

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E47236



CHEMOTHERAPEUTIC MARKER FOR PREDICTION OF 5-FU
RESPONSE IN CHOLANGIOCARCINOMA

MISS JARIYA CHAIYAGOOOL

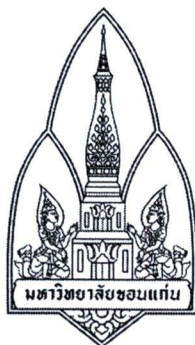
A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY

2010



E47236

600254759



**CHEMOTHERAPEUTIC MARKER FOR PREDICTION OF 5-FU
RESPONSE IN CHOLANGIOCARCINOMA**



MISS JARIYA CHAIYAGOOOL

**A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY**

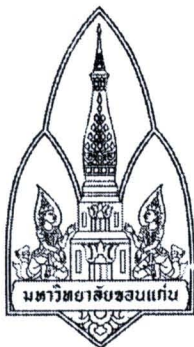
2010

**CHEMOTHERAPEUTIC MARKER FOR PREDICTION OF 5-FU
RESPONSE IN CHOLANGIOCARCINOMA**

MISS JARIYA CHAIYAGOO

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN
MEDICAL MICROBIOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2010



THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
MASTER OF SCIENCE
IN MEDICINE MICROBIOLOGY

Thesis title: Chemotherapeutic marker for prediction of 5-FU response in
cholangiocarcinoma

Author: Miss Jariya Chaiyagool

Thesis Examination Committee:

Assoc. Prof. Dr. Sukathida Ubol	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Chariya Hahnvajjanawong	Member
Assoc. Prof. Dr. Vajarapong Bhudhiswasdi	Member
Assoc. Prof. Dr. Wichittra Tassaneeyakul	Member
Assoc. Prof. Dr. Wanlop Kaekes	Member

Thesis Advisor:

..... *Chariya Hahnvajjanawong* Advisor
(Asst. Prof. Dr. Chariya Hahnvajjanawong)

..... *V. Bhudhiswasdi* Co-Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Vajarapong Bhudhiswasdi)

..... *W. Tassaneeyakul* Co-Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Wichittra Tassaneeyakul)

..... *L. Manmart*
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)

Dean, Graduate School

..... *Pisake Lumbiganon*
(Prof. Pisake Lumbiganon)

Dean, Faculty of Medicine

จริยา ไชยกุล. 2553. การศึกษาเพื่อหาตัวบ่งชี้ที่สามารถใช้ทำนายการตอบสนองต่อยา 5-FU ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ.ดร. จริยา หาญจนวงศ์,
รศ. วัชรพงศ์ พุทธิสวัสดิ์,
รศ.ดร. วิจิตรา ทศนียกุล

บทคัดย่อ

E 47236

5-Fluorouracil (5-FU) เป็นยาเคมีบำบัดหลักที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จากหลักฐานการศึกษาในผู้ป่วยพบว่าอัตราการตอบสนองของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีต่อยา 5-FU อยู่ในระดับที่ค่อนข้างต่ำ แนวทางสำคัญที่จะให้ประสบความสำเร็จในการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดคือการตรวจหาผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อนั้น ดังนั้นการทดสอบความไวต่อยาเคมีบำบัดของผู้ป่วยจึงมีความจำเป็นที่จะช่วยในการทำนายการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด รวมทั้งอาจใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกยาเคมีบำบัดเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีให้เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละคน จากรายงานการวิจัยพบว่าวิธี histoculture drug response assay (HDRA) เป็นวิธีการทดสอบความไวของเนื้อเยื่อมะเร็งต่อยาเคมีบำบัดในมะเร็งหลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาเทคนิค HDRA เพื่อใช้ในการทดสอบความไวต่อยา 5-FU ของเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี โดยการนำเนื้อเยื่อมะเร็งมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยให้สัมผัสกับ 5-FU ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C และควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นเนื้อเยื่อมะเร็งจะถูกนำมาแช่ในฟอร์มาลิน หลังจากนั้น embedded ในพาราฟินบล็อกและตัดเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ eosin เพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์มะเร็งที่มีชีวิตและเซลล์มะเร็งทั้งหมดของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ inhibition index (%I.I.) โดยใช้สูตร $\%I.I. = (1 - \% \text{ living tumor cell of 5-FU-treated tumor tissue} / \% \text{ total tumor cell of control tissue}) \times 100$

จากกราฟ dose response curve ของ 5-FU ที่ความเข้มข้นในช่วง 100-1,000 µg/ml พบว่า %I.I. มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (linear relationship) กับความเข้มข้นของยา 5-FU ในช่วง 100-400 µg/ml จาก dose response curve ความเข้มข้นของยา 5-FU ที่ 200 µg/ml และ 50% I.I. ถูกเลือกมาใช้เป็น cut off point ในการแยกแยะระหว่าง กลุ่มเนื้อเยื่อมะเร็งที่ตอบสนองต่อยาไม่ค่อยดี และกลุ่มเนื้อเยื่อมะเร็งที่ตอบสนองต่อยาสูง ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา 5-FU ได้แก่ thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidine

E 47236

phosphorylase (TP) และ orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 35 รายโดยวิธี real-time RT-PCR จากผลการวิจัยพบว่าระดับการแสดงออกของ DPD และ TP มีความแตกต่างอย่างชัดเจนในผู้ป่วยแต่ละราย (169 เท่า : มีค่าระหว่าง 0.04-6.76 และ 100 เท่า : มีค่าระหว่าง 0.03-3.01 ตามลำดับ) ในขณะที่ระดับการแสดงออกของ TS และ OPRT มีความแตกต่างระดับปานกลาง (31 เท่า : มีค่าระหว่าง 0.04-1.22 และ 34 เท่า : มีค่าระหว่าง 0.03-1.02 ตามลำดับ) ซึ่งการแสดงออกที่มีความแตกต่างกันในแต่ละยีนนี้อาจมีสาเหตุมาจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของแต่ละยีนซึ่งมีผลในการควบคุมการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีนและโปรตีนเหล่านี้

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการแสดงออกของ OPRT และ TS มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.602 ($P<0.05$) ซึ่งอาจบ่งชี้ว่ากระบวนการสังเคราะห์ DNA ในวิถี de novo synthesis ในมะเร็งท่อน้ำดีอาจเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของยีนทั้งสองตัวนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ OPRT และ DPD มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.621 ($P<0.05$) การแสดงออกของ DPD และ TP มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.569 ($P<0.05$) DPD เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการ catabolism ของ pyrimidine ในขณะที่ TP เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในกระบวนการ salvage phosphorylation

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความไวต่อยา 5-FU และการแสดงออกของยีน TS, TP, DPD และ OPRT ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 28 ราย พบว่า TP มีแนวโน้มที่จะแสดงออกมากในกลุ่มเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีการตอบสนองต่อยาไม่ค่อยดี ในขณะที่การแสดงออกของยีน OPRT มีแนวโน้มที่จะพบมากในกลุ่มเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีการตอบสนองต่อยาดี ถึงแม้จะไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในรูปอัตราส่วนของการแสดงออกของยีน OPRT เทียบกับยีน TP (OPRT/TP ratio) พบว่าค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของ OPRT/TP mRNA พบมากในกลุ่มเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีการตอบสนองต่อยาดี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเนื้อเยื่อมะเร็งที่มีการตอบสนองต่อยาไม่ดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากผลการศึกษาพบว่าอัตราส่วนการแสดงออกของยีน OPRT/TP อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีต่อยา 5-FU เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี modified HDRA อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยการติดตามผลการรักษาด้วย 5-FU ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกลุ่มนี้ว่าผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วย 5-FU ว่าสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ได้ในหลอดทดลองครั้งนี้หรือไม่

Jariya Chaiyagool. 2010. **Chemotherapeutic Marker for Prediction of 5-FU**

Response in Cholangiocarcinoma. Master of Science Thesis in

Medical Microbiology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors : Asst.Prof.Dr. Chariya Hahnvajanawong,
Assoc.Prof.Dr. Vajarapong Bhudhiswasdi,
Assoc.Prof.Dr. Wichitra Tassaneeyakul

ABSTRACT

E47236

5-Fluorouracil (5-FU) is a common drug used for palliative treatment of cholangiocarcinoma patients. Evidence from clinical studies reveals that the response rate of CCA patients to 5-FU is relatively poor. An important strategy for the successful application of chemotherapy is to define the subset of patients who will respond to it. Therefore, reliable chemosensitivity assays are needed to accurately predict the response to chemotherapy and the treatment of CCA patients. Among the *in vitro* chemosensitivity assays, the histoculture drug response assay (HDRA) was reported as a useful predictor for response to chemotherapy in various cancers. In this study, we have successfully set up a modified HDRA for determining the 5-FU sensitivity of CCA tissues. Using modified HDRA, CCA tumor tissues were cultured in medium in the absence or presence of 5-FU at various concentrations at 37 °C in 5% CO₂ incubator. After 4 day incubation, tumor tissues were fixed with formalin and paraffin embedded. The sections of tissues were stained with hematoxylin and eosin. The percentage of living and total tumor cells of control and tested group were examined under micaroscope. The percentage of inhibition index (%I.I.) was then calculated by using a following formula. % Inhibition index (%I.I.) = (1- % living tumor cell of 5-FU-treated tumor tissue/ % total tumor cell of control tissue)×100.

Then the dose response curve of 5-FU at concentration range from 100-1,000 µg/ml was constructed. The liner relationship between the response of CCA tissues to 5-FU was observed at the 5-FU concentration range from 100 to 400 µg/ml of culture medium. According to the dose response curve, the concentration of 200 µg/ml and 50% I.I. was selected as a cut off point to differentiate between a poorly response and well response groups for evaluating 5-FU sensitivity in CCA tissues.

E 47236

To predict the sensitivity of CCA tissues to 5-FU, we compared the gene expression of 5-FU metabolic enzymes such as thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidine phosphorylase (TP), and orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) of 35 surgically CCA tissues detected by real-time RT-PCR with 5-FU chemosensitivity as detected by the modified HDRA. We found that expression level of DPD and TP mRNA among individual samples was markedly different (169-fold; range 0.04-6.76 and 100-fold; range 0.03-3.01, respectively). Whereas, only moderately different in the expression levels of TS and OPRT mRNA were observed (31-fold; range 0.04-1.22 and 34-fold; range 0.03-1.02, respectively). The variations in DPD, TP, TS and OPRT gene expression may cause by the genetic polymorphism which lead to up-or down-regulation of gene and protein expression.

There was a significant correlation between the mRNA expressions of OPRT and TS, with a coefficient of correlation of 0.602 ($p < 0.05$). This finding suggests that de novo synthesis of DNA in CCA is coregulated by both OPRT and TS. In addition, OPRT and DPD mRNA expressions were significantly correlated with a coefficient of correlation of 0.621 ($p < 0.05$). DPD and TP mRNA expressions were also significantly correlated with a coefficient of correlation of 0.596 ($p < 0.05$). DPD is involved in the pyrimidine catabolism while TP is a salvage phosphorylating enzyme. This result suggests that these salvage pathways may work together to cover the requirement for de novo DNA synthesis.

The association between the 5-FU chemosensitivity and TS, TP, DPD and OPRT gene expression have been investigated in 28 CCA tissues. TP gene expression had a tendency to be higher in a poorly response group whereas, OPRT mRNA expression had a tendency to be higher in a well response group, although not statistically significant. However, in term of OPRT/TP ratio, we found the mean ratio of OPRT/TP mRNA expression was significantly higher in the well response group compared to the poorly response group. Our results suggest that OPRT/TP mRNA expression ratio may be a promising indicator of the chemosensitivity of CCA tissues to 5-FU using the modified HDRA established in this study. However, in this study is *in vitro* study, whether the OPRT/TP ratio could be used as predictors of 5-FU chemotherapy in CCA patients needs to be further confirmed *in vivo*.

**Goodness Portion to the Present Thesis is Dedicated
for my Parents, Relatives and Entire Teaching Staffs**

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Assistant Professor Dr. Chariya Hahnvajjanawong, for her kindness in providing an opportunity to be her advisee, her supervision, suggestions, valuable ideas, encouragement and helpfulness throughout my study and I also would like to express my greatest appreciation and sincere gratitude to my advisor committee, Associate Professor Dr. Vajarapong Bhudhiswasdi and Associate Professor Dr. Wichittra Tassaneeyakul for their valuable advice, kindness, useful comment and helpfulness throughout of my study. I deeply appreciate the time they spared me during the preparation of this thesis.

I wish to express my appreciation to Associate Professor Dr. Banchop Sripa and Assistant Professor Dr. Anucha Puapairoj for their guidance in the microscopic examination technique, crucial advice and suggestions.

I gratefully acknowledge Assistant Professor Dr. Narong Khuntikeo, Assistant Professor Dr. Siri Chau-in and Assistant Professor Dr. Ake Pugkhem to supply cholangiocarcinoma surgical specimens.

Appreciation is also expressed to all staff and member of the Department of Microbiology, Pharmacology, Pathology and Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University for their practical help, providing the wonderful environment and friendship during the time of this study.

I also thank to the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center for giving me the research scholarship for granting supports throughout my study.

Finally, I would like to express my sincere gratitude and appreciation to my family for their love, cheerfulness, support and encouragement not only in the present study but also all of my life.

Jariya Chaiyagool

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xi
LIST OF ABBREVIATIONS	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Rational and background	1
1.2 Objectives of the study	3
1.3 Scope and limitation of the study	3
1.4 Anticipate outcomes	4
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS	5
2.1 cholangiocarcinoma	5
2.1.1 Definition	5
2.1.2 Epidemiology	5
2.1.3 Etiology	6
2.1.4 Inflammation and carcinogenesis	7
2.1.5 Histopathology and histopathologic classification	9
2.1.6 Clinical features and diagnostic approaches	10
2.1.7 Treatment of CCA	11
2.1.8 5-Fluorouracil	14
2.1.9 Enzymes involved in the 5-FU function	16
2.2 Chemosensitivity assays	28
2.2.1 Differential staining cytotoxicity (DiSC) assay	28
2.2.2 Collagen-gel droplet embedded-culture drug sensitivity test (CD-DST)	30

TABLE OF CONTENTS (cont.)

	Page
2.2.3 Monolayer culture [3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)2,5diphenyl- 2H tetrazolium bromide] MTT assay	31
2.2.4 Human tumor clonogenic (HTCA) assay	32
2.2.5 Extreme drug resistance (EDR) assay	33
2.2.6 Histoculture drug response assay (HDRA)	34
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY	38
3.1 Materials	38
3.1.1 Chemicals	38
3.1.2 Cholangiocarcinoma tissues	39
3.1.3 Equipment	39
3.2 Methods	40
3.2.1 Determination of 5-FU efficacy on CCA tissues	40
3.2.2 Determination level of mRNA expression by real-time RT-PCR	41
3.3 Statistical analysis	44
CHAPTER IV RESULTS	45
4.1 Cancer tissues	45
4.2 Response of CCA tissues to 5-FU determined by HDRA	46
4.3 Evaluation of the 5-FU concentration as a cut-off point to differentiate the response of CCA tissues	48
4.4 Expressions of target genes in cholangiocarcinoma tissues	49
4.5 Relationships in the expression level of target mRNAs	50
4.6 Relationship between gene expression levels and response to 5-FU	52
CHAPTER V DISCUSSION	59
CHAPTER VI CONCLUSION	69
REFERENCES	71
APPENDICES	103

TABLE OF CONTENTS (cont.)

	Page
APPENDIX A REAGENTS	104
APPENDIX B DATA ANALYSIS	107
APPENDIX C STANDARD CURVE OF REAL-TIME RT-PCR	114
RESEARCH PRESENTATIONS AND PUBLICATIONS	118
CURRICULUM VITAE	119

LIST OF TABLES

	Page
Table 1 The summary administration of drug resistance and response rate in the treatment of CCA patients	14
Table 2 Demographic data of patients and cancer tissues	45
Table 3 Sensitivity of 5-FU (%I.I.) of CCA tissues	108
Table 4 Distribution levels of % cell viability on day 0 and day 4	109
Table 5 DPD, TP, TS and OPRT mRNA expression in CCA tissues	110
Table 6 OPRT/TP, DPD/TS, DPD/OPRT, TS/OPRT, TP/TS and TP/DPD mRNA expression in CCA tissues	111
Table 7 DPD, TP, TS and OPRT mRNA expression according to %I.I. in CCA tissues	112
Table 8 OPRT/TP, DPD/TS, DPD/OPRT, TS/OPRT, TP/TS and TP/DPD mRNA expression according to %I.I. in CCA tissues	113

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1 Characteristic of CCA	6
Figure 2 Molecular features of cholangiocarcinogenesis	9
Figure 3 Mechanism of 5-fluorouracil (5-FU) action including catabolism and Anabolism	15
Figure 4 <i>In vitro</i> assay schema: DiSC assay	29
Figure 5 The CD-DST procedure	31
Figure 6 <i>In vitro</i> assay schema: HTCA	33
Figure 7 <i>In vitro</i> assay schema :EDR assay	34
Figure 8 <i>In vitro</i> assay schema: HDRA	36
Figure 9 Representative H&E-stained sections of CCA tissues	47
Figure 10 Distribution levels of % cell viability on day 0 and day 4 after culture	48
Figure 11 Relationship between the mean inhibition index values obtained from HDRA after 4 day incubation in the culture medium containing vary concentration of 5-FU	49
Figure 12 Expression levels of target mRNA among 35 CCA tissues	50
Figure 13 Relationship between OPRT and TS mRNA levels	51
Figure 14 Relationship between OPRT and DPD mRNA levels	51
Figure 15 Relationship between TP and DPD mRNA levels	52
Figure 16 Distribution of TP mRNA levels and the response of CCA tissues to 5- FU	53
Figure 17 Distribution of OPRT mRNA levels and the response of CCA tissues to 5- FU	53
Figure 18 Distribution of TS mRNA levels and the response of CCA tissues to 5-FU	54
Figure 19 Distribution of DPD mRNA levels and the response of CCA tissues to 5- FU	54
Figure 20 Distribution of ratio of OPRT/TP expression and the response of CCA tissues to 5- FU	55

LIST OF FIGURES (cont.)

	Page
Figure 21 Distribution of ratio of DPD/TS expression and the response of CCA tissues to 5- FU	56
Figure 22 Distribution of ratio of DPD/OPRT expression and the response of CCA tissues to 5- FU	56
Figure 23 Distribution of ratio of TS/OPRT expression and the response of CCA tissues to 5- FU	57
Figure 24 Distribution of ratio of TP/TS expression and the response of CCA tissues to 5- FU	57
Figure 25 Distribution of ratio of TP/DPD expression and the response of CCA tissues to 5- FU	58
Figure 26 Standard curve for TS	115
Figure 27 Standard curve for DPD	115
Figure 28 Standard curve for TP	116
Figure 29 Standard curve for OPRT	116
Figure 30 Standard curve for GAPDH	117

LIST OF ABBREVIATIONS

&	And
°C	Degree Celsius
≥	Higher and equal
<	Lower
μ	Micro (10 ⁻⁶)
μg	Microgram
μl	Microliter
/	Per
%	Percent
bp	Base pairs
CCA	Cholangiocarcinoma
cDNA	Complementary DNA
cm	Centimeter
cm ³	Cubic centrimeter
CO ₂	Carbon dioxide
Conc.	Concentration
C _T	Cycle threshold
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DPD	Dihydropyrimidine dehydrogenase
DW	Distilled water
e.g.	Exempli gratia (Latin), for example
<i>et al.</i>	<i>Et. Alii</i> (Latin), and others
g	Gram
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosohate dehydrogenase
h	Hour
³ H	Tritium
L	Liter

LIST OF ABBREVIATIONS (cont.)

M	Molar
m ²	Square Millimeters
mg	Miligram
min	Minute(s)
ml	Milliliter
mRNA	Messenger ribonucleotic acid
n	Nano (10 ⁻⁹)
N ₂	Nitrogen
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate
OPRT	Orotate phosphoribosyl transferase
<i>P</i>	P-value
PCR	Polymerase chain reaction
pmol	Pico mole
rpm	Revolutions per minute
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse transcriptase
SD	Standard deviation
TP	Thymidine phosphorylase
TS	Thymidylate synthase
U	Unit
vs	Versus
yr	Year