเนิดจากฟัน (Odontogenic tumor) โดยพบผู้ป่วยส่วนมากอยู่ในระยะสุดท้ายของโรค เนื่องจากเป็นโรคที่ระยะเริ่มต้นนั้นไม่แสดงอาการรุนแรงซึ่งกลุ่มของเนื้องอกจะค่อยๆ มีขนาดใหญ่ขึ้น และ

ไม่มีลักษณะเฉพาะทางคลินิกของโรค ดังนั้นการศึกษาทางโมเลกุลด้านพันธุศาสตร์ของโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพันเพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมและใช้เป็นปัจจัยร่วมในการทำนายโรคในเบื้องต้นจึงเป็นประโยชน์อย่างมาก

ซึ่งจากการศึกษา ยีน *XRCC1* พบว่ามีเพียงตำแหน่งโคดอนที่ 194 และ 399 เท่านั้นที่เกี่ยวข้องต่อความเสี่ยงในการเกิดโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพัน ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพันนั้น อาจมีผลมาจากปัจจัยของสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ด้วย อาจเนื่องจากเชื้อชาติเป็นตัวกำหนดธรรมชาติของการเกิดโรคได้ จะพบว่า ยีน *XRCC1* ตำแหน่งโคดอนที่ 194 280 และ 399 อาจพบวก่อให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดโรค ในเชื้อชาติหนึ่งแต่ในขณะที่อีกเชื้อชาติกลับไม่ได้ ก่อให้เกิดความเสี่ยงในการเกิดโรค (Duarte *et al.*, 2005 ; Lao *et al.*, 2008) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เราได้ทำเพียงแค่ประชากรในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามความถี่ของยีน *XRCC1* ในประชากรไทยที่ไม่ป่วยเป็นโรคนี้ ออกเซลล์ ต้นกำเนิดพัน ใกล้เคียงกับในโรคอื่นๆ ที่ทำการศึกษาในยีน *XRCC1* ในประชากรชาวไทยที่ปกติ (Pakakasama *et al.*, 2007 ; Sangrajrang *et al.*, 2008 ; Kietthubthew *et al.*, 2006) และจำนวนของผู้ป่วยโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพันกับประชากรปกติ นั้นมีค่าแตกต่างกันมากเกิน แต่เนื่องจากโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพันนั้นเป็นโรคหายากโรคหนึ่ง ดังนั้นจำนวนผู้ป่วยที่ทำการเก็บรวบรวมดีเอ็นเอได้จึงมีจำนวนน้อย ซึ่งในการทดลองครั้งต่อไปควรเลือกจำนวนประชากรของผู้ป่วยโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพันกับประชากรปกติให้มีจำนวนใกล้เคียงกัน สำหรับในส่วนการวิเคราะห์ Somatic cell mutation โดยใช้ค่า Coefficient of variation (%CV) นั้น ได้ทำการแยกวิเคราะห์ในโคดอนที่ 399 ออกเป็น 2 กลุ่ม เนื่องจากในการทดลองนั้นมีบางตัวอย่างใช้ *Taq* DNA Polymerase Hotstart และบางตัวอย่างใช้ *Taq* DNA Polymerase จากบริษัท Invitrogen เพื่อให้ได้ค่าที่ไม่คลาดเคลื่อนเนื่องจากการวัดแถบความเข้มแบนด์ ซึ่งการใช้ *Taq* DNA Polymerase ที่ต่างกันจะทำให้ได้ความหนาและความเข้มของแบนด์ที่ต่างกัน

ดังนั้นจากการศึกษาทางโมเลกุลด้านพันธุศาสตร์ของโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพันเพื่อในครั้งนี้นั้นสามารถใช้เป็นปัจจัยร่วมในการทำนายโรคในเบื้องต้นได้ โดยอาจใช้เป็นปัจจัยร่วมกับ ยีน *P53* ในการทำนายความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพัน ซึ่ง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากรดอะมิโนอาร์จีนีนในยีน *P53* โคดอน 72 นั้นมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพัน ซึ่งมีค่า OR (95% CI) = 2.06 (1.28–3.31), P = 0.002 (Kitkumthorn *et al.*, 2010) จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการ ใช้ทำนายโรคในเบื้องต้น และการศึกษาในด้านโมเลกุลของโรคนี้ ออกเซลล์ต้นกำเนิดพันนั้นยังคงต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อเป็นประโยชน์ในป้องกันและการรักษาต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กนกวรรณ จารุกำจร และ วรัญญา จตุพรประเสริฐ. 2550. สนิป: ความรู้พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal. 166-174
- ธัญภัค สังฆมานนท์. 2545. พันธุกรรม: มรดกทางชีวภาพ (HEREDITY). สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลวิทยาเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. 149-152
- รัฐพงษ์ วรวงษ์วสุ . 2543. การเปรียบเทียบอัตราที่เกิดขึ้นของโรคในช่องปากจากผลการตรวจชิ้นเนื้อในภาควิชาทันตพยาธิวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล . วารสารทันตแพทยศาสตร์ มหิดล. 20 : 21-30.
- สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสถาบันส่งเสริมการสนธิวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี . 2548. สารความรู้ อนุพันธุศาสตร์. เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น. 3-11
- อมรา คัมภีรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น. 263-264

ภาษาอังกฤษ

- Baden, E. 1965. Terminology of ameloblastoma: History and current use. Journal of Oral Surgery.32:40- 49.
- Carter, K.W., Caskie, P. A., and Palmer, L. 2006. JLIN: A java based linkage disequilibrium plotter. BioMed Central Bioinformatics. 7: 1-3
- Chaudhuri, P. 1975. Ameloblastoma of the upper jaw. The Journal of Laryngology & Otology.89: 457– 466.
- Duarte, M. C., Colombo, J., Baptista Rossit, A. R., and Silva, A. E. 2005. Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1* and *XRCC3* in a Brazilian population. Genetics and Molecular Biology. 28: 397- 401.
- Ghandhi, D., Ayoub, A., Pogre, I. M., Macdonald, G., Brocklebank, L., and Moos, K. 2006. Ameloblastoma: a surgeon's dilemma. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 64:1010–1014.
- Iordanidis, S., Makos, C., Dimitrakopoulos, J., and Kariki, H. 1999. Ameloblastoma of the maxilla: Case report. Australian Dental Journal. 44: 51–55.

- Kietthubthew, S., Sriplung, H., Au, w. w., and Ishid, T. 2006. Polymorphism in DNA repair genes and oral squamous cell carcinoma in Thailand. Internation Journal of Hygiene and Environmental Health. 209: 21-29.
- Kimkong, I. 2008. Functional characterization of genetic polymorphisms (*IFI16*, *MNDA* and *AIM2*) associated with SLE disease. Graduate School Chulalongkorn University. 145-149.
- Kitkumthorn, N., Yanatatsaneejit, P., Rabalert, J., Dhammawipark, C., and Mutirangura, A. 2010. Association of *P53* codon 72 polymorphism and ameloblastoma. Oral Diseases. 16 : 631–635.
- Lao, T., Gu, W., and Huang, Q. 2008. A meta-analysis on XRCC1 R399Q and R194W polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. Mutagenesis. 23: 523- 532.
- Matsumoto, Y. and Kyung, K. 1995. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. Science. 269(5224): 699-702.
- Melrose, R. 1999. Benign epithelial odontogenic tumors. Seminars in Diagnostic Pathology. 16 : 271– 287.
- Modolo, F., Martins, M., Loducca, S., and de Araujo, V. 2004. Expression of integrin subunits alpha2, alpha3, alpha5, alpha v, beta1, beta3 and beta4 in different histological types of ameloblastoma compared with dental germ, dental lamina and adult lining epithelium. Oral Diseases. 10: 277– 282.
- Muller, H., and Sloomweg, P. 1985. The ameloblastoma the controversial approach to therapy. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 13:79–84.
- Pakakasama, S., Sirirat, T., Kanchanachumpol, S., Udomsubpayakul, U., Mahasirimongkol, S., et al. 2007. Genetic Polymorphisms and Haplotypes of DNA Repair Genes in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Pediatr Blood Cancer. 48: 16–20.
- Philipsen, H., Reichart, P., Nikai, H., Takata, T., and Kudo, Y. 2001. Peripheral ameloblastoma: biological profile based on 160 cases from the literature. Oral Oncology. 37:17–27.
- Purcell, P., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., et al. 2007. PLINK: A tool set for whole- genome association and population-based linkage analyses. The American Journal of Human Genetics. 81 : 559-575.

- Ratnasinghe, D., Yao, S., Tangrea, J. A., Qiao, Y., Andersen, M. R., Barrett, M. J., et al. 2001. Polymorphisms of the DNA repair gene *XRCC1* and lung cancer risk. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 10 : 119–123.
- Regezi, J. 2002. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibrous, and giant cell lesions of the jaws. Modern Pathology.15:331– 341.
- Reichart, P. A., Philipsen, H. P., and Sonner, S. 1995. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology. 31:86–99.
- Sangrajrang, S., Schmezer, P., Burkholder, I., Waas, P., Boffetta, P., et al. 2008. Polymorphisms in three base excision repair genes and breast cancer risk in Thai women. Breast Cancer Research and Treatment . 111: 279–288.
- Shaw, H. J., and Katsikas, D. K. 1973. Ameloblastoma of the maxilla : A clinical study with four cases. The Journal of Laryngology & Otology. 87: 873 – 884.
- Small, I. A., and Waldron, C. A. 1955. Ameloblastoma of the Jaws. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.8: 281–297.
- Stern, M. C., Umbach, D. M., van Gils, C. H., Lunn, R. M., and Taylor, J. A. 2001. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 10: 125–131.
- Yanatatsaneejit, P., Kitkumthorn, N., Dhammawipark, C., Rabalert, J., Patel, V., and Mutirangura, A. 2010. Codon 72 Polymorphism in the P53 tumor suppressor gene in oral lichen planus lesions in a Thai population. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 11:1137-1141.
- Yeganeh, A., and Jocelyn, E. K. 2006. Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. Biochemistry and Cell Biology. 84: 490-504.
- Zhang, Y., Newcomb, P. A., Egan, K. M., Titus-Ernstoff, L., Chanock, S., Welch, R., et al. 2006. Genetic polymorphisms in base-excision repair pathway genes and risk of breast cancer. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 15: 353–358.

ภาคผนวก (Appendix)

ภาคผนวก

1. การสกัดดีเอ็นเอจากบล็อกชิ้นเนื้อ (Paraffin block) QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN/GERMANY) มีขั้นตอนดังนี้

1. นำชิ้นเนื้อทางพยาธิจาก Paraffin block มา ตัด section ให้มีความหนาประมาณ 5-10 μm
2. นำชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วมาใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5-2 มิลลิลิตร และเติม xylene 1 มิลลิลิตรลงใน ตัวอย่างชิ้นเนื้อ จากนั้นปิดฝา และ vortex ประมาณ 10 วินาที
3. Centrifuge 2 นาที ที่ความเร็ว 13000 rpm ด้วยอุณหภูมิห้อง
4. ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายด้านบนทิ้ง
5. เติม ethanol (96-100%) 1 มิลลิลิตร และ ผสมให้เข้ากันด้วย vortex
6. Centrifuge 2 นาที ที่ความเร็ว 13000 rpm ด้วยอุณหภูมิห้อง
7. ใช้ปิเปตต์ดูดสารละลายด้านบนทิ้ง
8. เปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15-25°C) หรือ incubate ที่ 37°C เวลา 10 นาที หรือจนกว่า ethanol จะระเหยหมด
9. เติม ATL buffer 180 μl และเติม Proteinase K 20 μl และ mix ด้วย vortex
10. Incubate ที่ 56°C เวลา 1 ชั่วโมง
11. Incubate ที่ 90°C เวลา 1 ชั่วโมง
12. Briefly centrifuge
13. เติม AL buffer 200 μl แล้ว mix ด้วย vortex จากนั้นเติม ethanol (96-100%) 200 μl และ mix ด้วย vortex อีกครั้ง
14. Briefly centrifuge
15. ดูดสารละลายออกจาก microcentrifuge tube เพื่อ transfer สู่ QIAamp MinElute column ปิดฝา จากนั้น centrifuge ที่ 6000xg (8000 rpm) 1 นาที และ เปลี่ยน collection tube 2 มิลลิลิตรออก ใส่ collection tube ที่สะอาดแทน
16. เติม AW1 buffer 500 μl ปิดฝา จากนั้น centrifuge ที่ 6000xg (8000 rpm) 1 นาที และ เปลี่ยน collection tube 2 มิลลิลิตรออก ใส่ collection tube ที่สะอาดแทน

17. เติม AW2 buffer 500 μ l ปิดฝา จากนั้น centrifuge ที่ 6000xg (8000 rpm) 1 นาที และเปลี่ยน collection tube 2 มิลลิลิตรออก ใส่ collection tube ที่สะอาดแทน
18. Centrifuge ที่ 20,000xg (14,000 rpm) 3 นาที
19. เปลี่ยน collection tube 2 มิลลิลิตรออก ใส่ microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ATE buffer 50 μ l
20. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (15-25°C) ประมาณ 5 นาที และ centrifuge ที่ 20,000xg (14,000 rpm) 1 นาที

2. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดโดยวิธี Phenol chloroform extraction มีขั้นตอนดังนี้

1. นำเลือดจากร่างกาย (whole blood) ปั่นตกที่ 3,300 rpm ดูดส่วน buffy coat หรือส่วนของ whole blood มาสกัดดีเอ็นเอ
2. เติมสารละลาย lysis buffer1 (sucrose) 10 ml. ต่อ ปริมาณเลือด 1 ml. นำมาผสมกันแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20°C ที่เวลา 5 นาที
3. นำมาปั่นตก 1,000 g RCF 8 นาที
4. เททิ้ง
5. เติมสารละลาย lysis buffer1 ปริมาณ 5 ml. ผสมแล้วปั่นตกที่ 1,000 g ที่เวลา 8 นาที จำนวน 2 ครั้ง
6. เททิ้ง
7. เติมสารละลาย lysis buffer2 ปริมาณ 900 μ l. เติม 10%SDS ปริมาณ 50 μ l, 20 mg./ml. ,เติม Protein Kinase ปริมาณ 20 μ l. นำมาผสมกัน
8. นำมาปั่นค้างคืนที่ 50°C
9. เติม Phenol : Chloroform : Isopropylalcohol ปริมาณ 25:24:1 (ผสมไว้แล้วเติม 1:1 หรือเติมเท่าตัว) นำไปใส่เครื่อง vortex
10. ปั่นตกที่ 14,000 rpm. โดย Spin down ที่เวลา 5 นาที สารละลายจะแยกเป็นสองชั้น โดยจะดูดสารละลายชั้นบนใส่ในหลอดทดลองใหม่

11. เติม 100% EtoH (แช่เย็น) 1 เท่า 7.5 M NH₄OAC 0.5 เท่า ผสมเบาๆ เพราะสาย DNA จะขาด *glycogen 2 µl.+3 M NaOAC 1/10 เท่า+100% ET(cold 2.5 เท่า)
- 12.ปั่นตก 14,000 rpm. ที่เวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสทิ้ง
13. เติม cold 70% EtoH ปริมาณ 500 µl.
14. ปั่นตก 14,000 rpm. ที่เวลา 5 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนบนทิ้ง ปล่อยให้ Air dry ให้แห้ง
15. ละลายใน dH₂O หรือ TE buffer 200 µl.(whole blood) หรือ 20-50 µl. DNA

lysis buffer 1 ประกอบด้วย

ผสมสารละลาย Tris HCL	10 มิลลิลิตร
1M EDTA	50 มิลลิลิตร
NaCl	1.16 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

3. เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

PvuII

Recognition Site	5'... CAGCTG...3' 3'... GTCGAC...5'
Storage Temperature	Store at -20°C
Reaction Conditions	1X NEBuffer 2
Incubate Conditions	at 37°C.

Storage Conditions Buffer

- 1X NEBuffer 2
- 10 mM Tris-HCl
- 50 mM NaCl
- 10 mM MgCl₂

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9 @ 25°C

Percent Activity in Buffer

NEBuffer 1	NEBuffer 2	NEBuffer 3	NEBuffer 4
100%	100%	100%	100%

Rsa

Recognition Site



Storage Temperature

Store at -20°C

Reaction Conditions

1X NEBuffer 4

Incubate Conditions

at 37°C.

Storage Conditions Buffer

1X NEBuffer 4:

20 mM Tris-acetate

50 mM potassium acetate

10 mM Magnesium Acetate

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9 @ 25°C

Percent Activity in Buffer

NEBuffer 1	NEBuffer 2	NEBuffer 3	NEBuffer 4
100%	100%	50%	100%

MspI

Recognition Site	5'... C [▼] CGG... 3' 3'... GG [▲] C... 5'
Storage Temperature	Store at -20°C
Reaction Conditions	1X NEBuffer 4
Incubate Conditions	at 37°C.

Storage Conditions Buffer

1X NEBuffer 4:

20 mM Tris-acetate

50 mM potassium acetate

10 mM Magnesium Acetate

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9 @ 25°C

Percent Activity in Buffer

NEBuffer 1	NEBuffer 2	NEBuffer 3	NEBuffer 4
75%	100%	50%	100%

4. DNA Ladder

GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, 25-700 bp

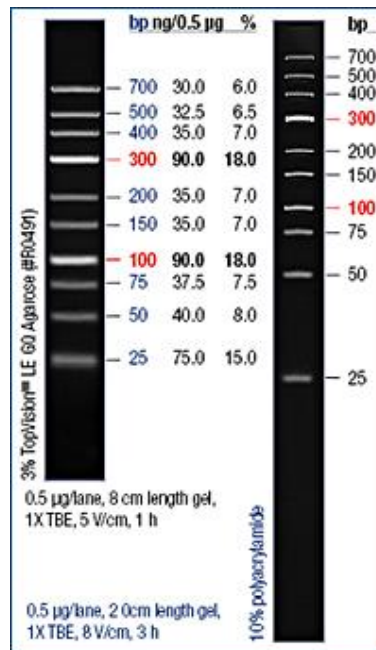
Storage Buffer (TE buffer)

10 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1 mM EDTA

6X DNA Loading Dye

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF,
60% glycerol and 60 mM EDTA

Storage Temperature at -20°C



5. Reagents for agarose gel electrophoresis

3% Agarose gel

Agarose	1.5 g
1X TBE	50 mL
ethidium bromide	3 µl.

10X TBE Electrophoresis Buffer

Tris Base	108 g
Boric Acid	55g
0.5M EDTA	20 mL
Water	to 1.0 L

1X TBE Electrophoresis Buffer

10X TBE	100 mL
water	900 mL

10 mg/ml Ethidium bromide

Ethidium bromide 1.0 g

Distilled water 100 ml

Mix the solution and store in the dark at 4°C.



รูปแสดงการเตรียม agarose gel

6. Hardy-Weinberg equilibrium

ค่า P value > 0.05 จึงถือว่าอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium

6.1 โปรแกรมจาก <http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>

วิธีการใช้ : กรอกข้อมูลลงในตาราง กด Calculate

Codon 194

Common homozygotes Heterozygotes Rare Homozygotes

Result

$\chi^2 = 0.23$

(140 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	72.86	74
Heterozygotes	56.27	54
Rare homozygotes	10.86	12

p allele freq = 0.72; q allele freq = 0.28

Solutions for perfect HWE, under a model of ascertainment (+/-) of one group

Group affected	Common Hz	Heterozygotes	Rare Hz	p allele freq	q allele freq
Common Hz	60.75	54	12	0.69	0.31
Heterozygotes	74	59.6	12	0.71	0.29
Rare Hz	74	54	9.85	0.73	0.27

Codon 280

Common homozygotes Heterozygotes Rare Homozygotes

Result

$\chi^2 = 3.08$

(140 samples counted)

for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	100.3	103
Heterozygotes	36.4	31
Rare homozygotes	3.3	6

p allele freq = 0.85; q allele freq = 0.15

Solutions for perfect HWE, under a model of ascertainment (+/-) of one group

Group affected	Common Hz	Heterozygotes	Rare Hz	p allele freq	q allele freq
Common Hz	40.04	31	6	0.72	0.28
Heterozygotes	103	49.72	6	0.81	0.19
Rare Hz	103	31	2.33	0.87	0.13

Codon 399

Common homozygotes Heterozygotes Rare Homozygotes

Result

$X^2 = 0.28$

(140 samples counted)

for likelihoods of calculated X^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	75.78	77
Heterozygotes	54.44	52
Rare homozygotes	9.78	11

p allele freq = 0.74; q allele freq = 0.26

Solutions for perfect HWE, under a model of ascertainment (+/-) of one group

Group affected	Common Hz	Heterozygotes	Rare Hz	p allele freq	q allele freq
Common Hz	61.45	52	11	0.7	0.3
Heterozygotes	77	58.21	11	0.73	0.27
Rare Hz	77	52	8.78	0.75	0.25

Chi-squared distribution (1 degree of freedom):

<i>P value</i>	0.05	0.01	0.005	0.001
Chi-squared	3.84	6.63	7.88	10.83

6.2 การคำนวณโดยใช้สูตร

ใช้สูตรการคำนวณดังนี้

Genotype	Frequency	
CC	74	m1
CT	54	m2
TT	12	m3

C allele frequency	0.72	p	$(2m1+m2)/(2*(m1+m2+m3))$
T allele frequency	0.28	q	$(m2+2m3)/(2*(m1+m2+m3))$
	1.00	p+q	

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

$$p = 0.72$$

$$q = 0.28$$

Prob (CC)	0.52	p^2
Prob (CT)	0.40	$2pq$
Prob (TT)	0.08	q^2
	1.000	$p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Genotype	Observed (O)	Expected (E)	Different (O-E)	Chi-square (O-E) ² / E
CC	74	72.80	1.2	0.020
CT	54	56.00	-2.0	0.071
TT	12	11.20	0.8	0.057
total	140	140	0.00	0.148

จากตาราง ได้ค่า Chi-square เท่ากับ 0.148 และค่า P value > 0.05 จึงถือว่าอยู่ใน Hardy-Weinberg equilibrium

7. SNPs and haplotype analysis

PLINK v1.07 คือโปรแกรมที่คิดค้นโดย Purcell *et al* จาก the Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital, Boston (Purcell *et al.*, 2007) ซึ่งสามารถดาวน์โหลด software ได้ที่ <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>.

วิธีการใช้โปรแกรม PLINK v1.07

7.1 การเตรียมข้อมูลตามรูปแบบของโปรแกรม

การทำงานของโปรแกรม PLINK นั้นจะต้องมีข้อมูลอยู่ 2 แบบ คือข้อมูล PED files และ MAP files

1. PED file

ใน PED file นั้นจะประกอบไปด้วย 6 ข้อมูล ดังนี้

Family ID

Individual ID

Paternal ID

Maternal ID

Sex (1=male; 2=female)

Phenotype (normal=1; SLE=2)

1. กรอกข้อมูลลงใน Excel

2. นำข้อมูลมาวางใน Notepad แล้วบันทึกเป็นไฟล์นามสกุล PED

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	FM1	N1	0	0	2	1	TT	GG	GG				Row:1
2	FM2	N2	0	0	2	1	CC	GG	GG				
3	FM3	N3	0	0	1	1	TT	GG	GG				
4	FM4	N4	0	0	1	1	CC	GG	GA				
5	FM5	N5	0	0	1	1	CT	GG	GG				
6	FM6	N6	0	0	2	1	CC	GG	GG				
7	FM7	N7	0	0	1	1	TT	GG	GG				
8	FM8	N8	0	0	1	1	CC	GG	GG				
9	FM9	N9	0	0	2	1	CT	GG	GA				
10	FM10	N10	0	0	1	1	CC	GG	GG				
11	FM11	N11	0	0	2	1	CC	GG	GA				
12	FM12	N12	0	0	1	1	CT	GG	GG				
13	FM13	N13	0	0	2	1	CC	GG	GG				
14	FM14	N14	0	0	1	1	CC	GG	GA				
15	FM15	N15	0	0	1	1	CC	GG	AA				
16	FM16	N16	0	0	2	1	TT	GG	GA				

ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงใน Excel

File	Edit	Format	View	Help							
FM1	N1	0	0	2	1	T	T	G	G	G	G
FM2	N2	0	0	2	1	C	C	G	G	G	G
FM3	N3	0	0	1	1	T	T	G	G	G	G
FM4	N4	0	0	1	1	C	C	G	G	G	A
FM5	N5	0	0	1	1	C	T	G	G	G	G
FM6	N6	0	0	2	1	C	C	G	G	G	G
FM7	N7	0	0	1	1	T	T	G	G	G	G
FM8	N8	0	0	1	1	C	C	G	G	G	G
FM9	N9	0	0	2	1	C	T	G	G	G	A
FM10	N10	0	0	1	1	C	C	G	G	G	G
FM11	N11	0	0	2	1	C	C	G	G	G	A
FM12	N12	0	0	1	1	C	T	G	G	G	G
FM13	N13	0	0	2	1	C	C	G	G	G	G
FM14	N14	0	0	1	1	C	C	G	G	G	A
FM15	N15	0	0	1	1	C	C	G	G	A	A
FM16	N16	0	0	2	1	T	T	G	G	G	A
FM17	N17	0	0	2	1	C	T	G	G	G	A
FM18	N18	0	0	1	1	C	T	G	G	G	G
FM19	N19	0	0	2	1	T	T	G	G	G	G
FM20	N20	0	0	2	1	C	T	G	A	G	A
FM21	N21	0	0	1	1	C	C	G	G	G	A
FM22	N22	0	0	1	1	C	C	G	G	G	G
FM23	N23	0	0	2	1	C	C	G	G	A	A
FM24	N24	0	0	2	1	C	C	G	G	G	G

ตัวอย่าง PED file (L.ped)

2. MAP

ใน MAP file นั้นจะประกอบไปด้วย 4 ข้อมูล ดังนี้

chromosome (1-22, X, Y or 0 if unplaced)

rs# or snp identifier

Genetic distance (morgans)

Base-pair position (bp units)

1.กรอกข้อมูลลงใน Excel

2.นำข้อมูลมาวางใน Notepad แล้วบันทึกเป็นไฟล์นามสกุล MAP

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	19	rs1799782	0	48749414					
2	19	rs25489	0	48748252					
3	19	rs25487	0	48747566					
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									

ตัวอย่างการบันทึกข้อมูลลงบน Excel

File	Edit	Format	View	Help
19	rs1799782	0	48749414	
19	rs25489	0	48748252	
19	rs25487	0	48747566	

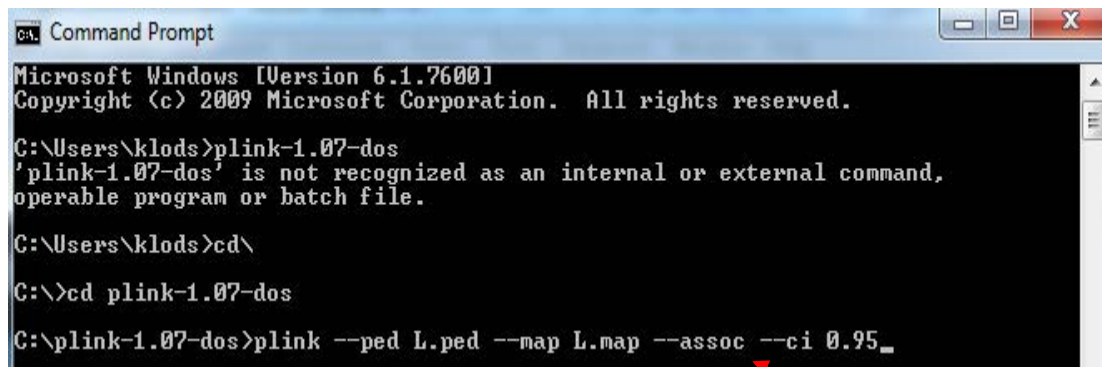
ตัวอย่าง MAP file (L.map)

7.2 คำสั่งเริ่มการทำงานของ PLINK program

การใช้โปรแกรม PLINK

1. เข้าโปรแกรม Command Prompt
2. พิมพ์ `cd \` (enter) --> `plink-1.07-dos` (enter)
3. พิมพ์ `plink --ped L.ped --map L.map --` คำสั่งที่ต้องการหาค่าความสัมพันธ์
(ดูคำสั่งได้จากคู่มือ PLINK v1.07)

7.2.1. Allelic association test



```

C:\Users\klods>plink-1.07-dos
'plink-1.07-dos' is not recognized as an internal or external command,
operable program or batch file.

C:\Users\klods>cd\
C:\>cd plink-1.07-dos
C:\plink-1.07-dos>plink --ped L.ped --map L.map --assoc --ci 0.95_

```

เมื่อทำการสั่งโปรแกรมเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ข้อมูลที่ได้จะมีดังนี้

CHR Chromosome

SNP SNP ID

BP Physical position (base-pair)

A1 Minor allele name (based on whole sample)

F_A Frequency of this allele in cases

F_U Frequency of this allele in controls

A2 Major allele name

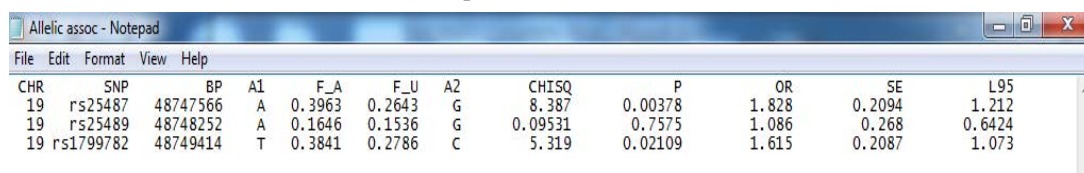
P Exact p-value for this test

OR Estimated odds ratio (for A1)

L95 Lower bound of 95% confidence interval for odds ratio

U95 Upper bound of 95% confidence interval for odds ratio

ตัวอย่างข้อมูลที่ได้จากการเข้าโปรแกรม



CHR	SNP	BP	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR	SE	L95	U95
19	rs25487	48747566	A	0.3963	0.2643	G	8.387	0.00378	1.828	0.2094	1.212	
19	rs25489	48748252	A	0.1646	0.1536	G	0.09531	0.7575	1.086	0.268	0.6424	
19	rs1799782	48749414	T	0.3841	0.2786	C	5.319	0.02109	1.615	0.2087	1.073	

7.2.2. Model of inheritance analysis

การศึกษารูปแบบการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมว่ามีลักษณะเด่นหรือด้อยนั้น เราจะทำการศึกษาโดยใช้ minor allele เป็นตัวทดสอบ โดยให้ d เป็น minor allele และ D เป็น major allele)

Allelic: D versus d

Dominant: (DD, Dd) versus dd

Recessive: DD versus (Dd, dd)

Genotypic: DD versus Dd versus dd

ซึ่งการศึกษารูปแบบการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมว่ามีลักษณะเด่นหรือด้อยนั้น ให้ทำการสั่งโปรแกรมดังรูปข้างล่าง

```
C:\plink-1.07-dos>plink --ped L.ped --map L.map --model_
```

ตัวอย่างข้อมูลที่ได้จากการเข้าโปรแกรม

CHR	SNP	A1	A2	TEST	AFF	UNAFF	CHISQ	DF	P
19	rs25487	A	G	GENO	10/45/27	11/52/77	10.13	2	0.006316
19	rs25487	A	G	TREND	65/99	74/206	8.522	1	0.003509
19	rs25487	A	G	ALLELIC	65/99	74/206	8.387	1	0.00378
19	rs25487	A	G	DOM	55/27	63/77	10.12	1	0.001468
19	rs25487	A	G	REC	10/72	11/129	1.136	1	0.2865
19	rs25489	A	G	GENO	3/21/58	6/31/103	NA	NA	NA
19	rs25489	A	G	TREND	27/137	43/237	0.08524	1	0.7703
19	rs25489	A	G	ALLELIC	27/137	43/237	0.09531	1	0.7575
19	rs25489	A	G	DOM	24/58	37/103	NA	NA	NA
19	rs25489	A	G	REC	3/79	6/134	NA	NA	NA
19	rs1799782	T	C	GENO	14/35/33	12/54/74	5.116	2	0.07744
19	rs1799782	T	C	TREND	63/101	78/202	4.948	1	0.02612
19	rs1799782	T	C	ALLELIC	63/101	78/202	5.319	1	0.02109
19	rs1799782	T	C	DOM	49/33	66/74	3.295	1	0.06949
19	rs1799782	T	C	REC	14/68	12/128	3.615	1	0.05727

7.2.3. Conditional analysis of SNP การวิเคราะห์สหสัมพันธ์เพื่อให้ทราบถึงสหสัมพันธ์แต่ละตำแหน่งว่ามี การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแบบใด ต้องเลือกคำสั่งโดยอาจให้เป็นแบบ dominant หรือ recessive

```
C:\>cd plink-1.07-dos
C:\plink-1.07-dos>plink --ped L.ped --map L.map --logistic --recessive --condition rs1799782_
```

ตัวอย่างข้อมูลที่ได้จากการเข้าโปรแกรม

CHR	SNP	BP	A1	TEST	NMISS	OR	STAT	P
19	rs25487	48747566	A	REC	222	1.75	1.204	0.2285
19	rs25487	48747566	A	rs1799782	222	2.286	1.953	0.05083
19	rs25489	48748252	A	REC	222	0.8503	-0.2231	0.8235
19	rs25489	48748252	A	rs1799782	222	2.196	1.868	0.0618
19	rs1799782	48749414	T	REC	222	NA	NA	NA
19	rs1799782	48749414	T	rs1799782	222	NA	NA	NA

7.2.4. Haplotype analysis

สำหรับการหาความสัมพันธ์ของhaplotype นั้นต้องใช้คำสั่งตามภาพด้านล่าง

```
C:\>cd plink-1.07-dos
C:\plink-1.07-dos>plink --ped L.ped --map L.map --hap-snp rs1799782,rs25489,rs25487 --hap-assoc_
```

ตัวอย่างข้อมูลที่ได้จากการเข้าโปรแกรม

LOCUS	HAPLOTYPE	F_A	F_U	CHISQ	DF	P	SNPS
WIN1	OMNIBUS	NA	NA	20.57	6	0.002194	rs25487 rs25489 rs1799782
WIN1	GAT	0.03019	0.02727	0.03197	1	0.8581	rs25487 rs25489 rs1799782
WIN1	AGT	0.1037	0.0287	10.94	1	0.0009414	rs25487 rs25489 rs1799782
WIN1	GGT	0.2502	0.2226	0.4418	1	0.5063	rs25487 rs25489 rs1799782
WIN1	AAC	0.02736	0.01659	0.5961	1	0.4401	rs25487 rs25489 rs1799782
WIN1	GAC	0.1071	0.1097	0.007381	1	0.9315	rs25487 rs25489 rs1799782
WIN1	AGC	0.2653	0.219	1.226	1	0.2681	rs25487 rs25489 rs1799782
WIN1	GGC	0.2162	0.3761	12.22	1	0.0004721	rs25487 rs25489 rs1799782

8. Odds Ratio (อัตราส่วนออก)

เป็นการคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัวที่แต่ละตัวเป็นตัวแปรจัดกลุ่มที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (dichotomous) อัตราส่วนออกจะออกมาในรูปแบบของตาราง 2 x 2 ดังนี้

รูปแบบการแจกแจงความถี่กรณีที่มีผู้ประเมิน 2 คน ประเมินแบบ 2 ค่า

Exposure	Disease		
	+	-	
+	a	b	a + b
-	c	d	c + d
	a + c	b + d	Total

โดยนิยามอัตราส่วนยอด หรือ OR ได้ว่า

$$OR = \frac{[a/(a+b)]/[b/(a+b)]}{[c/(c+d)]/[d/(c+d)]} \quad (1)$$

แต่ลดทอนได้

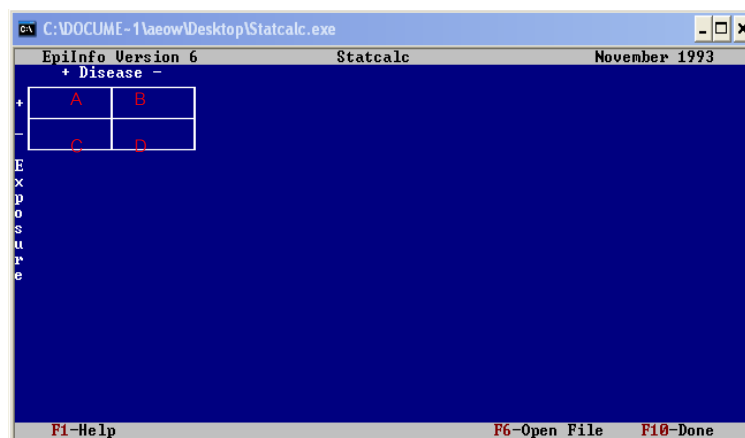
$$OR = \frac{a/b}{c/d} \quad (2)$$

หรือ OR โดยปกติคำนวณได้ด้วย

$$OR = \frac{ad}{bc} \quad (3)$$

สมการสุดท้ายแสดงให้เห็นว่า OR เท่ากับอัตราส่วน cross product ทั่วไปของตาราง 2 x 2 หรือ contingency tables : Statcalc

ตาราง 2 x 2 หรือ contingency tables : Statcalc



- A คือ ความถี่ของอัลลีลที่เป็นปัจจัยเสี่ยง แล้วทำให้เกิดโรค
- B คือ ความถี่ของอัลลีลที่เป็นปัจจัยเสี่ยง แล้วไม่ทำให้เกิดโรค
- C คือ ความถี่ของอัลลีลที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยง แล้วทำให้เกิดโรค
- D คือ ความถี่ของอัลลีลที่ไม่เป็นปัจจัยเสี่ยง แล้วไม่ทำให้เกิดโรค

The screenshot shows the Statcalc software window with the following data and results:

EpiInfo Version 6		Statcalc		November 1993	
+ Disease -				Analysis of Single Table	
+	38	65	103	Odds ratio = 1.73 (1.04 <OR< 2.88)	
-	70	207	277	Cornfield 95% confidence limits for OR	
E	108	272	380	Relative risk = 1.46 (1.06 <RR< 2.02)	
x				Taylor Series 95% confidence limits for RR	
p				Ignore relative risk if case control study.	
o				Chi-Squares	
s				P-values	
u				Uncorrected :	4.99 0.0255616
r				Mantel-Haenszel:	4.97 0.0257562
e				Yates corrected:	4.43 0.0353023
				F2 More Strata; <Enter> No More Strata; F10 Quit	

At the bottom of the window, there are function key shortcuts: F1-Help, F2-Stratum, F5-Print, F6-Open File, and F10-Done.

ภาพตัวอย่างจากการใช้โปรแกรม Statcalc

การอ่านค่าจากโปรแกรม Statcalc

1. Odds Ratio มีค่า 1.73
2. 95% CI อยู่ระหว่าง 1.04-2.88
3. Chi-Squares และ P value เลือกที่ค่า Yates corrected

ซึ่งการคำนวณค่า odds ratios นั้นเป็นการคำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัว ที่แต่ละตัวเป็นตัวแปรจัดกลุ่มที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกา รมีหรือไม่มี ปัจจัยที่เราสงสัย จะเสี่ยงต่อการเกิดโรคน้อยเพียงใด

ซึ่งค่า odds ratios ที่ได้สามารถแปลความหมายได้ดังนี้

= 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา นั้นไม่สัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยง

> 1 การเกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา นั้นสัมพันธ์กับการมีหรือไม่มีปัจจัยเสี่ยงเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่ป่วย

< 1 การมีปัจจัยเสี่ยงนั้น ทำให้ไม่เกิดโรคหรือภาวะที่สนใจศึกษา

และทุกครั้งที่เราศึกษาค่า odds ratios เราในแง่ปฏิบัติก็มักจะสุ่มมาทำแค่ครั้งเดียว ดังนั้นจึงต้อง รายงานค่าเป็นช่วง ซึ่งที่นิยมกันคือ 95% confident intervals (95% CI) ซึ่งค่า 95% CI ต้องไม่ ครอบคลุมค่า 1 และค่า P value < 0.05 จึงถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฐิติพร บุญสุวรรณ เกิดวันที่ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดยะลา สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนสุนารีวิทยา และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิตจากภาควิชาชีววิทยา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551